

ALMUTH KLEMER und KURT HOMBERG

**Über die Struktur des verzweigten Trisaccharids aus  $\beta$ -Benzyl-4.6-benzal-D-glucosid und  $\alpha$ -Acetobrom-D-glucose: 3.6-Bis- $[\beta$ -D-glucosido(1.5)]-D-glucose(1.5)**

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Münster (Westf.)

(Eingegangen am 30. März 1961)

Das bei der Umsetzung von  $\beta$ -Benzyl-4.6-benzal-D-glucosid mit 2 Moll.  $\alpha$ -Acetobrom-D-glucose erhaltene verzweigte Trisaccharid hat nicht die früher angenommene Konstitution einer 2.3-, sondern die einer 3.6-Bis- $[\beta$ -D-glucosido(1.5)]-D-glucose(1.5). Die Struktur wird durch den Abbau bewiesen. Es wird eine modifizierte Synthese beschrieben und aus den dabei erhaltenen Befunden der Reaktionsmechanismus abgeleitet.

Vor kurzem<sup>1)</sup> beschrieben wir die Synthese eines Trisaccharides mit verzweigter Struktur, bezeichnet als Trisaccharid B. Dieses wurde durch die Kondensation von  $\beta$ -Benzyl-4.6-benzal-D-glucosid (II) mit 2 Moll.  $\alpha$ -Acetobrom-D-glucose (I) gewonnen. Auf Grund des Syntheseweges ordneten wir dem Trisaccharid die Struktur einer 2.3-Bis- $[\beta$ -D-glucosido(1.5)]-D-glucose(1.5) zu. Die Methylierung mit anschließender Hydrolyse lieferte in Übereinstimmung mit der verzweigten Struktur nur zwei verschiedene Methylzucker: 2 Moll. 2.3.4.6-Tetramethyl-D-glucose und 1 Mol. einer Dimethyl-D-glucose. Die Tetramethyl-D-glucose wurde durch das kristalline Anilid identifiziert, während die Charakterisierung der vermuteten 4.6-Dimethyl-D-glucose seiner Zeit noch nicht gelang (vgl. l. c.<sup>1)</sup>, S. 1645).

Wir fanden nun in Modellversuchen, daß sich 4.6-Dimethyl-D-glucose auch im Halbmikromaßstab (20–25 mg) sehr einfach und in angemessenen Ausbeuten zu dem sehr gut kristallisierenden 4.6-Di-O-methyl-N-benzyl-N-D-glucosid umsetzen läßt. Diese Verbindung wurde von F. MICHEL und G. HAGEMANN<sup>2)</sup> im Rahmen der Darstellung aliphatischer Amadori-Produkte beschrieben.

Auch die Dimethyl-D-glucose aus dem Trisaccharid B gab — analog umgesetzt — ein kristallines N-Benzyl-N-glucosid. Überraschend zeigte sich aber, daß diese Verbindung im Schmelzpunkt und IR-Spektrum von dem erwarteten 4.6-Dimethyl-Derivat verschieden war. Der Misch-Schmelzpunkt zeigte eine starke Depression. Daß keine Amadori-Umlagerung bei unserem Di-O-methyl-N-benzyl-N-D-glucosid aus dem Trisaccharid B eingetreten war — eine solche Umlagerung erfolgt an sich sehr leicht bei Gegenwart von Spuren Säure<sup>2)</sup> —, zeigte die Einwirkung verdünnter, wäßriger Säure. Amadori-Produkte sind unter diesen Bedingungen stabil, während N-Glykoside hydrolysiert werden. Unsere Verbindung ließ sich glatt in den Ausgangszucker und Benzylamin zurücküberführen. Zudem fehlte im IR-Spektrum die für die Amadori-Produkte dieser Stoffklasse charakteristische C=O-Bande bei 1715–1725/cm. Demnach mußte die Dimethyl-D-glucose eine andere Struktur haben, und daraus folgt, daß in unserem Trisaccharid eine andere Verzweigung vorliegen muß.

<sup>1)</sup> A. KLEMER und K. HOMBERG, Chem. Ber. 93, 1643 [1960].

<sup>2)</sup> Chem. Ber. 92, 2836 [1959].

Einen Hinweis auf die richtige Struktur gab die partielle saure Hydrolyse des Trisaccharids B. Durch die chromatographische Auftrennung des erhaltenen Gemisches wurden außer D-Glucose und dem Trisaccharid die beiden Disaccharide Gentiobiose und 3- $\beta$ -D-Glucosido-D-glucose isoliert. Diese wurden in ihre kristallinen  $\beta$ -Octaacetate übergeführt, die im Schmelz- und Misch-Schmelzpunkt sowie der optischen Drehung identisch mit authentischen Proben waren.

