

Über 2-Deoxy-2,3-dehydro-sialinsäuren, 1. Mitt.:

Synthese und Eigenschaften von 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäuren und deren Methylestern

Von

P. Meindl und H. Tuppy

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

(Eingegangen am 11. Juni 1969)

Wenn nach Behandlung der 2-Chlor-2-deoxy-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetylneuraminsäure mit HCl-absplattendenden Mitteln oder nach längerem Erhitzen der in Dioxan gelösten 2,4,7,8,9-Penta-O-acetyl-N-acetylneuraminsäure das Reaktionsprodukt O-deacetyliert wurde, entstand eine Verbindung, die mit Resorcin die für Sialinsäurederivate typische Farbreaktion gab. Sie gab mit CH_2N_2 einen Methylester, der bei der katalyt. Hydrierung 1 Mol H_2 pro Mol aufnahm und 2 Mol Natriummetaperjodat pro Mol verbrauchte. Diese Eigenschaften sowie die Elementaranalyse, das UV-, IR- und NMR-Spektrum der Verbindung wiesen diese als eine 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure aus.

Analog zur Darstellung des Methylesters der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure wurden von uns die Methylester der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-glykoly-, 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-propionyl-, 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-butyryl-, 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-benzoyl- und 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-carbobenzoxyneuraminsäure erhalten.

2-Deoxy-2,3-dehydro-sialic Acids, I: Synthesis and Properties of 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic Acids and Their Methyl Esters

When 2-chloro-2-deoxy-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid was treated with HCl-eliminating agents or when 2,4,7,8,9-penta-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid was heated for several hours in dioxan solution and the reaction product was

* Anschrift: Arzneimittelforschung Ges. m. b. H., A-1120 Wien, Laskegasse 5—11.

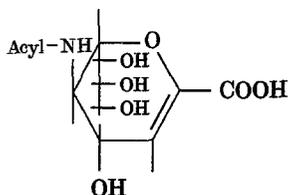
subsequently O-deacetylated, a compound was obtained which gave the resorcinol colour reaction characteristic of sialic acid derivatives. Its methyl ester upon catalytic hydrogenation took up 1 mole of hydrogen per mole and upon oxidation with sodium metaperiodate consumed 2 moles of the oxidant. These properties as well as the elementary analysis and the UV-, IR- and NMR-spectra of the new compound showed that it was 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid.

The methyl esters of 2-deoxy-2,3-dehydro-N-glycolyl-, 2-deoxy-2,3-dehydro-N-propionyl-, 2-deoxy-2,3-dehydro-N-butyryl-, 2-deoxy-2,3-dehydro-N-benzoyl- and 2-deoxy-2,3-dehydro-N-carbobenzoxy-neuraminic acid were obtained by reactions analogous to those used for the preparation of the methyl ester of 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid.

Während zahlreiche von Aldosen abgeleitete Glycale bekannt sind, scheinen Derivate von Ketosen mit Glycalnatur bisher nicht dargestellt worden zu sein. In der vorliegenden Abhandlung werden Synthese und Eigenschaften von Sialinsäurederivaten, die strukturell den Glycalen nahestehen, beschrieben. Einige von ihnen sind Inhibitoren der *Vibrio cholerae*- und Influenzavirus-Neuraminidase.

2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure

Die 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure (**4 A**) wurde aus Acetochlor-N-acetylneuraminsäure (**2 A**)¹ durch Chlorwasserstoffabspaltung und anschließende alkalische Verseifung der O-Acetylreste erhalten. Die HCl-Abspaltung erfolgte in einem inerten Lösungsmittel (wasserfr. Dioxan oder Aceton) mit halogenwasserstoffbindenden Stoffen, am besten



2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acylneuraminsäuren

- Acyl: Acetyl = **4 A**
 Glykolyl = **4 B**
 Propionyl = **4 C**
 Butyryl = **4 D**
 Benzoyl = **4 E**
 Carbobenzoxy = **4 F**

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

Triäthylamin oder Silbercarbonat. Wurde Triäthylamin als chlorwasserstoffbindendes Mittel eingesetzt, so war die Reaktion schon nach 10 Min. bei Zimmertemp. beendet. Bei Verwendung von Silbercarbonat waren erhöhte Temperaturen (80 bis 90°) sowie Reaktionszeiten zwischen 60 und 90 Min. erforderlich. Das Reaktionsgemisch wurde, ohne die 2-Deoxy-2,3-dehydro-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetylneuraminsäure (3 A) zu isolieren, mit verdünntem wäßrigen Alkali bei 40° behandelt, wodurch die O-Acetyl-Gruppen abgespalten wurden. Nachdem die Kationen mit Hilfe eines Ionenaustauschers aus der Lösung entfernt worden waren, ließ sich die 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure (4 A) zur Kristallisation bringen.

