

# KONFIGURATIONS- UND MUTAROTATIONSEINFLÜSSE AUF DIE $^{13}\text{C}$ -NMR SPEKTREN EINIGER DISACCHARIDE

W. VOELTER<sup>a</sup>, V. BILÍK<sup>b</sup> und E. BREITMAIER<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Chemisches Institut der Universität, D-74 Tübingen, BRD,*

<sup>b</sup> *Chemisches Institut, Slowakische Akademie der Wissenschaften, 809 33 Bratislava*

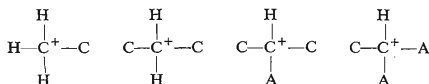
Eingegangen am 7. August 1972

Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von Mannosedisacchariden werden diskutiert. Die Signale lassen sich nach bekannten Gesetzmäßigkeiten der chemischen Verschiebung sowie unter vergleichender Heranziehung der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren der Monosaccharidkomponenten zuordnen. Die Aufnahme der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren der Disaccharidlösungen vor und nach Einstellung des Mutarotationsgleichgewichtes erleichtert die Zuordnung der Anomerensignale ( $\alpha$ - oder  $\beta$ ) wesentlich.

Ein Ziel unserer  $^{13}\text{C}$ -Resonanzmessungen an Zuckern und deren Derivaten ist, die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie zur Strukturaufklärung<sup>1-5</sup> von Zuckern aus biologischem Material einzusetzen, wie dies bereits mit anderen Meßtechniken, z. B. der Protonenresonanz<sup>6-8</sup>, der Massenspektrometrie<sup>9-11</sup>, dem Circular dichroismus<sup>12-14</sup>, dem magnetischen Circular dichroismus<sup>15,16</sup> und der optischen Rotationsdispersion<sup>17,18</sup>, praktiziert wird.

Da einfache quantenmechanische Vorausberechnungen von NMR-Spektren gegenwärtig noch nicht durchgeführt werden können, müssen die Signalzuordnungen komplizierter Moleküle durch Spektrenvergleich und anhand empirisch gefundener Regeln getroffen werden. Durch Vergleich der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren mit denen verwandter Mono- und Disaccharide, durch Messung der Resonanzen vor und nach Einstellung des Mutarotationsgleichgewichtes<sup>19</sup> und durch folgende Regeln werden die Signalzuordnungen von Disacchariden mit Mannoserest getroffen:

1. Die Resonanzen der Kohlenstoffatome  $\text{C}^+$  verschieben sich in folgender Reihe zunehmend nach tieferem Feld ( $\text{A} = \text{Heteroatom}$ )<sup>20-23</sup>:



2. Der Wechsel eines Hydroxykohlenstoffatoms zum Desoxykohlenstoffatom ist mit einer großen Hochfeldverschiebung verbunden (vgl.<sup>1</sup>); gleichzeitig verschieben sich die Signale  $\alpha$ -ständiger C-Atome im allgemeinen nach höherem Feld<sup>4,20</sup>.

3. Ringkohlenstoffatome mit Methoxygruppen absorbieren bei tieferem Feld als entsprechende mit freien Hydroxylgruppen<sup>20-24</sup>.

4. Von Ausnahmen abgesehen (z. B.  $\text{C}_{(1)}$  von  $\text{D-Mannose}$ )<sup>25</sup> absorbieren C-Atome mit axialer Hydroxylgruppe bei höherem Feld als die entsprechenden mit äquatorialer<sup>20-22</sup>.

5. Beim Wechsel eines Pyranosehydroxyls von äquatorial nach axial erfahren  $\gamma$ -ständige C-Atome mit axialem Wasserstoffatom eine Hochfeldverschiebung (sterischer Effekt, 1,3-Diaxialwechselwirkung)<sup>5,20-22</sup>.

### *Epimaltose (4-O- $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-D-mannose)*

Bisher sind nur wenig Arbeiten über  $^{13}\text{C}$ -Resonanzuntersuchungen von Disacchariden in der Literatur erschienen<sup>19,26,27</sup>. Zur Signalzuordnung werden die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von  $\text{D-Glucose}$ ,  $\text{D-Mannose}$ , Methyl- $\alpha$ - $\text{D-mannosid}$ ,  $\text{L-Rhamnose}$  und  $\text{Maltose}$  herangezogen.