Dieses Ergebnis zeigt eine 3.6-Verzweigung an. Die Dimethyl-D-glucose muß demnach am C-2 und C-4 statt am C-4 und C-6 veräthert sein.

Wir synthetisierten 2.4-Dimethyl-D-glucose als Modellsubstanz, ausgehend von 3- $\beta$ -D-Glucosido-D-glucose, da dieses Disaccharid bei der Synthese des Trisaccharids B in größeren Mengen als Nebenprodukt anfiel. Die bekannten Synthesen der 2.4-Dimethyl-D-glucose sind recht langwierig<sup>3)</sup>.

3- $\beta$ -D-Glucosido-D-glucose wurde zu ihrem kristallinen 6.6'-Ditrityläther umgesetzt. Die mehrfache Methylierung ergab Methyl-pentamethyl-6.6'-ditrityl-3- $\beta$ -D-glucosido-D-glucosid, und die anschließende saure Hydrolyse führte zu 2.4-Di-neben 2.3.4-Trimethyl-D-glucose. Erstere wurde durch chromatographische Auftrennung des Gemisches an einer Cellulosepulversäule frei von Trimethyl-D-glucose erhalten.

Die 2.4-Dimethyl-D-glucose lieferte in guten Ausbeuten ebenfalls ein kristallines N-Benzyl-N-glucosid. Dieses war im Schmelz- und Misch-Schmelzpunkt sowie in seinem IR-Spektrum mit dem entsprechenden Derivat der Dimethyl-D-glucose aus dem Trisaccharid B identisch. Somit ist die 3.6-Verzweigung des Trisaccharids B bewiesen.

Erwähnenswert ist, daß bisher von allen in Frage kommenden Derivaten der amorphen 2.4-Dimethyl-D-glucose nur die anomeren Methyl-glucoside kristallin sind<sup>3)</sup>. Beide Derivate dürften aber kaum zur Identifizierung sehr kleiner Mengen des Methylzuckers herangezogen werden können. Als N-Benzyl-N-glucosid kann man hingegen bequem noch sehr geringe Mengen nachweisen.

Während der Ausführung dieser Arbeiten wurde von englischer Seite<sup>4)</sup> über eine andere Synthese der 3.6-Bis-[ $\beta$ -D-glucosido]-D-glucose und deren Strukturauflösung — ebenfalls auf anderem Wege — berichtet. Dieses Produkt unterscheidet sich allerdings von unserem in der optischen Drehung. Statt einer spezif. Drehung von  $+14.4^\circ$  (Wasser) fanden wir  $+0.6^\circ$  (Wasser).

Wir haben die Reaktion von  $\beta$ -Benzyl-4.6-benzal-D-glucosid (II) mit  $\alpha$ -Acetobrom-D-glucose (I) eingehend untersucht, um eine Erklärung für die Bildung des 3.6-verzweigten Trisaccharides an Stelle der erwarteten 2.3-Bis-[ $\beta$ -D-glucosido]-D-glucose zu finden.

Wie in der vorigen Arbeit<sup>1)</sup> beschrieben, fügten wir zu II 2 Moll. I, aktiviert durch etwas Jod, in Gegenwart von Silberoxyd auf einmal zu. Dabei könnte das Reaktionsgemisch vorübergehend so sauer geworden sein, daß der Benzalrest von II oder den schon gebildeten Derivaten der 2- bzw. 3- $\beta$ -D-Glucosido-D-glucose abgespalten wird. Das Trisaccharid B könnte somit das Folgeprodukt von  $\beta$ -Benzyl-3-[ $\beta$ -D-tetraacetylglucosido]-D-glucosid oder auch von  $\beta$ -Benzyl-D-glucosid sein.

<sup>3)</sup> Advances in Carbohydrate Chem., Bd. 5, 162 [1950].

<sup>4)</sup> J. R. TURVEY und J. M. EVANS, J. chem. Soc. [London] 1960, 2366.

Gegen diese Deutung aber sprechen die gebildeten Reaktionsprodukte. Ein 2.6-verzweigtes Trisaccharid ließ sich nicht nachweisen, ebenso Gentiobiose nicht in nennenswerten Mengen. Diese beiden Oligosaccharide aber müßten als Folgeprodukte von dem benzalfreien 2- $\beta$ -D-Glucosido-D-glucose-Derivat und von  $\beta$ -Benzyl-D-glucosid ebenfalls zu erwarten sein.