In wasserfreiem Methanol gab die Säure (4 A) mit einer ätherischen Lösung von Diazomethan den Methylester (5 A), in Pyridin mit Essigsäureanhydrid die 2-Deoxy-2,3-dehydro-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetylneuraminsäure (3 A). Während der Methylester (5 A) gut kristallisierte, ließ sich das Peracetyl-Derivat (3 A) nicht in kristalliner Form erhalten.

Die 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure (4 A) entstand auch regelmäßig bei der Synthese von α -Ketosiden der N-Acetylneuraminsäure¹ nach der Methode von *Koenigs* und *Knorr*². Ihr Peracetyl-Derivat (3 A) war in den Mutterlaugen nach der Kristallisation der Tetra-O-acetyl- α -ketoside angereichert. Zur Gewinnung der freien Säure (4 A) wurden die in der Mutterlauge verbliebenen Stoffe ent-acetyliert und sodann einer chromatographischen Trennung auf *Whatman 3MM* Papier unterworfen.

Es war naheliegend zu untersuchen, ob das Peracetyl-Derivat (3 A), aus dem die 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure (4 A) durch Verseifung gewonnen wird, nicht aus 2,4,7,8,9-Penta-O-acetyl-N-acetylneuraminsäure (1 A)¹ durch Abspaltung von Essigsäure zugänglich ist. Eine solche Abspaltung trat bei Zimmertemperatur nicht ein, wohl aber bei 90° sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Triäthylamin. Nach Verseifung der O-Acetylgruppen mit wäßrigem Alkali wurde 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure (4 A) erhalten, die als Methylester (5 A) charakterisiert wurde.

Die Abspaltung von Essigsäure aus Peracetylneuraminsäure (1 A) lief glatt ab; aus dem Methylester der 2,4,7,8,9-Penta-O-acetyl-N-acetylneuraminsäure³ konnten wir dagegen unter gleichartigen Reaktionsbedingungen keine 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure (4 A) erhalten.

Karkas und *Chargaff*⁴ wiesen darauf hin, daß Methylketoside von N-Acetylneuraminsäure und N-Glykolyneuraminsäure durch verdünnte

² *W. Koenigs* und *E. Knorr*, Ber. dtsch. Chem. Ges. **34**, 957 (1901).

³ *R. Kuhn*, *P. Lutz* und *D. L. MacDonald*, Chem. Ber. **99**, 611 (1966).

⁴ *I. D. Karkas* und *E. Chargaff*, J. Biol. Chem. **239**, 949 (1964).

Säuren rascher gespalten werden als ihre Methylester. Als Ursache für die erleichterte Spaltung der Methylketoside wurde die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke unter Entstehung eines fünfgliedrigen Ringes angenommen⁴. Eine solche Wasserstoffbrücke kann von dem Ester nicht gebildet werden. Auf Grund der vorliegenden Versuchsergebnisse ist daher nicht ausgeschlossen, daß erst durch eine Brückenbildung zwischen dem Proton der Carboxylgruppe und einem Sauerstoffatom der am C-2 der Neuraminsäure gebundenen Acetylgruppe die Abspaltung von Essigsäure aus 2,4,7,8,9-Penta-O-acetyl-N-acetylneuraminsäure (**1 A**) ermöglicht wird.

Die 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure und ihr Methylester reagierten im Resorcin-Test nach *Svennerholm*⁵ stark positiv, während sie im Thiobarbitursäure-Test nach *Aminoff*⁶ keine Farbreaktion gaben. Das Spektrum des mit Resorcin und dem Methylester der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure unter den Bedingungen der *Svennerholm*-schen Reaktion⁵ erhaltenen Farbstoffes zeigte bei 585 m μ ein Maximum mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von 8200. Zwischen 620 und 630 m μ beobachteten wir eine Schulter. Das Spektrum gleicht somit in dem von uns vermessenen Bereich nahezu jenem, das erhalten wird, wenn N-Acetylneuraminsäure der Resorcin-Reaktion unterworfen wird.

