

Die Synthese der Methoxyneuraminsäure

VON WILHELM GIELEN

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Köln (Direktor: Prof. Dr. E. Klenk) und dem Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Abteilung für Tumorforschung und experimentelle Pathologie, Köln* (Direktor: Prof. Dr. W. Tönnes)

(Der Schriftleitung zugegangen am 5. Dezember 1966)

Zusammenfassung: Aus *N*-Benzyloxycarbonyl-neuraminsäure wird über die Zwischenstufe des *N*-Benzyloxycarbonyl-neuraminsäure-methylester-methylglykosids das *N*-Benzyloxycarbonyl-neuraminsäure-methylglykosid dargestellt, das nach Hydrogenolyse in guter Ausbeute die Methoxyneuraminsäure liefert.

Summary: *N*-Benzyloxycarbonyl-neuraminic acid-methyl glycoside was prepared from *N*-benzyloxycarbonyl-neuraminic acid, via the intermediate *N*-benzyloxycarbonyl-neuraminic acid-methyl ester-methyl glycoside. The product gave a good yield of methoxyneuraminic acid by hydrogenolysis.

Ausgehend von der *N*-Benzyloxycarbonyl-neuraminsäure (I)¹, die aus *N*-Benzyloxycarbonyl-glucosamin und Oxalessigsäure-di-*tert.*-butylester, in Analogie zu der von KUHN und BASCHANG² für *N*-Acetyl-neuraminsäure ausgearbeiteten Methode, leicht darstellbar ist, synthetisierten wir in überschaubarer Reaktionsfolge die Methoxyneuraminsäure (V), das Methylglykosid der Neuraminsäure.

Zunächst wandelten wir I in absolutem Methanol bei Gegenwart von Dowex-50 (H⁺-Form)³ in das gut kristallisierende *N*-Benzyloxycarbonyl-neuraminsäure-methylester-methylglykosid (II) um, welches nach Hydrogenolyse bei Gegenwart von Pd-

Vom *N*-Benzyloxycarbonyl-neuraminsäure-methylester-methylglykosid führt ein zweiter Weg über das Neuraminsäuremethylester-methylglykosid zur Methoxyneuraminsäure.

A second route of synthesis proceeds from *N*-benzyloxycarbonyl-neuraminic acid-methyl ester-methyl glycoside, via neuraminic acid-methyl ester-methyl glycoside, to methoxyneuraminic acid.

Kohle (10% Pd) in guter Ausbeute V liefert. II kann auch zunächst zum Neuraminsäuremethylester-methylglykosid (IV) hydrogenolysiert und dann erst verseift werden. Der zuerst geschilderte Reaktionsverlauf über III nach V ist insofern vorteilhafter, als die schleppende Verdrängung der Methoxyneuraminsäure V vom Kationenaustauscher Dowex-50 (H⁺-Form) umgangen wird⁴.

Die so erhältliche Methoxyneuraminsäure stimmt in allen von uns untersuchten Eigenschaften [Drehwert, IR-Spektrum, *R_F*-Wert, Kristallisationsverhalten (Schmelzpunkt)] mit der durch Methanolyse aus Gangliosiden oder neuraminsäurehaltigen Glykoproteinen dargestellten Methoxyneuraminsäure völlig überein. Man darf annehmen, daß vor der Kondensation die Epimersierung des *N*-Benzyloxycarbonyl-glucosamins zur *manno*-Verbindung tatsächlich eingetreten ist.

Die Arbeit wurde in dankenswerter Weise durch Mittel der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT unterstützt. Den FARBWERKEN HÖCHST sei an dieser Stelle für großzügige Sachbeihilfe gedankt.