Wir führten dann die Kondensation durch tropfenweises Zugeben von I zu II unter kräftigem Rühren und in Gegenwart von mehr Silberoxyd durch, um eine vorübergehende Acidität des Reaktionsgemisches stark zurückzudrängen oder gar zu verhindern. Ferner modifizierten wir die anschließende Hydrierung. Während wir früher in einem Arbeitsgang die Benzyl- und Benzalreste der Reaktionsprodukte abhydrierten, entfernten wir jetzt nur die Benzylreste ohne Schädigung der 4.6-Benzalgruppierung. Diese partielle Hydrierung erreicht man durch Verwendung von Pd-Mohr nach G. TAUSZ und N. v. PUTNOKY<sup>5)</sup>, wenn man in Tetrahydrofuran/Wasser bei genau pH 6.6–6.8 hydriert<sup>6)</sup>. Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß man nun in der Lage ist, alle noch benzalhaltigen Reaktionsprodukte zu erfassen. Im Gegensatz zu den betreffenden freien Zuckern haben sie stark vergrößerte  $R_F$ -Werte, so daß man sie gut von den letzteren unterscheiden kann. Durch Säulenchromatographie lassen sie sich bequem abtrennen.

Wir fanden folgende Reaktionsprodukte:

4.6-Benzal-D-glucose, die Benzalverbindungen der beiden Disaccharide 2- $\beta$ -D-Glucosido-D-glucose und 3- $\beta$ -D-Glucosido-D-glucose, sowie in sehr geringer Menge eine noch unbekannte Benzalverbindung, die sich ihrem  $R_F$ -Werte nach von einem Trisaccharid ableitet. Das Trisaccharid B aber wurde auch unter diesen modifizierten Bedingungen *benzalfrei* und in nahezu *gleicher* Ausbeute wie bei der Kondensation nach l.c.<sup>1)</sup> erhalten. Die freien Disaccharide 2- $\beta$ -D-Glucosido-D-glucose und 3- $\beta$ -D-Glucosido-D-glucose traten jedoch nicht auf.

Ebenso ließ sich das sonst in sehr geringer Menge auftauchende Trisaccharid A nicht mehr nachweisen.

Diese bemerkenswerten Befunde zeigen:

1. Die Bildung des Trisaccharids B wird nicht durch eine vorübergehende Acidität des Reaktionsgemisches eingeleitet, denn auch eine weitgehende Ausschaltung des Säureinflusses verringert die Ausbeute an Trisaccharid B nicht.

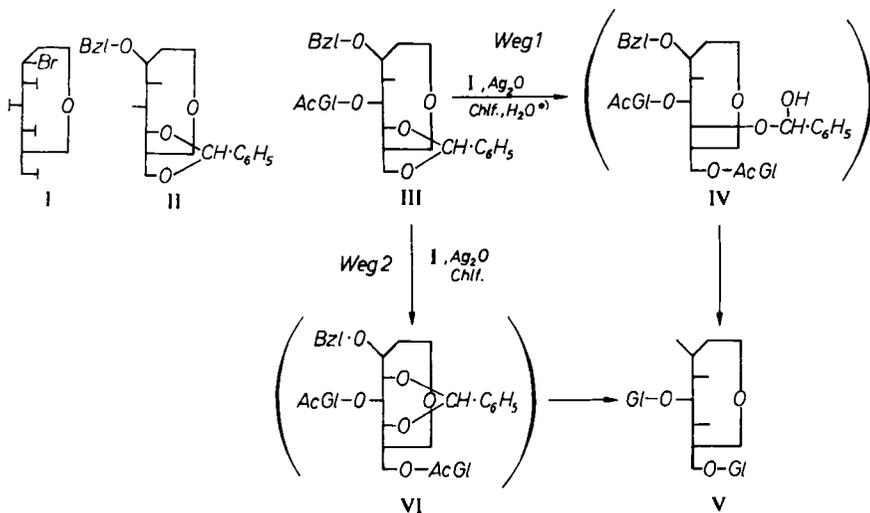
2. Die Bildung des Trisaccharids B kann nur durch den Angriff von I am C-6 des  $\beta$ -Benzyl-3-[ $\beta$ -D-tetraacetyl-glucosido]-4.6-benzal-D-glucosids unter Aufspaltung der Benzalgruppierung erfolgen. Würden die Abspaltung des Benzalrestes und die nachfolgende Kondensation *unabhängig* voneinander verlaufen, so müßte das benzalfreie Disaccharid unter den Reaktionsprodukten nachzuweisen sein.