Die Säure hat eine gut titrierbare Carboxylgruppe. Ihr Methylester wurde in wäßriger Lösung mit einem Pd-Katalysator hydriert. Wir beobachteten die theoretische Wasserstoffaufnahme (1 Mol H₂ je Mol Ester). Das Kernresonanzspektrum des Methylesters wurde in D₂O aufgenommen und das Signal des olefinischen H-Atoms bei 6,05 ppm in der erwarteten Intensität gefunden. Auch UV- und IR-Spektrum standen mit der vorgeschlagenen Strukturformel in Einklang. Im UV-Spektrum des Methylesters der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure (in Methanol) zeigte sich ein Maximum bei 243 m μ , das somit im Erwartungsbereich für α,β -ungesättigte Ester lag. Das IR-Spektrum wurde in einem KBr-Preßling aufgenommen und zeigte die für α,β -ungesättigte Ester typische C=O-Bande bei 1710 cm⁻¹ und die C—O—C-Bande bei 1270 cm⁻¹. Bei der Perjodatoxidation verbrauchte der Methylester der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure 2 Mole Natriummetaperjodat je Mol Ester (vgl. Tab. 3); dieser Befund steht mit dem Vorliegen eines pyranoiden Ringes, in dem das Kohlenstoffatom 2 über eine Sauerstoffbrücke mit dem Kohlenstoffatom 6 des Neuraminsäurerüsts verbunden ist, in Einklang. Auf Grund der soeben angeführten Versuchsergebnisse kann als gesichert angesehen werden, daß der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Säure (**4 A**) die Struktur einer 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure zukommt.

⁵ L. *Svennerholm*, Biochim. Biophys. Acta [Amsterdam] **24**, 604 (1957).

⁶ D. *Aminoff*, Biochem. J. **81**, 384 (1961).

Bei der Behandlung der 2-Chlor-2-deoxy-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetylneuraminsäure (2 A) mit Triäthylamin, gefolgt von alkalischer Verseifung, entstand neben der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure (4 A) stets eine zweite Säure. Diese ließ sich verestern, gab mit Resorcin und Orcin Farbreaktionen, wurde jedoch von Perjodat nur sehr langsam angegriffen. Ihre Struktur wurde nicht aufgeklärt.

Andere 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acylneuraminsäuren

2-Deoxy-2,3-dehydro-N-glykolyneuraminsäure (4 B) stellten wir aus 2-Chlor-2-deoxy-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-(O-acetylglykoly)-neuraminsäure (2 B)⁷ durch HCl-Abspaltung mit Triäthylamin und alkalische Verseifung dar. Die Säure (4 B) wurde in amorpher Form erhalten, konnte aber als gut kristallisierender Methylester (5 B) charakterisiert werden. Analog wurden die Methylester der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-benzoyl- (5 E) und 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-carbobenzoxyneuraminsäure (5 F) aus den entsprechenden 2-Chlor-2-deoxy-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acylneuraminsäuren (2 E⁸ und 2 F) dargestellt.

2-Deoxy-2,3-dehydro-N-propionyl- (4 C) und 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-butyrylneuraminsäure (4 D) wurden aus 2,4,7,8,9-Penta-O-acetyl-N-propionyl- (1 C)⁸ und 2,4,7,8,9-Penta-O-acetyl-N-butyrylneuraminsäure (1 D)⁸ durch mehrstündiges Erwärmen auf 90–100° in Dioxan und anschließende Verseifung der O-Acetylgruppen in amorpher Form erhalten. Sie ließen sich mit CH₂N₂ in ihre kristallisierenden Methylester überführen (5 C und 5 D).

Die Eigenschaften der Methylester von 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-glykoly- (5 B), 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-propionyl- (5 C), 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-butyryl- (5 D), 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-benzoyl- (5 E) und 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-carbobenzoxyneuraminsäure (5 F) sind durchaus mit jenen vergleichbar, welche in dieser Arbeit für den Methylester der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure (5 A) schon beschrieben wurden. Unabhängig von der Natur des N-Acylrestes zeigten die in der Resorcin-Reaktion⁵ gebildeten Farbstoffe stets das bei 585 m μ liegende Absorptionsmaximum; die bei dieser Wellenlänge ermittelten Extinktionskoeffizienten sind der Tab. 1 zu entnehmen.

Einige der hier beschriebenen 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acylneuraminsäuren hemmen, wie in späteren Arbeiten ausführlich beschrieben werden wird, *Vibrio cholerae*- und Influenzavirus-Neuraminidase und beeinträchtigen die Vermehrung von *Myxoviren* in der Gewebekultur.

Für vorzügliche Mitarbeit danken wir Herrn H. Mahr und Fräulein T. Frisch. Für die Aufnahme und Auswertung der Kernresonanz-, Infra-

⁷ P. Meindl und H. Tuppy, Mh. Chem. **97**, 654 (1966).

⁸ P. Meindl und H. Tuppy, Mh. Chem. **97**, 1628 (1966).

rot- und Ultraviolett-Spektren sind wir Herrn Dr. A. Reuter, Dr. Karl Thomae GmbH, Chemisch-pharmazeutische Fabrik, Biberach a. d. Riss (BRD), aufrichtig verbunden.