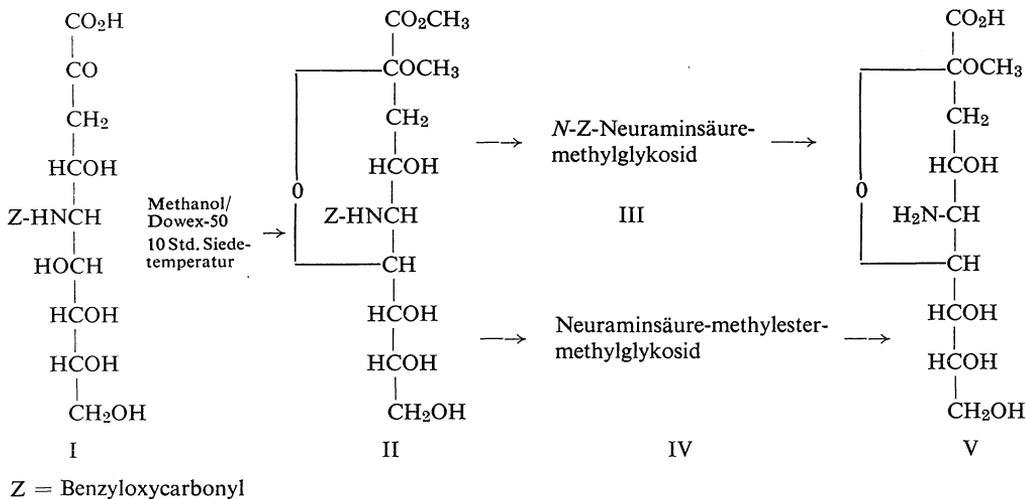
⁴ F. WEYGAND u. H. RINNO, diese Z. 306, 173 [1957].

* Postanschrift: Priv. Doz. Dr. W. GIELEN, 5 Köln-Lindenthal, Goldenfelsstraße 21.

¹ W. GIELEN; diese Z. 342, 170 [1965]; W. WESEMANN u. F. ZILLIKEN, Liebigs Ann. Chem. 695, 209 [1966]; W. GIELEN, diese Z. 348, 329 [1967].

² R. KUHN u. G. BASCHANG, Liebigs Ann. Chem. 659, 156 [1962].

³ G. BLIX, E. LINDBERG, L. ODIN u. I. WERNER; Acta Soc. med. Upsaliensis 61, 1 [1956].



Beschreibung der Versuche

N-Benzyloxycarbonyl-neuraminsäure-methylester-methylglykosid (II): 500 mg I werden in 250 ml absol. Methanol gelöst und bei Gegenwart von etwa 5 g Kationenaustauscher Dowex-50 (H⁺-Form), der wiederholt mit absol. Methanol gewaschen war, 10 Std. unter Rückfluß gekocht. Man saugt den Austauscher auf der Nutsche ab und wäscht ihn mehrmals mit Methanol. Nach dem Verdampfen des Methanols wird der Rückstand in 50 ml Wasser aufgenommen und zwecks Entfernung des nicht veresterten Anteils über eine Anionenaustauschersäule Lewatit MIH (Formiat-Form) filtriert. Das BIAL-positive Filtrat wird konzentriert und anschließend gefriergetrocknet. Kristallisation aus Äther/Methanol 2:1. Umkristallisation durch Lösen in der gerade ausreichenden Menge Methanol und Zugabe von Äther bis zur beginnenden Trübung. Nadeln vom Schmp. 191–194°. Ausb.: 385 mg, 72 % d. Th. $[\alpha]_D^{23}$: – 39,4⁰ (*c* = 0,52 in Wasser).