3. Nur die  $\beta$ -Benzyl-4.6-benzal-Verbindung des 3- $\beta$ -D-Glucosido-D-glucose-Typs kann in dieser Art reagieren. Würde sich die betreffende 2- $\beta$ -D-Glucosido-D-glucose-Verbindung analog verhalten, so müßte unter den Reaktionsprodukten 2.6-Bis-[ $\beta$ -D-glucosido]-D-glucose zu finden sein und als Folgeprodukt von II müßte u. a. Gentiobiose auftreten.

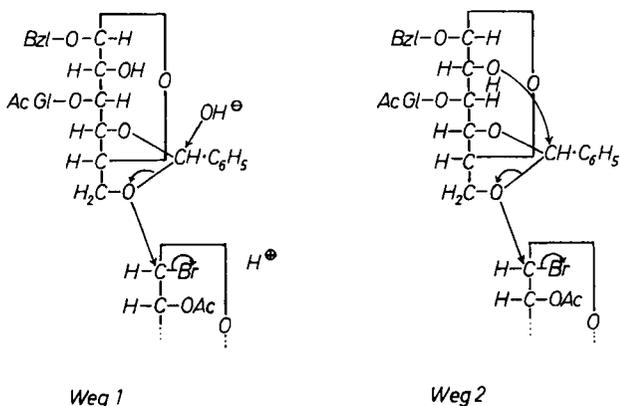
<sup>5)</sup> Ber. dtsh. chem. Ges. **52**, 1576 [1919].

<sup>6)</sup> A. KLEMER, Chem. Ber. **92**, 218 [1959].

Auf Grund dieser Aussagen halten wir die folgenden beiden Reaktionswege für die Bildung des Trisaccharids B für möglich:



Mechanismus:



Bzl = Benzyl-;      Gl =  $\beta$ -D-Glucosyl-;      AcGl = 2.3.4.6-Tetraacetyl- $\beta$ -D-glucosyl-

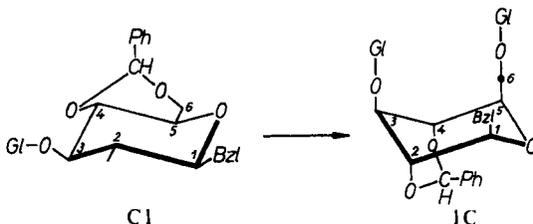
$\left| \text{---} \right|$  = Hydroxylgruppe       $\left| \text{---} \right|$  = acetylierte Hydroxylgruppe

1. Die Benzalbindung am C-6 von III wird durch I unter Ausbildung einer  $\beta$ -Glucosid-Bindung geöffnet, wobei sich unter Mitwirkung von Wasser \*) das nicht faß-

\*) Wasser ist trotz Gegenwart von wasserfreiem Calciumsulfat (Drierite) auf Grund der Reaktion von Silberoxyd mit Bromwasserstoff im Reaktionsgemisch nach KOENIGS und KNORR in kleinen Mengen vorhanden, wie z. B. die bekannte Bildung von  $\beta$ , $\beta$ -Trehalose aus  $\alpha$ -Acetobrom-D-glucose unter diesen Bedingungen zeigt.

bare Trisaccharid-Derivat IV mit einer Benzaldehyd-Halbacetal-Gruppierung bildet. Dieses geht unter Abspaltung von Benzaldehyd in das Endprodukt V über.

2. Die Öffnung der Acetalbindung am C-6 von III durch I erfolgt gekoppelt mit einer Umacetalisierung zur 2.4-Benzalverbindung VI. Wir isolierten jedoch das Trisaccharid B nur benzalfrei. Da aber eine Wanderung des Benzalrestes aus der 4.6- in die 4.2-Stellung aus sterischen Gründen nur möglich ist, wenn dabei das Molekül aus der energieärmeren C1-Konstellation in die energiereichere 1C-Konstellation übergeht, könnte VI auf Grund dieser Instabilität schon unter den Bedingungen der partiellen Hydrierung seinen Benzalrest verlieren und in V (wieder mit stabiler C 1-Anordnung) übergehen.



Wir möchten vorerst der Deutung 2. den Vorrang geben, weil sie zusätzlich erklärt, weshalb diese Reaktion am  $\beta$ -Benzyl-4.6-benzal-2-[\beta-D-glucosido]-D-glucosid nicht eintritt. (Hier ist die Wanderung des Benzalrestes in die 2.4-Stellung nicht möglich.)

