

Note

1-O- α -D-Glucopyranosyl-D-fructose: Darstellung aus Saccharose und ihre Reduktion zu 1-O- α -D-Glucopyranosyl-D-glucitol*

MOHAMMAD MUNIR, BERND SCHNEIDER UND HUBERT SCHIWECK[†]

Zentral-Laboratorium, Süddeutsche Zucker-AG, Wormser Strasse 11, D-6719 Obrigheim/Pfalz (Bundesrepublik Deutschland)

(Eingegangen am 23. September 1986; angenommen in revidierter Form am 30. Dezember 1986)

Die Transglucosylierung^{1,2} von Saccharose (1) durch immobilisierte Zellen von *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77 liefert 6-O- α -D-Glucopyranosyl-D-fructose (Isomaltulose 2), aus der durch Reduktion mit Raney-Nickel ein nahezu equimolares Gemisch von 6-O- α -D-Glucopyranosyl-D-glucitol (Isomaltitol 4) und 1-O- α -D-Glucopyranosyl-D-mannitol (6) entsteht³⁻⁵. Obwohl strukturell sehr ähnlich, zeigen sich in der Konformation der Seitenkette dieser beiden Disaccharid-Alkohole Unterschiede: in 6, das als Dihydrat prächtig kristallisiert, reicht die nahezu unge störte, planare Zick-Zack-Konformation des Mannitol-Teils über die glycosidische Bindung hinweg bis in die D-Glucopyranose hinein, wobei die zwei Moleküle Wasser in einer ungewöhnlichen „Doppel-Wasser-Brücke“ über Wasserstoff-Brückenbindungen zwei Sauerstoff-Atome (O-2 und O-5 der Seitenkette) verbinden⁶; das Isomaltitol (4) dagegen kristallisiert wasserfrei und die D-Glucitol-Kette knickt am Ende ab⁷. Beide Disaccharid-Alditole haben wirtschaftliche Bedeutung als nicht kariogene⁸, kalorienarme⁹ Zuckeraustauschstoffe mit etwa der halben Süßkraft von Saccharose^{10,11}.

Wie genauere Untersuchungen der aus Saccharose durch *Protaminobacter rubrum*-Fermentation erhaltenen Lösung ergeben haben, enthält diese nicht nur Isomaltulose (2), sondern bis zu 30% deren α -D-(1 \rightarrow 1)-verknüpftes Isomer, 1-O- α -D-Glucopyranosyl-D-fructose (3). Nachdem 3 bislang nur in geringen Mengen als Ergebnis einer Hefezellen-induzierten Transglucosylierung aus Saccharose und D-Fructose nachgewiesen worden ist¹², beschreiben wir hier die Isolierung von 3 im präparativen Maßstab, die eindeutige Charakterisierung sowie die Reduktion zum α -D-(1 \rightarrow 1)-verknüpften Glucosylglucitol 8, an dem als potentielltem Zuckeraustauschstoff Interesse bestand.

*Burckhardt Helferich zum hundertsten Geburtstag.

[†]Korrespondenzautor

Die mit *Protaminobacter rubrum* als Biokatalysator auslösbare, wahrscheinlich intramolekular verlaufenden⁷ Verschiebungen des D-Glucosyl-Teils von Saccharose von O-2 nach O-6 (zu **2**) bzw. O-2 nach O-1 der Fructose (zu **3**) verläuft hoch-effizient. Nach einer Bebrütung von 24 h bei 30° enthält der Ansatz 60–65% **2** und 27–33% **3**, neben 2–5% Anteilen an D-Fructose, D-Glucose und höheren Oligomeren. Aus diesem Gemisch kann die Hauptmenge an Isomaltulose (**2**) durch Kühlungskristallisation abgetrennt werden (~50%, bez. auf Saccharose). Aus der Mutterlauge wird die α -D-Glucosyl-(1 \rightarrow 1)-D-fructose (**3**) in 32% Ausbeute rein isoliert, und zwar durch Entfernung von D-Glucose, Saccharose und D-Fructose durch Vergärung mit Bäckerhefe und nachfolgender Chromatographie zunächst an Kationenaustauschern und danach an Cellulose.

Die Titelverbindung **3** fällt als amorphes Produkt an, dessen Reinheit *via* L.c. zu 99.9% bestimmt wurde; sie zeigt einen Drehwert von +50° in Wasser, als Gemisch von Tautomeren. In Dimethylsulfoxid ist die über Integration der anomeren OH-2 Signale bestimmte¹³ Tautomerenverteilung 75% β -D-Pyranose-Form (wie durch Formel **3** repräsentiert), 12 bzw. 10% β -D-Furanose- bzw. α -D-Furanose-Formen und nur um 3% der α -D-Pyranose-Form.