$C_{19}H_{27}NO_{10}$ (429,4) } Ber. C 53,14 H 6,33 N 3,26
 } Gef. C 53,14 H 6,41 N 3,26

N-Benzyloxycarbonyl-neuraminsäure-methylglykosid (III): 300 mg II werden in 50 ml Wasser gelöst. Die Lösung wird mit 0,1N NaOH auf pH 10 eingestellt und unter Rühren bei Raumtemperatur durch ständiges Zutropfen von 0,1N NaOH auf diesem pH-Wert gehalten⁵. Nach 5 Std. ist die äquivalente Menge an 0,1N NaOH (7 ml) hinzugefügt. Zur Entfernung der Na⁺-Ionen filtriert man über eine kleine Säule, gefüllt mit Dowex-50 (H⁺-Form). Das Filtrat wird gefriergetrocknet. Alle Versuche zur Kristallisation von III verliefen erfolglos.

⁵ J. D. KARKAS u. E. CHARGAFF, J. biol. Chemistry **239**, 949 [1964].

Das gefriergetrocknete Material wird unmittelbar zur Darstellung der Methoxyneuraminsäure verwendet.

Methoxyneuraminsäure (V): 260 mg des rohen Methylglykosids III werden in 50 ml Methanol gelöst und nach dem Hinzufügen von 50 mg Pd-Kohle (10% Pd) unter Durchleiten eines lebhaften Wasserstoffstromes hydrogenolysiert. Nach 20 Min. ist die Reaktion beendet, dann entweicht kein CO₂ mehr. Man filtriert vom Katalysator ab, verdampft das Methanol, nimmt den Rückstand in wenig Wasser auf und kristallisiert die Methoxyneuraminsäure (V) nach Zusatz von Äthanol. Umkristallisation aus wenig Wasser. Derbe Prismen vom Schmp. 200⁰ (unscharf). Ausb.: 154 mg (78% d. Th. bezogen auf II). $[\alpha]_D^{23}$: – 55,5⁰ (*c* = 3,3 in Wasser).

$C_{10}H_{19}NO_8$ (281,3) } Ber. C 42,70 H 6,81 N 4,98
 } Gef. C 42,55 H 6,81 N 4,79

Die Verbindung V zeigt auf dem Dünnschichtchromatogramm völlige Übereinstimmung im *R_F*-Wert mit Methoxyneuraminsäure, dargestellt aus *N*-Acetylneuraminsäure, die durch säurehydrolytische Spaltung von Gangliosiden gewonnen worden war. Cellulose MN 300, Fließmittel: *n*-Propanol/*n*-Butanol/0,1N HCl 2:1:1, Anfärbung mit 0,4proz. Ninhydrin in wassergesättigtem *n*-Butanol. Die IR-Spektren beider Verbindungen sind identisch.

Neuraminsäuremethylester-methylglykosid (IV): 300 mg II werden in methanol. Lösung, wie voranstehend beschrieben, katalytisch hydrogenolysiert. Nach 20 Min. ist die Abspaltung der Aminoschutzgruppe beendet. Man filtriert von der Pd-Kohle ab und verdampft das Lösungsmittel. Der sirupöse Rückstand des Methylglykosids IV wird unmittelbar anschließend zur Methoxyneuraminsäure V verseift.

Methoxyneuraminsäure (V):

Verbindung IV wird in 40 ml Wasser gelöst. Die wäßrige Lösung wird mit 0,1N NaOH auf pH 10 eingestellt und unter Rühren bei Raumtemperatur durch stete Zugabe von 0,1N NaOH auf pH 10 gehalten. Nach Verbrauch von einem Äquivalent der Lauge filtriert man zwecks Eliminierung der Na[⊕]-Ionen über eine Kationenaustauschersäule Dowex-50 (H[⊕]-Form). Mit viel Wasser

(6 I) kann V vom Austauscher verdrängt werden. Das BIAL-positive Eluat wird auf ein kleines Volumen eingedampft und gefriergetrocknet. Nach der Kristallisation aus Wasser/Äthanol und Umkristallisieren aus wenig Wasser erhält man 125 mg Methoxyneuraminsäure. Ausb.: 63,5% d. Th., bezogen auf II. Schmp. 199–200⁰ (unscharf). $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$: $-55,2^0$ ($c = 2,1$ in Wasser).