Experimenteller Teil

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

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

Für die Dünnschichtchromatographie wurde 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 2043a und als Laufmittel Essigester—Eisessig—Wasser (3 : 1 : 3, v/v/v, absteigend) verwendet. Um die Substanzen sichtbar zu machen, wurden die Dünnschichtchromatogramme mit H₂SO₄—Wasser (1 : 1, v/v) besprüht und erhitzt⁹, die Papierchromatogramme mit Natriummetaperjodat und Benzidin behandelt¹⁰. Als *R_{NA}* bezeichnen wir die auf den *R_f*-Wert von N-Acetylneuraminsäure (= 1,00) bezogenen relativen *R_f*-Werte der Neuraminsäurederivate.

Die optischen Drehungen wurden mit einem lichtelektrischen Perkin-Elmer Polarimeter in 1 dm-Polarimeterrohren gemessen.

Die IR-Spektren der Substanzen wurden in KBr-Preßlingen mit einem Perkin-Elmer Infracord 237 Spektralphotometer, die UV-Spektren in methanol. Lösung mit einem Beckman DK-2 Spektralphotometer aufgenommen. Für die Vermessung der Kernresonanz-Spektren waren die Substanzen in D₂O gelöst; es wurde ein Kernresonanzspektrometer Varian A 60 verwendet.

N-Carbobenzoxyneuraminsäure erhielten wir nach der Vorschrift von *Wesemann* und *Zilliken*¹¹. Schmp. 180—182° u. Zers., $[\alpha]_D^{24} = -36^\circ$ (*c* = 0,50, Wasser).

Die Synthesen der 2,4,7,8,9-Penta-*O*-acetyl-Derivate der *N*-Acetylneuraminsäure (1 A)¹, *N*-Propionylneuraminsäure (1 C)⁸ und *N*-Butyrylneuraminsäure (1 D)⁸ sowie der 2-Chlor-2-deoxy-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-Derivate („Acetochlor“-Derivate) der *N*-Acetylneuraminsäure (2 A)¹, *N*-(*O*-Acetylglykolylyl)neuraminsäure (2 B)⁷ und *N*-Benzoylneuraminsäure (2 E)⁸ wurden schon an anderer Stelle beschrieben.

2,4,7,8,9-Penta-*O*-acetyl-*N*-carbobenzoxyneuraminsäure (1 F)

2,5 g *N*-Carbobenzoxyneuraminsäure wurden bei 4° unter Rühren mit 40 ml Ac₂O (dest.) und 25 ml Pyridin (über KOH dest.) versetzt. Nach etwa 1 Stde. war alles gelöst. Man ließ über Nacht im Eisschrank stehen und dampfte dann das Gemisch bei 40° im Vak. zu einem rot gefärbten Sirup ein, der in Eiswasser und Äthanol aufgenommen wurde. Die Lösung wurde zuerst mit 55 ml Dowex 50-X 8 (H⁺-Form) behandelt und sodann auf 250 ml Dowex 1-X 8 (Acetatform) aufgebracht. Den Anionenaustauscher wuschen wir mit 800 ml Äthanol—Wasser (2 : 1, v/v) nach. 1 F wurde sodann mit

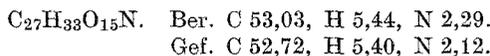
⁹ K. Randerath, Dünnschichtchromatographie, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, 1962.

¹⁰ Anfärbereagentien für Dünnschicht- und Papierchromatographie, E. Merck AG., Darmstadt-5 (Reagens Nr. 22).

¹¹ W. Wesemann und F. Zilliken, Liebigs Ann. Chem. 695, 209 (1966).

1200 ml 4*n*-Essigsäure in Äthanol—Wasser (2:1, v/v) eluiert. Das Eluat hinterließ nach dem Eindampfen im Vak. bei 40° 3,2 g (84% d. Th.) ölige **1 F**, $R_f = 0,46$ (Dünnschichtchromatogramm). Das Präparat ist für die weitere Bearbeitung rein genug.

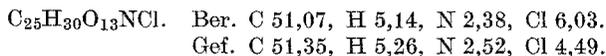
Wird jedoch auf eine sehr reine Substanz Wert gelegt, so hat sich die im folgenden beschriebene Umfällung bewährt: 1,08 g des öligen Eindampfrückstandes (siehe oben) wurden in 5 ml Essigester und 10 ml Äther gelöst und in Portionen mit insgesamt 20 ml Petroläther (*PÄ*) versetzt. Eine gelbe flockige Fällung wurde abfiltriert und das klare Filtrat in 200 ml *PÄ* eingegossen. Die nunmehr reine **1 F** (724 mg) fiel als weißer, amorpher Niederschlag an.



2-Chlor-2-deoxy-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-carbobenzoxymuraminensäure (2 F)

2,8 g **1 F** wurden in Essigsäure—Essigsäureanhydrid (3:1, v/v) gelöst. Bei 4° wurde bis zur Sättigung trockenes HCl-Gas eingeleitet. Nach beendeter Reaktion wurde am Rotationsverdampfer bei 40° eingedampft und der Rückstand in CHCl_3 aufgenommen. Nach dem Einengen blieb ein bräunliches Harz zurück. Die so erhaltene **2 F** (2,7 g) war für die folgenden Versuche rein genug, $R_f = 0,50$ (*DC*).