Die Hydrierung von **3** in neutraler wäßriger Lösung mittels Raney-Nickel-Wasserstoff bei 120° und 12 MPa ist bereits nach 4 h beendet und liefert ein nahezu äquimolares Gemisch von **6** und **8**. Hierbei kann die Hauptmenge **6** als prächtig kristallisierendes Dihydrat zwanglos rein erhalten werden, während zur Reinisolierung des α -D-Glucosyl-(1 \rightarrow 1)-glucitols **8** Chromatographie an Cellulose erforderlich ist; es fällt als bislang amorphes Produkt mit einem Drehwert von +95.4° in Wasser an, liefert jedoch ein gut kristallisierendes Nonaacetat **9**, mit scharfem Schmelzpunkt (96.5°) und einem Drehwert von +91°. Im Vergleich zur Saccharose besitzt **8** etwa die Hälfte der Süßkraft und ein ähnliches Geschmacksbild, ist somit praktisch identisch in seinem sensorischen Verhalten mit dem Isomalt (Palatinit[®]), einem äquimolekularen Gemisch von **4** und **6**, das lebensmitteltechnologisch als Zuckeraustauschstoff verwendet werden kann¹⁰.

Über die Konformation der Glucosylalditole **4**, **6** und **8** in wässriger Lösung sollten ¹H-N.m.r.-Spektren in D₂O Auskunft geben. Allerdings liefern bei 300 MHz aufgenommene Spektren dieser Verbindungen nur begrenzte Informationen, da außer dem Signal für das anomere H-1' alle übrigen Resonanzen in einem Bereich von 0.5–0.7 p.p.m. sich weitgehend überlagern. Mit Hilfe von Aufnahmen bei 500 MHz Meßfrequenz und der Verwendung von 2-D-H,H-COSY-Spektren gelingt jedoch die Zuordnung aller Protonen (Tab. I) und die Analyse aller Kopplungskonstanten (vgl. Tab. II). In allen Fällen indizieren die $J_{1',2}$ -Werte von 3.6 bzw. 3.7 Hz naturgemäß das Vorliegen einer α -D-glucosidischen Bindung, die schon bei niedrigerer Meßfrequenz für **4** und **6** nachgewiesen wurde¹⁴. Die Kopplungen entlang des D-Glucosyl-Teils sichern die erwartete ⁴C₁ (D)-Konformation ab.

Anhand eingehender Vergleiche von Glycosylalditolen lagen von Lichtenthaler und Lindner⁷ auf der Basis röntgenstrukturanalytischer Daten bereits attraktive Vorschläge hinsichtlich der Konformation in der Seitenkette von **8** vor. Aufgrund