Über weitere Versuche zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus wird später berichtet.

Wir danken dem KULTUSMINISTERIUM DES LANDES NORDRHEIN-WESTFALEN und dem VERBAND DER CHEMISCHEN INDUSTRIE für die Unterstützung der Arbeit.

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

### 2.4-Dimethyl-D-glucose

1. 6.6'-Ditrityl-3- $\beta$ -D-glucosido-D-glucose: 3 g 3- $\beta$ -D-Glucosido-D-glucose (i. Vak. bei 56° getrocknet) werden mit 40 ccm absol. Pyridin und 6 g Tritylchlorid versetzt und 5 Tage bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Lösung läßt man sodann in 150 ccm Eiswasser eintropfen, wobei die Ditrityl-Verbindung ausfällt. Nach 12 Stdn. dekantiert man, löst das Rohprodukt in wenig warmem Tetrahydrofuran und läßt es erneut in Eiswasser eintropfen. Nach 12 Stdn. wird das kristalline Rohprodukt abgesaugt. Umkristallisiert wird durch Lösen in 10 ccm warmem Tetrahydrofuran und Zugabe von 80 ccm Methanol. Ausb. 4.8 g (66 % d. Th.), Schmp. 146–157° (nochmaliges Umkristallisieren ergibt keine Änderung des Schmelzpunktes).  $[\alpha]_D^{25}$ : +40.6° ( $c = 2.5$ , in Tetrahydrofuran).

$C_{50}H_{50}O_{11}$  (826.9) Ber. C 72.6 H 6.09 Gef. C 71.7 H 5.89

2. Methyl-pentamethyl-6.6'-ditrityl-3- $\beta$ -D-glucosido-D-glucosid: 4.7 g des Ditrityläthers werden in 50 ccm Tetrahydrofuran gelöst und zweimal mit Dimethylsulfat und Kalilauge nach F. SMITH und H. C. SRIVASTAVA<sup>7)</sup> und anschließend zweimal in Dimethylformamid mit Methyljodid und Silberoxyd nach R. KUHN, H. TRISCHMANN und I. LÖW<sup>8)</sup> methyliert. Ausb. ca. 4.0 g Sirup (ca. 77 % d. Th.). Durch das IR-Spektrum ist keine OH-Bande nachzuweisen.

<sup>7)</sup> J. Amer. chem. Soc. 78, 1404 [1956].

<sup>8)</sup> Angew. Chem. 67, 32 [1955].

3. *Hydrolyse*: 4.0 g des permethylierten Produktes werden in 100 ccm *n* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mit einem Ultra Turrax-Gerät emulgiert und 15 Std. bei 100° hydrolysiert. Aus der Lösung werden nur 1.05 g Methylzuckergemisch gewonnen. Die vollständige Hydrolyse wird durch Lösen des Rückstandes in 38 ccm Tetrahydrofuran und Zugabe von 4 ccm 50-proz. Schwefelsäure durch 20stdg. Erhitzen unter Rückfluß erreicht. Nach dem Verdünnen mit Wasser fällt Triphenylcarbinol aus. Man erhält aus der Lösung durch die übliche Aufarbeitung weiteres Methylzuckergemisch, das mit der ersten Fraktion vereinigt wird.

Die papierchromatographische Untersuchung zeigt 2.4-Dimethyl-, 2.3.4-Trimethyl- sowie etwas Tetramethyl-D-glucose an.

4. *Isolierung der 2.4-Dimethyl-D-glucose*: Die Auftrennung des Gemisches an einer Cellulosepulversäule mit Ligroin (Sdp. 100–120°)/*n*-Butanol/Wasser (60 : 38 : 2)<sup>6)</sup> ergibt 0.68 g reine 2.4-Dimethyl-D-glucose (74.2% d. Th., bez. auf 4.0 g permethyliertes Produkt).  $[\alpha]_D^{25}$ : +61.8° (*c* = 1.24, in Methanol).