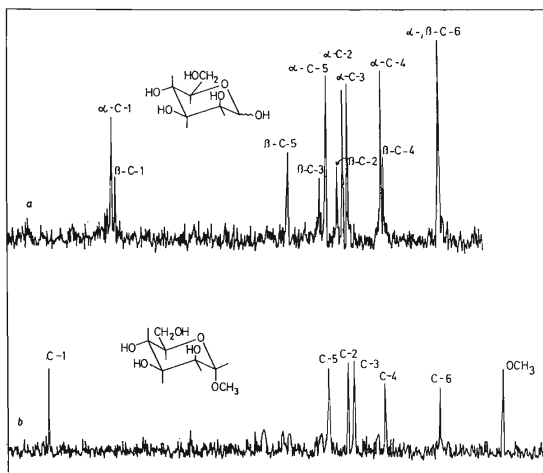


ABB. 1

### PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum

*a*  $\text{D-Mannose}$ , 110 mg/ml  $\text{D}_2\text{O}$ , 1024 Impulse, Impulsintervall 0,82 Sekunden; 12 Std. nach Ansetzen der Lösung aufgenommen; *b* Methyl- $\alpha$ - $\text{D-mannosid}$ , 105 mg/ml  $\text{D}_2\text{O}$ , 1024 Impulse, Impulsintervall 0,82 Sekunden.

Das D-Glucosespektrum ist verschiedentlich publiziert und diskutiert worden<sup>19-21</sup>. In Falle von  $\alpha$ -D-Glucose stimmen die Zuordnungen von Dormmen und Roberts<sup>20</sup> nicht mit denen von Perlin und Mitarbeitern<sup>21</sup> überein. Die zuerst genannten Autoren geben von höherem nach tieferem Feld die Signalfolge  $\alpha$ -6,  $\alpha$ -4,  $\alpha$ -3,5,  $\alpha$ -2,  $\alpha$ -1 an; die zweite Arbeitsgruppe findet die Signalfolge  $\alpha$ -6,  $\alpha$ -4,  $\alpha$ -5,  $\alpha$ -2,  $\alpha$ -3,  $\alpha$ -1 (Tab. I). Eine Entscheidung zwischen diesen beiden Zuordnungen kann erst nach Synthese und Vermessung verschiedener markierter und substituierter Glucosen getroffen werden.

Abb. 1a,b zeigt das <sup>13</sup>C-Spektrum von D-Mannose im Mutarotationsgleichgewicht (1a) und Methyl- $\alpha$ -D-mannosid (1b). Die den beiden Anomeren zugehörigen Resonanzen können auf Grund verschiedener Signalintensität leicht voneinander unterschieden werden (Abb. 1a). Durch Methylierung von C<sub>(1)</sub>-OH erfährt nur das anomere C-Atom eine drastische Tieffeldverschiebung. Auf diese Weise können die intensiven Signale von Abbild. 1a dem  $\alpha$ -Anomeren eindeutig zugeordnet werden. Die <sup>13</sup>-NMR-Untersuchungen bestätigen das Resultat von Protonenresonanz- und Drehwertmessungen<sup>8,28</sup>: Im Mutarotationsgleichgewicht ist die Konzentration an  $\alpha$ -D-Mannose höher als an  $\beta$ -D-Mannose.  $\alpha$ -C<sub>(1)</sub> mit axialer Hydroxylgruppe sollte bei höherem Feld in Resonanz treten als  $\beta$ -C<sub>(1)</sub>. Dies trifft nicht zu. Im  $\beta$ -Anomeren liegen drei Dipole auf engem Raum beieinander: Pyranose-O-C<sub>(1)</sub>, C<sub>(1)</sub>-OH und C<sub>(2)</sub>-OH. Eine solche sterische Anhäufung von Dipolen ist, dem Reeves Effekt folgend, eine instabile Molekülkonfiguration (Abb. 2). Diese drei eng benachbarten Dipole müssen auf das anomere C-Atom so einwirken, daß die Elektronendichte an C<sub>(1)</sub> erhöht wird: Der übliche sterische Verschiebungseffekt muß durch einen elektrostatischen überlagert werden. Für C<sub>(1)</sub> und C<sub>(2)</sub> trifft die unter 5 (vgl. oben) angegebene empirische Regel zu, wie der Spektrenvergleich der Anomeren und der beiden epimeren Zucker Glucose und Mannose zeigt (Abb. 3). Die getroffenen Signalzuordnungen sind Tabelle I zu entnehmen<sup>20-22</sup>. Als 6-Desoxyderivat der D-Mannose stand uns nur L-Rhamnose zur Verfügung. Obgleich die Reeves-C1-Konformation von D-Rhamnose der 1C-Konformation von L-Rhamnose entspricht, ist die axiale und äquatoriale Orientierung der Substituenten beider Enantiomere gleich (Abb. 4). Da D- und L-Rhamnose identische Atomabstände und Diederwinkel haben, kann das <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum des Mannosederivats L-Rhamnose mit dem von D-Mannose