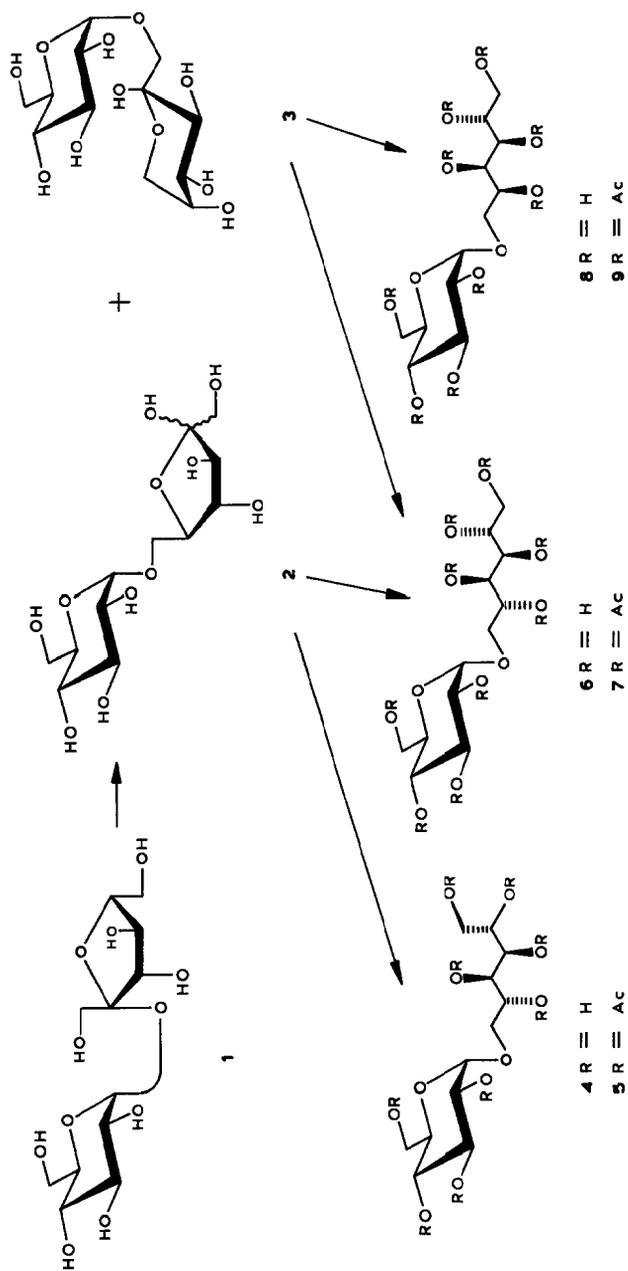


TABELLE I

¹H-N.M.R. PARAMETER DER GLUCOSYLALDITOLE 4, 6 UND 8 UND IHRER PERACETATE 5, 7 UND 9

Verb.	Lösungsm.	MHz	H-1a	H-1b	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6a	H-6b	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'	H-6'a	H-6'b
4	D ₂ O	500	3.60	3.69	3.82	3.80	3.70	3.89	3.64	3.87	4.90	3.52	3.70	3.38	3.68	3.72	3.83
5	CDCl ₃	300	4.03	4.37	5.34	5.46	5.43	5.06	3.67	3.73	5.07	4.90	5.42	5.07	4.01	4.10	4.27
5	C ₆ D ₆	300	3.90	4.27	5.28	5.38	5.36	4.98	3.51	3.57	4.93	4.80	5.55	4.98	3.89	3.96	4.14
6	D ₂ O	500	3.90	3.92	3.96	3.70	3.82	3.74	3.68	3.87	4.97	3.58	3.76	3.43	3.86	3.74	3.77
7	CDCl ₃	300	3.60	3.68	5.05	5.46	5.46	5.05	4.08	4.21	5.04	4.84	5.46	5.05	4.00	4.09	4.24
7	C ₆ D ₆	300	3.45	3.56	5.07	5.53	5.49	5.10	3.99	4.16	4.98	4.83	5.55	5.07	3.94	4.03	4.17
8	D ₂ O	500	3.58	3.90	4.03	3.91	3.69	3.78	3.66	3.84	4.95	3.57	3.75	3.42	3.72	3.77	3.87
9	CDCl ₃	300	3.66	3.84	5.07	5.40	5.52	5.15	4.17	4.22	5.05	4.87	5.45	5.07	4.03	4.08	4.27
9	C ₆ D ₆	300	3.58	3.79	5.43	5.81	5.65	5.35	4.17	4.31	5.07	5.05	5.82	5.35	4.26	4.27	4.42

TABELLE II

KOPPLUNGSKONSTANTEN (Hz) DER GLUCOSYLALDITOLE 4, 6 UND 8 UND IHRER PERACETATE 5, 7 UND 9

Verb.	Lösungsm.	MHz	J _{1a,1b}	J _{1a,2}	J _{1b,2}	J _{2,3}	J _{3,4}	J _{4,5}	J _{5,6a}	J _{5,6b}	J _{6a,6b}	J _{1',2'}	J _{2',3'}	J _{3',4'}	J _{4',5'}	J _{5',6a'}	J _{5',6b'}	J _{6a',6b'}
4	D ₂ O	500	12.0	6.0	4.0	5.6	1.9	2.4	4.2	5.2	11.9	3.6	9.8	9.8	9.2	6.0	4.0	12.0
5	CDCl ₃	300	12.2	6.7	3.6	5.3	5.8	5.5	5.4	5.3	11.0	3.7	10.3	9.4	10.1	2.4	4.3	12.4
5	C ₆ D ₆	300	12.2	3.4	6.9	4.5	4.5	4.5	5.5	5.2	11.0	3.6	10.3	9.8	9.8	2.2	4.4	12.3
6	D ₂ O	500	11.0	2.0	2.7	10.0	<1	9.0	6.2	2.8	11.7	3.7	9.8	9.2	9.5	2.2	5.2	12.2
7	CDCl ₃	300	11.5	3.7	5.2	8.2	2.6	8.2	5.2	2.6	12.6	3.7	10.2	9.6	10.2	2.2	4.4	12.4
7	C ₆ D ₆	300	11.8	3.7	5.2	9.0	2.0	9.4	5.2	2.6	12.5	3.6	10.4	9.5	10.3	2.4	4.5	12.6
8	D ₂ O	500	11.0	6.5	3.8	6.0	2.2	8.4	6.0	2.9	11.8	3.7	10.2	9.2	9.8	5.6	2.0	12.4
9	CDCl ₃	300	11.1	5.1	3.4	8.0	3.3	6.9	4.8	3.2	12.6	3.8	10.0	9.6	10.0	2.2	4.3	12.2
9	C ₆ D ₆	300	11.2	5.2	3.6	6.6	3.3	7.8	5.2	3.1	12.6	3.7	9.6	9.6	10.0	2.4	4.8	12.4