2.4-Di-O-methyl-N-benzyl-N-D-glucosid: 120 mg 2.4-Dimethyl-D-glucose werden in einem 3-ccm-Kolben mit 0.5 ccm Benzylamin auf dem Dampfbad etwa 25 Min. vorsichtig erhitzt. Nach dem Trocknen des Reaktionsgemisches im Vakuumtrockenschrank bei 35° wird ein krist. Rohprodukt erhalten, das aus Aceton umkristallisiert wird. Ausb. 68 mg (40% d. Th.), Schmp. 138–139°,  $[\alpha]_D^{25}$ : –12.2° (*c* = 0.57, in Methanol). Durch Einengen der Mutterlauge und nochmalige Umsetzung mit Benzylamin unter analogen Bedingungen werden weitere 11 mg mit gleichem Schmp. gewonnen. Gesamt-Ausb. ca. 47% d. Th.

C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>5</sub> (307.5) Ber. C 60.58 H 7.79 N 4.71 Gef. C 59.94 H 7.93 N 5.02

*Identifizierung der Dimethyl-D-glucose aus dem Undecamethyläther des Trisaccharids B als 2.4-Di-O-methyl-N-benzyl-N-D-glucosid*: 60 mg der Dimethyl-D-glucose werden, wie beschrieben, mit 0.3 ccm Benzylamin umgesetzt. Ausb. nach dem Umkristallisieren aus Aceton: 35 mg (41.2% d. Th.). Schmp. 137–138°. Schmp. Testsubstanz 138–139°. Misch-Schmp. 137–138°. Schmp. von 4.6-Di-O-methyl-N-benzyl-N-D-glucosid nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Isopropylalkohol: 117–119° (Lit.<sup>2)</sup>: 110–111°).

*Die partielle Hydrolyse des Trisaccharids B*: 400 mg 3.6-Bis-[β-D-glucosido]-D-glucose werden mit 80 ccm 0.05 *n* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 11 Std. auf 100° erhitzt. Es wird mit Bariumcarbonat neutralisiert und das Filtrat papierchromatographisch untersucht (Whatman 1, *n*-Butanol/Pyridin/Wasser (3 : 1 : 1), absteigend, 4 Tage, entwickelt mit Anilinphthalat). Es werden gefunden: D-Glucose, das unveränderte Trisaccharid sowie 2 Disaccharide, die in ihren *R<sub>F</sub>*-Werten Gentiobiose und 3-β-D-Glucosido-D-glucose entsprechen.

*Die Isolierung der beiden Disaccharide*: Das Filtrat wird auf 2–3 ccm eingeengt, mit 3 bis 4 Spatelspitzen Cellulosepulver angeteigt, getrocknet und gepulvert. Eine Cellulosepulversäule (Schleicher & Schüll, Nr. 123), Länge 35 cm, Ø 3.5 cm, wird mit 100 ccm *n*-Butanol/Pyridin/Wasser (4 : 1 : 1) vorgewaschen. Man gibt das Substanzgemisch auf die Säule und zum Abschluß noch eine dünne Schicht reines Cellulosepulver. Nun wird nach der Durchlaufmethode mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch unter dem Überdruck von 1 m Wassersäule chromatographiert. Die ablaufende Flüssigkeit wird mit Hilfe eines automatischen Fraktionssammlers in 17-ccm-Fractionen aufgefangen und papierchromatographisch ausgetestet. Frakt. 46–64: D-Glucose, Frakt. 72–120: 3-β-D-Glucosido-D-glucose, Frakt. 185 bis 237: Gentiobiose.

Das noch auf der Säule befindliche Trisaccharid wird mit *n*-Butanol/Pyridin (4 : 1), mit Wasser gesättigt, herausgewaschen. Die jeweils zusammenhängenden Fraktionen werden vereinigt und eingedampft: 54 mg 3-β-D-Glucosido-D-glucose, 72 mg Gentiobiose.

*Identifizierung der 3-β-D-Glucosido-D-glucose*: 40 mg 3-β-D-Glucosido-D-glucose werden in einem 3-ccm-Spitzkolben mit 40 mg wasserfreiem Natriumacetat und 0.4 ccm Acetanhydrid

unter häufigem Umschütteln im Verlaufe von 1 Stde. auf 100° erhitzt und 2 Stdn. bei dieser Temperatur belassen. Nach dem Abkühlen wird in 15 ccm Eiswasser eingetragen, das im Verlaufe der folgenden 5 Stdn. durch Zugabe von etwas Natriumhydrogencarbonat neutralisiert wird. Das Disaccharid-acetat wird mit Chloroform ausgeschüttelt und wie üblich aufgearbeitet. Man erhält einen dunklen Sirup, der in wenig Benzol gelöst und auf eine mit absol. Benzol vorgewaschene Magnesol/Celite-Säule<sup>9)</sup> (Länge 17 cm, Ø 1.5 cm) gebracht wird. Es wird mit 150 ccm Benzol/Äthanol (100:1) nach der Durchlaufmethode unter Verwendung eines Überdruckes einer 1-m-Wassersäule chromatographiert. Die ablaufende Flüssigkeit wird in Fraktionen von je 4 ccm aufgefangen, die durch ein speziell für Zuckeraetate entwickeltes Nachweisverfahren papierchromatographisch an Acetylpapier ausgetestet werden<sup>10)</sup>.