Für die Elementaranalyse wurden 300 mg des obigen Harzes in 5 ml Essigester und 40 ml Äther gelöst. Mit 150 ml *PÄ* erhielt man eine flockige bräunliche Fällung, die abfiltriert wurde. Sodann dampften wir das klare und farblose Filtrat zur Trockne ein. Der in 2 ml Essigester und 8 ml Äther gelöste Eindampfrest wurde in 100 ml *PÄ* unter Schütteln eingetragen. **2 F** fiel amorph an und wurde bei Zimmertemp. im Vak. über P_2O_5 bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.



2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure (4 A) aus 2-Chlor-2-deoxy-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetylneuraminsäure (2 A)

4,80 g frisch bereitete **2 A** wurden in 30 ml wasserfr. Dioxan gelöst und diese Lösung mit 4,1 ml über KOH dest. Triäthylamin versetzt. Man ließ 10 Min. bei Zimmertemp. stehen und fügte dann 36,5 ml 2*n*-NaOH zu. Zur Verseifung der O-Acetylgruppen wurde das Gemisch 20 Min. auf 40° erwärmt. Aus dem Hydrolysat entfernten wir die Kationen über 70 ml Dowex 50-X 8 (H^+ -Form). Das Filtrat wurde sodann auf eine mit Dowex 1-X 8 (Formiat-Form; 300 ml) beschickte Säule aufgebracht. Zuerst wurde mit 6 l Wasser nachgewaschen und anschließend mit 0,4 *n*-HCOOH eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 20 ml aufgefangen. Die Fraktionen 70—120 und 170—250, welche im Resorcin-Test⁵ stark positiv reagierten, wurden bei 40° i. Vak. auf ein kleines Volumen eingedampft und dann lyophilisiert. Die Fraktionen 70—120 gaben 1,7 g eines fast farblosen Schaumharzes, das zum Großteil aus **4 A** ($R_f = 0,18$) und sehr wenig N-Acetylneuraminsäure ($R_f = 0,12$, papierchromatographischer Nachweis) bestand. Die Fraktionen 170—250 enthielten 0,89 g einer Substanz, die am Papierchromatogramm mit Natriummetaperjodat—Benzidin nicht, mit Orcin—Trichloressigsäure¹² jedoch nachweisbar

¹² A. Gottschalk, Chemistry and Biology of Sialic Acids and Related Substances, S. 61, Cambridge 1960.

war ($R_f = 0,10$). Sie lieferte mit CH_2N_2 einennicht kristallisierenden Methyl-ester und zeigte, der Oxidation mit Natriummeterjodat unterworfen, einen langsamen und unspezifischen Verbrauch des Oxidationsmittels (s. Tab. 1).

Das zum Großteil aus **4 A** bestehende Schaumharz (1,7 g) wurde in 66 ml Methanol—Wasser (10:1, v/v) gelöst. Die Lösung wurde mit wenig Aktivkohle behandelt, filtriert und portionenweise mit insgesamt 180 ml Äther versetzt. Nachdem eine amorphe Fällung abgetrennt worden war, erhielt man nach der Zugabe von weiteren 300 ml Äther 1,57 g (56% d. Th.) **4 A**. Schmp. 137—140° (Zers.), $[\alpha]_D^{23} = + 41,6^\circ$ ($c = 0,25$, H_2O).

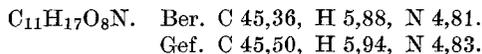


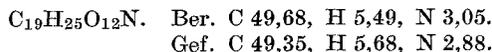
Tabelle 1. Die Farbreaktion der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure-methylester mit Resorcin⁵

	ϵ^*
2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure-methylester (5 A)	8 200
2-Deoxy-2,3-dehydro-N-glykolylnneuraminsäure-methylester (5 B)	9 500
2-Deoxy-2,3-dehydro-N-propionylneuraminsäure-methylester (5 C)	7 800
2-Deoxy-2,3-dehydro-N-butyrylnneuraminsäure-methylester (5 D)	7 500
2-Deoxy-2,3-dehydro-N-benzoylnneuraminsäure-methylester (5 E)	5 300
2-Deoxy-2,3-dehydro-N-carbobenzoxynneuraminsäure-methylester (5 F)	5 400

* Quotient aus der Extinktion der Färbung und des Molarität der zur Reaktion gebrachten 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure-methylester. Die Messungen erfolgten mit einem Zeiss PMQ II-Photometer bei 585 nm.