ungünstiger polarer 1,3-Wechselwirkungen zwischen den parallelstehenden OH-2 und OH-4 in einer linearen Hexitol-Kette (wie in der Formel 8 dargestellt) war zu erwarten, daß ein Abknicken der C-Kette zwischen C-2-C-3 (zur MAA-Konformation), zwischen C-3-C-4 (\rightarrow APA-Form) oder zwischen C-4-C-6 (\rightarrow AMA-Konformation) eintritt, von denen die MAA-Anordnung die wahrscheinlichste ist, denn diese Form beinhaltet zwei extendierte, sich kreuzende Zick-Zack-Sektionen in der Seitenkette⁷. Die experimentell ermittelte $J_{2,3}$ -Kopplung von 6.0 Hz, sowie der $J_{4,5}$ -Wert mit 8.4 Hz zeigen tatsächlich eine weitgehende *trans*-Anordnung der Protonenpaare H-2-H-3 bzw. H-4-H-5 an, die der MAA-Konformation entspricht. Die $J_{5,6a}$ - bzw. die $J_{5,6b}$ -Kopplungen (6.0 bzw. 2.9 Hz) zeigen weiterhin, daß auch die terminale Hydroxylgruppe einer Wechselwirkung mit OH-5 ausweicht und durch *gauche*-Orientierung die Planarität der Kette in diesem Teil fixiert. Diese Konformation erzwingt eine starke räumliche Nähe von H-1a und H-4, die infolge einer verstärkten Abschirmung auch zu hohem Feld verschoben sind (3.578 bzw. 3.690 p.p.m.), während H-1b und H-2 ungehindert sind und am weitesten Tieffeldverschoben auftreten (3.9 bzw. 4.029 p.p.m.).

Als gemeinsames Merkmal zeigen die Spektren von 4, 6 und 8 die größte Tieffeldverschiebung für das der glycosidischen Bindung benachbarte Methinproton (H-2 bzw. H-5) sowie die stets kleinere geminale Kopplung der Methylenprotonen an der glycosidischen Bindung; letzteres zeigt sich auch bei den peracetylierten Verbindungen 5, 7 und 9, was ein sicheres Indiz für die Zuordnung der Protonen im Alditolteil darstellt. Im Nonaacetat 9, von dem aufgrund des vergrößerten Bereichs der chemischen Verschiebung bereits das ¹H-N.m.r.-Spektrum bei 300 MHz nach erster Ordnung interpretierbar ist, scheint die *trans*-Stellung von H-2-H-3 ($J_{2,3}$ 8.0 Hz) in noch idealerer Weise verwirklicht zu sein. Andererseits bewirkt hier die AcO-6 ein Verdrehen um die C-5-C-6-Bindung, womit die Kopplungskonstanten der beiden CH₂-6 zu H-5 vergleichbar klein werden.

In Zusammenhang mit diesen Untersuchungen ließ sich eine weitere Frage klären, nämlich die der Natur des von Helferich und Müller¹⁵ 1973 beschriebenen, wasserfreien α -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 1)-D-mannitols, eines in Blättchen kristallisierenden Produkts vom Schmp. 122–125° und $[\alpha]_D^{20} + 87.3^\circ$ in Wasser, das gegenüber dem von uns beschriebenen wasserfreien 6 (Schmp. 173.5° und $[\alpha]_D^{20} + 90.5^\circ$ in Wasser)⁴ deutliche Unterschiede aufweist. Diese Diskrepanz erklärt sich zwanglos durch den Befund, daß Umkristallisation von wasserfreiem 6 oder seinem Dihydrat aus absol. Methanol glatt ein in dünnen Blättchen kristallisierendes Produkt liefert, das nunmehr die Helferich-Müller'schen Daten aufweist. Es handelt sich hierbei allerdings — durch ¹H-N.m.r.-Daten eindeutig belegbar — um ein 6-Monomethanolat, welches mit seinen deutlich anderen physikalischen Konstanten als eigenständige Verbindung aufgefaßt werden muß, da das Methanol derart fest an das Molekül gebunden vorliegt, daß eine Entfernung selbst bei erhöhter Temperatur im Hochvak. nicht vollständig möglich ist. Tatsächlich vermerken Helferich und Müller¹⁵ ausdrücklich die zweimalige Umkristallisation ihres Produktes aus absol. Methanol,

und mußten, da die elementaranalytischen Daten zwischen **6** und **6**-CH₃OH innerhalb der Fehlergrenzen identisch sind, verständlicherweise annehmen, **6** in der Hand zu haben, obwohl es sich um dessen Monomethanolat handelte. Diese Frage ist insofern von Bedeutung, als **6** ebenso wie sein Dihydrat als Zuckeraustauschstoff Verwendung finden¹⁰, während die Verwendung des Monomethanolats von **6** lebensmitteltechnologisch äußerst bedenklich wäre.