Röhrchen 8–11: Pentaacetyl-D-glucose, Röhrchen 18–33: 3- $\beta$ -D-Glucosido-D-glucose-octaacetat.

Aus dieser Fraktion wird nach dem Eindampfen und Verreiben des Rückstandes mit Äthanol kristalline  $\beta$ -Octaacetyl-3- $\beta$ -D-glucosido-D-glucose gewonnen, die einmal aus Äthanol umkristallisiert wird. Ausb. 17 mg, Schmp. 160.5–161.5°, Testsubstanz: 161–162°, Misch-Schmp. 160–162°.  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-27.5^\circ$  ( $c = 1$ , in Chlf.).

*Identifizierung der Gentiobiose:* 60 mg Gentiobiose werden mit 60 mg Natriumacetat und 0.6 ccm Acetanhydrid, wie vorher beschrieben, acetyliert und aufgearbeitet. Der nach dem Verdampfen des Chloroforms verbleibende Rückstand kristallisiert aus Äthanol. Das Rohprodukt wird dreimal aus Methanol umkristallisiert. Ausb. 30 mg  $\beta$ -Octaacetyl-gentiobiose, Schmp. 194–195.5°, Testsubstanz: 194–195°, Misch-Schmp. 194–195°.  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-5.2 \pm 0.2^\circ$  ( $c = 1$ , in Chlf.).

*Ermittlung der Nebenprodukte bei der Trisaccharid-B-Synthese:* 1.8 g  $\beta$ -Benzyl-4.6-benzal-D-glucosid werden, wie S. 2754 beschrieben, mit  $\alpha$ -Acetobrom-D-glucose umgesetzt, hydriert und verseift. Das erhaltene Rohprodukt wird durch zweimaliges Chromatographieren an einer Cellulosepulversäule (Länge 55 cm; Ø 3.5 cm) mit n-Butanol/Pyridin/Wasser (4:1:1) ohne Verwendung von Überdruck aufgetrennt und die Ausbeute an folgenden Stoffen bestimmt: 3- $\beta$ -D-Glucosido-D-glucose (3-Gl.-gl.), 2- $\beta$ -D-Glucosido-D-glucose (2-Gl.-gl.), Trisaccharid = 3.6-Bis- $[\beta$ -D-glucosido]-D-glucose (Tris. B) und eine unbekannte Verbindung in sehr kleiner Menge (Tris. A).

I. Auftrennung				II. Auftrennung			
Fraktion	Volumen (ccm)	Zucker	Ausb. (mg)	Fraktion	Volumen (ccm)	Zucker	Ausb. (mg)
1–31	500	—	—	1–87	1310	—	—
32–72	667	D-Glucose		88–100	195	3-Gl.-gl.	14.5
74–110	742	3-Gl.-gl.	390.7	101–160	930	2-Gl.-gl.	334.0
117–220	1510			169–342	2805	Tris. B	190.1
		3-Gl.-gl. 2-Gl.-gl. Tris. A, Tris. B	} II. Trennung			+ Tris. A (Spuren)	

3-Gl.-gl. = 405.2 mg

2-Gl.-gl. = 334.0 mg \*)

Tris. B + (Tris. A) = 190.1 mg

\*) verunreinigt durch etwas Trehalose.

<sup>9)</sup> W. H. McNEELY, W. W. BINKLEY und M. L. WOLFROM, J. Amer. chem. Soc. 67, 527 [1945].

<sup>10)</sup> F. MICHEEL und O. BERENDES, Münster 1960, Privatmittel.

*Modifizierte Synthese von Trisaccharid B*

1. *Kondensation*: 3.6 g II werden in einem braunen Kolben in 66 ccm absol. alkohol-freiem Chloroform gelöst. Nach Zugabe von 16 g Silberoxyd<sup>11)</sup> und 40 g wasserfreiem Calciumsulfat (Drierite) wird 2 Stdn. geschüttelt. Es werden 0.5 g Jod hinzugefügt und sodann im Verlaufe von 4 Stdn. eine Lösung von 8 g I in 12 ccm Chloroform unter kräftigem Rühren und unter Luftfeuchtigkeitsausschluß. Zur Vervollständigung der Reaktion wird noch 3 Tage geschüttelt. Die Aufarbeitung wird, wie l. c.<sup>6)</sup> beschrieben, vorgenommen. Ausb. 5.4 g.