2-Deoxy-2,3-dehydro-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetylneuraminsäure (3 A)

0,10 g **4 A** wurden in 1 ml Pyridin (über KOH dest.) und 1,5 ml Ac_2O aufgenommen und zwei Tage bei 4° stehengelassen. Das überschüssige Essigsäureanhydrid wurde mit 5 ml Eiswasser zersetzt und die klare Lösung sodann durch eine mit Dowex 50-X 8 (H^+ -Form) beschickte Chromatographiesäule filtriert. Das im Resorcin-Test⁵ positiv reagierende Eluat wurde lyophilisiert. Es hinterblieben 160 mg einer farblosen, dünnschichtchromatographisch einheitlichen Substanz (**3 A**), $R_f = 0,49$, $[\alpha]_D^{23} = + 25,4$ ($c = 0,72$, H_2O).



2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure-methylester (5 A)

4 A (3,99 g) wurde in 100 ml absol. Methanol gelöst und mit in Äther (200 ml) gelöstem CH_2N_2 im Überschuß versetzt. Eine amorphe Fällung wurde sofort abfiltriert. Aus der klaren Lösung kristallisierten in Form von Nadeln 3,48 g **5 A** aus. Umkristallisiert wurde aus 250 ml sied. absol. Methanol. Wir erhielten 2,92 g reinen Methylester (**5 A**) (s. Tab. 2).

2-Deoxy-2,3-dehydro-N-glykolyneuraminsäure-methylester (5 B)

1,08 g frisch bereitete 2-Chlor-2-deoxy-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-(O-acetyl-glykoly)neuraminsäure (**2 B**) wurden in 10 ml wasserfr. Dioxan gelöst und mit 0,6 ml Triäthylamin (über KOH dest.) versetzt. Nachdem der Ansatz 15 Min. bei Zimmertemp. gestanden war, wurden 14 ml 1*n*-NaOH hinzugefügt und das Gemisch 15 Min. auf 40° erwärmt. Sodann wurde durch 18 ml Dowex 50-X 8 (H⁺-Form) filtriert und das Filtrat auf eine mit 120 ml Dowex 1-X 8 (Formiat-Form) beschickte Säule aufgebracht. Zuerst wurde mit 1 l Wasser nachgewaschen und dann mit 0,4*n*-HCOOH eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 20 ml aufgefangen. Im Resorcin-Test⁵ gaben die Fraktionen 50—70 eine sehr starke, die Fraktionen 120—170 eine nur schwache Farbreaktion. Die Fraktionen 50—70 wurden vereinigt und i. Vak. bei 40° auf ein kleines Volumen eingengt. Nach dem Lyophilisieren erhielten wir 0,42 g einer fast farblosen Substanz, die bei der Papierchromatographie einheitlich mit $R_f = 0,25$ (N-Glykolyneuraminsäure: $R_f = 0,18$) wanderte.

Das Lyophilisat (0,42 g) wurde nun in 8 ml absol. Methanol gelöst und mit überschüss., in Äther (20 ml) gelöstem CH₂N₂ versetzt. Eine flockige Fällung wurde abfiltriert und aus dem klaren Filtrat nach Zugabe von insgesamt 36 ml absol. Äther und 10 ml P \ddot{A} 0,267 g **5 B** erhalten. Zur Analyse wurde nochmals aus 15 ml absol. Methanol und 50 ml absol. Äther umkristallisiert; Ausb. 0,176 g (s. Tab. 2).

Analog dem Methylester der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-glykolyneuraminsäure (**5 B**) wurde aus 2-Chlor-2-deoxy-tetra-O-acetyl-N-benzoylneuraminsäure (**2 E**) der Methylester der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-benzoylneuraminsäure (**5 E**) erhalten (s. Tab. 2).

2-Deoxy-2,3-dehydro-N-carbobenzoxyneuraminsäure (4 F)

9,9 g **2 F** wurden in 300 ml wasserfr. Dioxan gelöst und mit 12,5 ml Triäthylamin versetzt. Man ließ das Gemisch 15 Min. bei Zimmertemp. stehen und erwärmte dann 30 Min. auf 40°. Durch Zugabe von 123 ml 1*n*-NaOH wurden innerhalb von 15 Min. bei 40° die O-Acetylgruppen verseift. Die Lösung wurde zur Entfernung der Kationen mit Dowex 50-X 8 (H⁺-Form; 150 ml) behandelt und sodann auf eine mit Dowex 1-X 8 (Formiat-Form; 1000 ml) beschickte Säule aufgetragen. Es wurde mit 10 l Wasser nachgewaschen und **4 F** mit 1*n*-Ameisensäure in Wasser—Alkohol (1:1, v/v) in Fraktionen zu 500 ml eluiert. Die im Resorcin-Test nach *Svennerholm*⁵ positiv reagierenden Fraktionen wurden vereinigt und im Vak. bei 40° eingedampft.