EXPERIMENTELLER TEIL

Allgemeine Methoden. — Die Schmelzpunkte sind unkorrigiert. ¹H-N.m.r.-Spektren wurden für Lösungen in D₂O (TSP als innerer Standard), in Di- (²H₃) methylsulfoxyd und (²H)Chloroform (jeweils internes Tetramethylsilan) mittels eines Bruker WM 300 (300 MHz) bzw. Bruker AM 500 (500 MHz)-Spektrometers aufgenommen; ¹³C-N.m.r.-Spektren (75 MHz) in D₂O (internes TSP bzw. 1,4-Dioxan). Die Reinheitsbestimmung der dargestellten Verbindungen **3** und **8** erfolgte *via* 6 MPa L.c. an Aminex-A 7-Kationenaustauscher (Ca²⁺, 0.78 × 25 cm Säulen) bei 45° und mit Wasser-Acetonitril (4:1) als Fließmittel für 20 µL Proben, deren Gesamtkonzentration an Kohlenhydraten in wäßriger Phase bei etwa 10% (w/w) lag; bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 0.4 mL/min und Detektion mit einem Differential-Refraktometer (Fa. Knauer, Berlin, Empfindlichkeitsstufe X-16) ergaben sich Retentionszeiten (min) von 9.7 (Saccharose), 10.7 (**2**), 12.8 (**3**), 14.0 (D-Glucose), 18.1 (**6**), 21.5 (**8**), 21.6 (D-Fructose), 25.6 (**4**), 34.6 (Mannitol) und 49.8 (D-Glucitol) mit Nachweisgrenzen von 0.1–0.15 mg/mL.

1-O-α-D-Glucopyranosyl-D-fructose (3). — *Herstellung des Biokatalysators.* Von einer Abimpfung des Bakterienstammes *Protaminobacter rubrum* (CBS 574.77) werden Zellen mit einem sterilen Nährsubstrat (10 mL), bestehend aus Melasse (4 kg), aus einer Zuckerfabrik, (NH₄)₂HPO₄ (50 g) und dest. Wasser (60 L), eingestellt auf pH 7.2 abgeschwemmt. Diese Suspension dient als Impfgut für die Vorkultur in 1 L-Kolben mit Nährlösung (200 mL) obiger Zusammensetzung. Nach einer Bebrütungszeit von 30 h bei 29° werden mit je 20 Kolben (Gesamtinhalt 4 L) 16 L Nährlösung obiger Zusammensetzung in einem 30 L-Kleinfemterer beimpft und bei 29° mit Luft (20 L/min) unter intensivem Rühren (350 U.p.m.) fermentiert. Die anwachsende Keimzahl wird mikroskopisch bestimmt. Nach Erreichen von Keimzahlen > 5 × 10⁹ Keimen/mL wird die Fermentation durch Abstellen der Rührung und Belüftung und Absenken der Temperatur auf 20° abgebrochen. Aus der resultierenden Fermenterbrühe werden die Zellen durch Zentrifugieren gewonnen und in einer Natriumalginate-Lösung (500 mL; 40 g Natriumalginate in 500 mL Wasser) homogen suspendiert. Diese Suspension wird durch eine 0.5 mm-Kanüle in eine langsam gerührte 2% (w/v) wäßrige CaCl₂-Lösung eingetropft. Die dabei entstehenden Kugeln aus Alginat-Gel werden mit Wasser gewaschen und bei 30° *in vacuo* (~ 10 kPa) getrocknet. In dieser Form ist der so hergestellte Biokatalysator für mehrere Monate haltbar.