2. *Die Verseifung der Acetylgruppen*: Das Produkt wird mit einem Gemisch aus 20 ccm absol. Methanol und 8 ccm *n*/<sub>10</sub> Natriummethylat versetzt, 14 Stdn. geschüttelt und i. Vak. eingedampft.

3. *Die hydrierende Abspaltung der Benzylgruppen*: Das erhaltene Reaktionsgemisch wird in 80 ccm eines Gemisches aus gereinigtem Tetrahydrofuran und Wasser (1:1) gelöst und der pH der Lösung auf 6.6—6.8 eingestellt. Diese Lösung wird mit 250 mg Pd-Mohr<sup>5)</sup> wie üblich<sup>6)</sup> hydriert. Das Filtrat wird auf pH 7 gebracht und eingedampft. Die papierchromatographische Auswertung (Whatman I, *n*-Butanol/Pyridin/Wasser (3:1:1) aufsteigend, entwickelt mit Silbernitrat) zeigt außer *D*-Glucose nur das Trisaccharid B, sowie einige nicht sauber ausgeprägte Flecken mit *R<sub>F</sub>*-Werten größer als *D*-Glucose an. In diesem Bereich liegen die 4.6-Benzalverbindungen von Mono-, Di- und Trisacchariden<sup>6)</sup>. 3-β-*D*-Glucosido-*D*-glucose und 2-β-*D*-Glucosido-*D*-glucose sind nicht nachweisbar.

4. *Die Isolierung von Trisaccharid B*: Die Auftrennung des Rohproduktes erfolgt wieder an Cellulosepulver. Als Frakt. 1 werden alle Komponenten mit *R<sub>F</sub>*-Werten größer als *D*-Glucose zusammen mit *D*-Glucose gesammelt und vereint. Dafür werden nacheinander ca. 350 ccm Ligroin (Sdp. 100—120°)/*n*-Butanol/Wasser (60:38:2) und ca. 820 ccm *n*-Butanol/Pyridin/Wasser (6:1:1) benötigt. Sodann wird mit *n*-Butanol/Pyridin/Wasser (3:1:1) weiter entwickelt und die abgelaufene Flüssigkeit mit Anilinphtalat ausgetestet. Der Nachweis bleibt negativ bis zum Auftauchen des chromatographisch reinen Trisaccharids B. Ausb. an Trisaccharid B 387 mg.

5. *Ermittlung der Komponenten der Frakt. 1*: Zur Entfernung der Benzalgruppen wird Frakt. 1 i. Vak. eingedampft und in 200 ccm absol. Methanol/Essigester (1:1) pH 5—6 mit Pd-Mohr aus PdCl<sub>2</sub> hydriert (vgl. l. c.<sup>6)</sup>).

Ein Durchlaufchromatogramm (Whatman I, *n*-Butanol/Pyridin/Wasser (3:1:1), 94 Stdn., entwickelt mit Anilinphtalat) informiert über die Zusammensetzung des erhaltenen Gemisches der nun freien Zucker. Es werden nachgewiesen: *D*-Glucose, 2-β-*D*-Glucosido-*D*-glucose und 3-β-*D*-Glucosido-*D*-glucose. Außerdem läßt sich sehr schwach eine Verbindung im Bereich der *R<sub>F</sub>*-Werte von Trisacchariden nachweisen. 605 mg dieses Gemisches werden zur Bestimmung des Ausbeuteverhältnisses 3-β-*D*-Glucosido-*D*-glucose : 2-β-*D*-Glucosido-*D*-glucose quantitativ an Cellulosepulver aufgetrennt, wobei, wie oben beschrieben, *n*-Butanol/Pyridin/Wasser (4:1:1) ohne Überdruck verwendet wird.

Fraktion	Volumen (ccm)	Zucker	Ausbeute (mg)
41—54	192	<i>D</i> -Glucose	337.5
64—81	260	3-Gl.-gl.	194.9
84—101	271	2-Gl.-gl.	82.2

Ausbeuteverhältnis: 3-Gl.-gl. : 2-Gl.-gl. = 1:0.42.

<sup>11)</sup> B. HELFERICH und W. KLEIN, Liebigs Ann. Chem. 450, 225 [1926].