Der Eindampfrückstand, ein rötliches Harz (3,8 g), wurde in 20 ml wasserfreiem Methanol gelöst. Auf Zugabe von 200 ml wasserfr. Äther entstand eine flockige Fällung, die abfiltriert wurde. Das klare Filtrat wurde portionenweise mit insgesamt 200 ml wasserfr. Äther versetzt. Es kristallisierten 2,12 g **4 F**, die zur weiteren Reinigung zweimal aus Methanol und Äther umgelöst wurden. Nach dem Isolieren und Trocknen (bei Zimmertemp. im Vak. über P₂O₅) betrug die Ausbeute an **4 F** 1,82 g (29,2% d. Th.). Schmp. 154—157° (u. Zers.). $[\alpha]_D^{20} + 13,15^\circ$ ($c = 0,57$, H₂O). UV-Spektrum in Methanol ($c = 50$ $\mu\text{g/ml}$): λ_{max} : 242 m μ , ϵ_{max} . 5750. Dünnschichtchromatogramm: R_f 0,48.

C₁₇H₂₁O₉N. Ber. C 53,26, H 5,52, N 3,65.

Gef. C 53,37, H 5,46, N 3,66.

Aus der Mutterlauge nach der Kristallisation der **4 F** isolierten wir nach wiederholter Zugabe kleiner Volumina P \ddot{A} (insgesamt 400 ml) 576 mg eines

Tabelle 2. 2-Deoxy-2,3-dehydro-

2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acyl-neuraminsäure-methylester	Summenformel
2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure-methylester (5 A)	C ₁₂ H ₁₉ O ₈ N
2-Deoxy-2,3-dehydro-N-glykolylnneuraminsäure-methylester (5 B)	C ₁₂ H ₁₉ O ₉ N
2-Deoxy-2,3-dehydro-N-propionylneuraminsäure-methylester (5 C)	C ₁₃ H ₂₁ O ₈ N
2-Deoxy-2,3-dehydro-N-butyrylneuraminsäure-methylester (5 D)	C ₁₄ H ₂₃ O ₈ N C ₁₄ H ₂₃ O ₈ N · ½ H ₂ O
2-Deoxy-2,3-dehydro-N-benzoylneuraminsäure-methylester (5 E)	C ₁₇ H ₂₁ O ₈ N
2-Deoxy-2,3-dehydro-N-carbobenzoxyneuraminsäure-methylester (5 F)	C ₁₈ H ₂₃ O ₉ N

Kristallisates, das noch zweimal aus Methanol, Äther und *P*Ä umgelöst wurde. Ausb. 390 mg, Schmp. 163—167° (u. Zers.) Dünnschichtchromatogramm: *R_f* 0,48 und 0,52.

2-Deoxy-2,3-dehydro-N-carbobenzoxyneuraminsäure-methylester (5 F)

1,45 g **4 F** wurden in 20 ml wasserfr. Methanol gelöst und mit einer Lösung von CH₂N₂ in Äther (150 ml) versetzt. Der Methylester wurde durch Zugabe von 50 ml Äther sowie 200 ml *P*Ä zur Kristallisation gebracht. Nach dem Trocknen über P₂O₅ im Vak. bei Zimmertemp betrug die Ausb. 1,2 g (s. Tab. 2).

2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure-methylester (5 A) aus 2,4,7,8,9-Penta-O-acetyl-N-acetylneuraminsäure (1 A)

a) 0,93 g **1 A** wurden in 10 ml wasserfr. Dioxan gelöst, mit 0,85 ml über KOH dest. Triäthylamin versetzt, 3 Stdn. auf etwa 90° erwärmt und anschließend mit 20 ml 1*n*-NaOH 15 Min. bei 50° verseift. Der Ansatz wurde, wie vorstehend bei der Darstellung von **5 B** beschrieben, aufgearbeitet. Aus der amorph anfallenden **4 A** wurden durch Umsetzung mit CH₂N₂ 0,11 g Methylester (**5 A**), d. s. 20%, bezogen auf **1 A**, erhalten. Schmp. 225—227° (Zers.), [α]_D²⁵ + 42,3° ± 0,5° (*c* = 5,5, H₂O).

b) Eine Lösung von 0,98 g **1 A** in 50 ml wasserfr. Dioxan wurde 5 Stdn. auf 90° erwärmt. Nun wurde der Großteil des Lösungsmittels im Vak. bei 40° abgedampft und der Rückstand mit 30 ml 0,5*n*-NaOH zur Verseifung der O-Acetylgruppen 15 Min. auf 40° erwärmt. Aufgearbeitet wurde wie unter a) angegeben. Wir erhielten 0,14 g (27%) reinen **5 A**. Schmp. 225—227° (Zers.).