Bakterielle (2→6)- und (2→1)-Transglycosylierung von Saccharose (1) zu 6-O-

α-D-Glucopyranosyl-D-fructose (2) und 3. — In einem auf 30° temperierten Rührgefäß wird eine Lösung aus Saccharose (500 g) in dest. Wasser (1167 mL; 30% w/w) vorgelegt, mit dem oben hergestellten Biokatalysator (300 g) versetzt und für 24 h langsam bei 30° gerührt. Am Ende der Reaktionszeit ist die Produktlösung frei von Saccharose und hat annähernd folgende Zusammensetzung (L.c.): 5–7% D-Fructose, 2–4% D-Glucose, 60–65% **2**, 27–33% (**3**) und 2–4% Oligomere (bezogen auf die beim Eindampfen im Hochvakuum erhaltene Trockensubstanz). Die Suspension wird durch Absaugen vom Biokatalysator befreit, das Filtrat bei 70° eingedampft bis zu einem Gehalt an Trockensubstanz von 80% und unter Zugabe von Impfkristallen von **2** in einen Kühlungskristallisor langsam auf 20° abgekühlt. Die hierbei nach Stehen über Nacht gebildeten Kristalle von **2** werden an einer Siebkorb-Zentrifuge entfernt. Die so erhaltene Mutterlauge wird auf einen Trockensubstanz-Gehalt von 85% eingedampft, mit Impfkristallen von **2** beimpft, mit dem gleichen Volumen an wasserfreiem Methanol versetzt und unter Rühren auf –4° abgekühlt. Nach Abtrennung des auskristallisierten **2** weist die Mutterlauge annähernd folgende Zusammensetzung (L.c.) auf: 11–14% D-Fructose, 5–7% D-Glucose, 23–26% **2**, 45–50% **3** und 5–7% oligomere Bestandteile. Diese Mutterlauge wird durch Eindampfen vom Methanol befreit, auf einen Gehalt von 15–20% Trockensubstanz eingestellt und bei 37° solange mit Bäckerhefe (10 g Hefe pro 100 mL Lösung) vergoren, bis in der Lösung weder Saccharose noch D-Glucose und D-Fructose mehr nachweisbar sind. Nach Abtrennung der Hefe durch Zentrifugieren wird die Lösung auf einen Gehalt von 50% Trockensubstanz eingedampft und einer chromatographischen Trennung (Trennsäule 8 × 500 cm, gefüllt mit Lewatit TSW 40-Ca²⁺; 250–400 μm; Elution mit Wasser, Fließgeschwindigkeit 3.2 cm/min; bei 60°) unterworfen. Die **3** enthaltende Fraktion mit ~85% Reinheit (L.c.) wird erneut chromatographisch getrennt [2 × 300 cm Säule gefüllt mit Whatman Cellulose CF-11; Elution mit Propanol-Ethylacetat-Wasser (7:1:2); Fließgeschwindigkeit 0.6 cm/min; bei 25°]. Das **3** enthaltende Eluat wird *in vacuo* zur Trockne eingedampft. Ausgehend von 500 g Saccharose (oder Isomaltulose **2**) erhält man so ~160 g **3** (32%) mit einer Reinheit (l.c.) von 99.9%, farbloses, amorphes Pulver (Tautomerengemisch); Schmp. 90–95°, $[\alpha]_D^{20} + 50^\circ$ (c 1, Wasser); ¹H-N.m.r. [(²H₃)Me₂SO]: δ 5.43 (s, 75%, OH-2, β-Pyranose), 5.56 (s, 12%, OH-2, β-Furanose) 5.83 (s, 10%, OH-2, α-Furanose), 6.07 (s, 3%, OH-2, α-Pyranose).

Anal. Ber. für C₁₂H₂₂O₁₁ (342.3): C, 42.11; H, 6.48. Gef.: C, 41.88; H, 6.70.

Der erhaltene Drehwert stimmt gut überein mit einem durch Hefezellen-induzierte Transglucosylierung aus Saccharose und D-Fructose erhaltenen, in geringer Menge isolierten¹² **3** ($[\alpha]_D^{22} + 49^\circ$, Wasser).

1-O-α-D-Glucopyranosyl-D-mannitol-Dihydrat (6-Dihydrat) und 1-O-α-D-Glucopyranosyl-D-glucitol (8) durch die Reduktion von 3. — In einen Autoklaven wird eine Lösung aus **3** (100 g) in Wasser (100 mL) bei pH 7 (ungepuffert) vorgelegt und mit Raney-Nickel-Suspension (5–10 g) versetzt. Die Hydrierung wird mit H₂ bei 120° und 12 MPa in ~4 h durchgeführt. Nach Abkühlung und Entfernen des Katalysators durch Zentrifugation bzw. Filtration wird die Lösung eingedampft und die

Hauptmenge von **6** durch Kühlungskristallisation als Dihydrat abgetrennt (38.5 g, 35%), Schmp. 103–125°, $[\alpha]_D^{20} + 81.5^\circ$ (*c* 1, Wasser); $^1\text{H-N.m.r.}$, siehe Tab. I und II; Lit.⁴ $^{13}\text{C-N.m.r.}$ (75 MHz; D_2O , internes 1,4-Dioxan): δ 60.78 (t, C-6'), 63.44 (t, C-6), 69.07 (t, C-1), 69.17 (d, C-3), 69.42 (d, C-2), 69.42 (d, C-5), 69.83 (d, C-4'), 71.10 (d, C-4), 71.74 (d, C-2'), 71.97 (d, C-5'), 73.34 (d, C-3'), 98.40 (d, C-1').

Die nach der Isolierung der Hauptmenge von **6**-Dihydrat verbliebene Mutterlauge wird chromatographisch an einer Whatman Cellulose CF-11 Säule (2 × 300 cm) durch Elution mit Propanol–Ethylacetat–Wasser (7:1:2) (Fließgeschwindigkeit 0.6 cm/min bei 25°) aufgetrennt. Alle Fraktionen, die **8** in einer Reinheit von 99.9% (l.c.) enthalten, werden gesammelt, während die Fraktionen mit geringerer Reinheit rechromatographiert werden. Aus den entsprechenden Eluaten wird **8** durch Gefriertrocknung als amorphes Pulver erhalten (48 g), Wassergehalt 3,37% (Karl-Fischer), Schmp. 70–75°, $[\alpha]_D^{20} + 95.4^\circ$ (*c* 1, Wasser); $^1\text{H-N.m.r.}$ (500 MHz; D_2O): siehe Tab. I und II; [300 MHz; $(^2\text{H}_3)\text{Me}_2\text{SO}$]: δ 3.08 (ddd, 1 H, $J_{4',\text{OH}}$ 5.0 Hz, H-4'), 3.15 (ddd, 1 H, $J_{1',2'}$, 3.6, $J_{2',3'}$, 9.2, $J_{2',\text{OH}}$ 7.9 Hz, H-2'), 3.2–3.8 (m, 12 H), 4.22 (d, 1 H, J 6.4 Hz, OH), 4.31 (d, 1 H, J 5.2 Hz, OH), 4.31 (t, 1 H, J 5.6 Hz, CH_2OH), 4.43 (t, 1 H, J 5.6 Hz, CH_2OH), 4.47 (d, 1 H, $J_{4',\text{OH}}$ 5.0 Hz, OH-4'), 4.52 (d, 1 H, $J_{2',\text{OH}}$ 7.9 Hz, OH-2'), 4.65 (d, 1 H, $J_{1',2'}$, 3.6 Hz, H-1'), 4.76 (d, 1 H, J 5.5 Hz, OH), 4.79 (d, 1 H, J 3.5 Hz, OH), 4.85 (d, 1 H, J 5.2 Hz, OH); $^{13}\text{C-N.m.r.}$ (D_2O , internes TSP): δ 63.26 (t, C-6'), 65.50 (t, C-6), 71.62 (t, C-1), 72.27 (d, C-4'), 72.50 (d), 73.70 (2 d), 74.12 (d), 74.23 (d, C-2'), 74.52 (d, C-5'), 75.69 (d, C-3'), 101.29 (d, C-1'); $J_{\text{C-1',H-1'}}$ 102.65 Hz.

Anal. Ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (362.3): C, 39.77; H, 7.23. Gef.: C, 39.88; H, 7.69.

2,3,4,5,6-Penta-O-acetyl-1-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl)-D-glucitol (9). — Eine Lösung von **8** (500 mg, 1.45 mmol) in einem Gemisch von wasserfreiem Pyridin (5 mL) und Acetanhydrid (1 mL) wird 24 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird *in vacuo* zur Trockne eingengt und mit Toluol (5 mL) nachdestilliert. Der Rückstand wird in Ether gelöst und chromatographisch (Merck Kieselgel 60, 70–230 mesh; Elution mit Ether) gereinigt (700 mg, 67%), Schmp. 96.5° (Chloroform–Hexan), $[\alpha]_D^{22} + 91.2^\circ$ (*c* 1, Chloroform); $^1\text{H-N.m.r.}$ (300 MHz; CDCl_3): δ 2.01, 2.04, 2.06, 2.08, 2.09, 2.09, 2.10, 2.11, 2.14 (9 s, je 3 H, 9 OAc); weitere Daten, siehe Tab. I und II.

Anal. Ber. für $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{O}_{20}$ (722.7): C, 49.86; H, 5.86. Gef.: C, 49.72; H, 6.02.

1-O- α -D-Glucopyranosyl-D-mannitol Monomethanolat (6-Methanol). — Durch zweimaliges Lösen von **6**-Dihydrat (500 mg) in wasserfreiem Methanol (je 30 mL) durch Erhitzen am Rückfluß und langsames Abkühlen erhält man dünne Blättchen (370 mg, 75%), Schmp. 120–125°, $[\alpha]_D^{20} + 86.7^\circ$ (*c* 0.2, Wasser); $^1\text{H-N.m.r.}$ [300 MHz; $(^2\text{H}_3)\text{Me}_2\text{SO}$]: δ 3.05–3.22 (m, 2 H, CH), 3.17 (d, 3 H, J 5.2 Hz, CH_3OH), 3.35–3.75 (m, 14 H, CH), 4.09 (d, 1 H, J 7.0, OH), 4.10 (q, 1 H, J 5.2 Hz, CH_3OH), 4.16 (d, 1 H, J 7.3 Hz, OH), 4.33 (t, 1 H, J 5.6 Hz, OH), 4.40 (t, 1 H, J 5.6 Hz, OH), 4.44 (d, 1 H, J 5.2 Hz, OH), 4.48 (d, 1 H, J 6.0 Hz, OH), 4.57 (d, 1 H, J 8.3 Hz, OH), 4.65 (d, 1 H, $J_{1',2'}$ 3.6 Hz, H-1'), 4.75 (d, 1 H, J 4.8 Hz, OH), 4.83 (d,

1 H, J 5.3 Hz, OH).

Anal. Ber. für $C_{12}H_{24}O_{11} \cdot CH_3OH$ (376.4): C, 41.49; H, 7.50. Gef.: C, 41.41; H, 7.47.