Die unter a) und b) dargestellten Methylester der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure (**5 A**) ergaben, mit dem aus kristalliner 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure (**4 A**) erhaltenen **5 A** vermischt, keine Depression des Schmelzpunktes. Die von den beiden Methylestern auf dem

N-Acylneuraminsäure-methylester

%C	%H	%N	Schmp. °C	$[\alpha]_D$ (c, in H ₂ O)	R_{NA}^1	Ausbeute %
Ber. 47,21 Gef. 47,06	6,27 6,57	4,59 4,53	225—227 Zers.	+ 41,8° ± 0,5° (8,4)	3,66	70 ²
Ber. 44,86 Gef. 44,87	5,96 6,03	4,36 4,38	169—172	+ 35,9° (3,95)	2,83	32 ³
Ber. 48,90 Gef. 48,71	6,63 6,53	4,38 4,36	171—172	+ 41,0° ± 0,3° (5,0)	3,80	19,6 ⁴
Ber. 50,45 Ber. 49,12 Gef. 49,19	6,95 7,07 7,17	4,20 4,09 4,00	163—165	+ 39,8° ± 0,4° (5,1)	4,34	15,4 ⁴
Ber. 55,58 Gef. 55,52	5,76 5,75	3,81 4,12	218—224	+ 33,7° ± 2,5° (1,0)	6,00	28,1 ³
Ber. 54,41 Gef. 54,53	5,83 5,91	3,53 3,83	187—189	+ 13,0° (0,64)	6,20	23 ³

¹ Die R_{NA} -Werte wurden am Papierchromatogramm ermittelt.

² Die Ausb. wurde auf die eingesetzte Menge 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure (4 A) bezogen.

³ Die Ausb. wurde auf die eingesetzte Menge der entsprechenden 2-Chlor-2-deoxy-tetra-O-acetyl-N-acylneuraminsäure bezogen.

⁴ Die Ausb. wurde auf die eingesetzte Menge der entsprechenden Penta-O-acetyl-N-acylneuraminsäure bezogen.

Tabelle 3. Perjodatoxidation des 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure-methylesters und eines bei der Synthese dieses Esters entstandenen Nebenproduktes

Zeitdauer (Min.) der Einwirkung des Perjodates bei 20°	NaJO ₄ -Verbrauch (Mole je Mol)	
	Methylester	Nebenprodukt
15	2,00	0,55
45	2,00	0,78
105	2,02	1,00
225	2,04	1,25

Papierchromatogramm ermittelten R_{NA} -Werte entsprachen den in Tab. 2 angeführten.

Analog der vorstehenden Vorschrift b) zur Darstellung des Methylesters der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure (5 A) aus 2,4,7,8,9-Penta-O-acetyl-N-acetylneuraminsäure (1 A) wurden die Methylester der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-propionyl-(5 C) und 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-butyrylneuraminsäure (5 D) aus den entsprechenden 2,4,7,8,9-Penta-O-acetyl-N-acylneuraminsäuren, 1 C und 1 D, erhalten (s. Tab. 2).

*Katalytische Hydrierung der Methylester der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetyl-
(5 A) und -N-glykolyneuraminsäuren (5 B)*

Die Hydrierung wurde in einer Apparatur nach *Ogg* und *Cooper*¹³ ausgeführt.

a) 59 mg Palladiumoxid (Fluka) wurden in 10,0 ml Wasser aushydriert und dann 53,8 mg **5 A** zugegeben. Nach 12 Min. bei 21° war die Wasserstoffaufnahme beendet. Die Substanz verbrauchte 3,90 ml H₂ (red. auf Normalbedingungen; errechnet 3,95 ml H₂).

b) 35 mg **5 B** (40 mg Palladiumoxid) ergab die theoret. Wasserstoffaufnahme von 2,44 ml H₂ (red. auf Normalbedingungen).

Perjodatoxidation des 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure-methylesters (5 A) und eines bei der Synthese dieses Esters entstandenen Nebenproduktes (aus Fraktionen 170—250) (s. Tab. 3).

Die Versuche wurden nach der von *Guthrie*¹⁴ beschriebenen Methode ausgeführt. 20—25 mg Substanz wurden in 10 ml Acetatpuffer (pH 4,5; 0,2*n*) gelöst, die Lösung mit 15 ml einer mit Acetat gepufferten 2,8 · 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 *Lange*¹⁵ titriert wurde. Dem Nebenprodukt wurde ein Molekulargewicht von 309 für die Berechnung des Perjodsäure-Verbrauches zugrunde gelegt.

¹³ C. L. Ogg und F. J. Cooper, Anal. Chem. **21**, 1400 (1949).

¹⁴ R. D. Guthrie, in R. L. Whistler und M. L. Wolfrom, Methods in Carbohydrate Chem., Vol. I, 435, Academic Press, 1962.

¹⁵ P. F. Fleury und J. Lange, J. pharm. chim. **17**, 107, 196 (1933).