Die von Helferich und Müller¹⁵ für zweimal aus absol. Methanol umkristallisiertes "6-O- α -D-Glucopyranosylmannitol" — vermeintlich als wasserfreies **6** angesehen — erhaltenen elementaranalytischen Daten (C, 41.67; H, 7.17) stimmen innerhalb der Fehlergrenze sowohl mit **6** als auch mit **6**-Monomethanolat überein, so daß anhand mikroanalytischer Befunde zwischen beiden nicht unterschieden werden kann.

DANK

Wir danken Herrn Dr. J. Dabrowski (Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg) für die sachkundige Beratung und die Aufnahme der 500 MHz-¹H-N.m.r.-Spektren.

LITERATUR

- 1 SÜDDEUTSCHE ZUCKER AG (M. MUNIR, Erfinder), *Ger. Pat.* 3 213 107 (1982); *Chem. Abstr.*, 100 (1984) 66611q.
- 2 SÜDDEUTSCHE ZUCKER AG (M. MUNIR, Erfinder), *Ger. Pat.* 3 241 788 (1982); *Chem. Abstr.*, 101 (1984) 88842p.
- 3 R. WEIDENHAGEN UND S. LORENZ, *Angew. Chem.*, 69 (1957) 641; *Z. Zuckerind.*, 9 (1958) 446-450.
- 4 SÜDDEUTSCHE ZUCKER AG (H. SCHIWECK, G. STEINLE, M. MUNIR, L. MÜLLER UND W. GAU, Erfinder), *Ger. Offenl.* 2 520 173 (6. Mai 1975); *Chem. Abstr.*, 86 (1977) 140405m.
- 5 SÜDDEUTSCHE ZUCKER AG (H. SCHIWECK, G. STEINLE UND L. HABERL, Erfinder), *Ger. Pat.* 2 217 628 (12. April 1972); *Chem. Abstr.*, 80 (1974) 83527c.
- 6 H. J. LINDNER UND F. W. LICHTENTHALER, *Carbohydr. Res.*, 93 (1981) 135-140.
- 7 F. W. LICHTENTHALER UND H. J. LINDNER, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, (1981) 2372-2383.
- 8 G. GEHRING, *Z. Ernährungs-wiss., Suppl.*, 15 (1973) 16-27; E. J. KARLE UND E. GEHRING, *Dtsch. Zahnärztl. Z.*, 31 (1978) 189-191.
- 9 K. MUSCH, G. SIEBERT, H. SCHIWECK UND G. STEINLE, *Z. Ernährungs-wiss., Suppl.*, 15 (1973) 3-15; *Chem. Abstr.*, 81 (1974) 168212s; G. SIEBERT, U. GRUPP UND K. HEINKEL, *Nutr. Metab.*, 18, *Suppl.* 1 (1975) 191-196; *Chem. Abstr.*, 83 (1975) 177131h; U. GRUPP UND G. SIEBERT, *Res. Exp. Med.*, 173 (1978) 261-278; *Chem. Abstr.*, 90 (1979) 4551m.
- 10 H. SCHIWECK, *Suesswaren*, 22 (1978) 13-21; *Alimenta*, 19 (1980) 6-16; K. Paulus und A. Fricker, *Z. Lebensmitteltechnol. Verfahrenstechnik*, 31 (1980) 128-132.
- 11 F. W. LICHTENTHALER, *Dtsch. Zahnärztl. Z.*, 37 (1982) S46-S49; *Chem. Abstr.*, 97 (1982) 4112p.
- 12 G. AVIGAD, *Biochem. J.*, 73 (1959) 587-593.
- 13 B. SCHNEIDER, F. W. LICHTENTHALER, G. STEINLE UND H. SCHIWECK, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, (1985) 2443-2453.
- 14 W. GAU, J. KURZ, L. MÜLLER, E. FISCHER, G. STEINLE, U. GRUPP UND G. SIEBERT, *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 168 (1979) 125-130.
- 15 B. HELFERICH UND W. M. MÜLLER, *Chem. Ber.*, 106 (1973) 2508-2512.