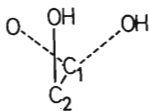


ABB. 2

Teil des Pyranosemoleküls zur Demonstration des Reeves-Effekts

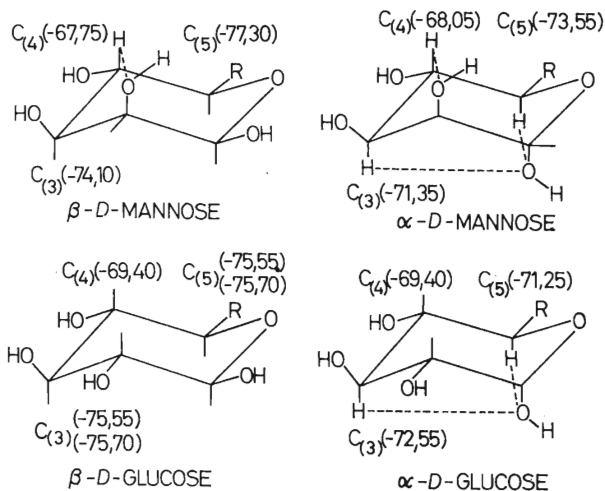


ABB. 3

Einfluß der 1,3-diaxialen Wechselwirkung auf die  $^{13}\text{C}$ -chemischen Verschiebungen von Glucose- und Mannose-Signalen

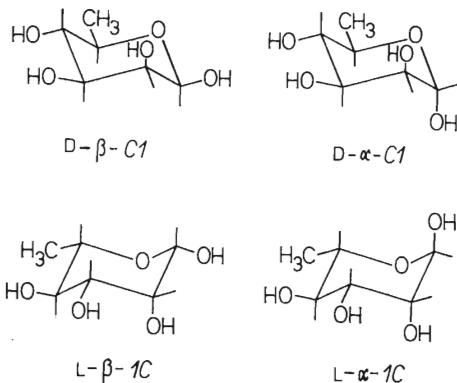


ABB. 4

$\alpha$ - und  $\beta$ -, D- und L-Rhamnose

TABELLE I

$^{13}\text{C}$ -chemische Verschiebungen von Epimaltose und verwandten Zuckern gegen Tetramethylsilan (extern  $\delta$ -Werte in p.p.m.)

Atom	D-Glucose	D-Mannose	Methyl- $\alpha$ - D-mannosid	L-Rhamnose	Maltose	Epimaltose
$\alpha\text{-C}_{(1)}$	-91,85	-95,20	-101,95	-95,10	-91,95	-93,85
$\beta\text{-C}_{(1)}$	-95,70	-94,85	—	-94,60	-95,90	-93,65
$\text{C}_{(1')}$	—	—	—	—	-99,60	-99,90
$\alpha\text{-C}_{(2)}$	-71,25	-71,85	-71,70	-71,90	-69,95 -71,30 -73,25	-71,05
$\beta\text{-C}_{(2)}$	-73,90	-72,35	—	-72,45	-74,00	-71,25
$\text{C}_{(2')}$	—	—	—	—	-72,70 -72,90	-72,70 -72,95
$\alpha\text{-C}_{(3)}$	-72,55	-71,35	-71,05	-71,05	-69,95 -71,30 -73,25	-70,80
$\beta\text{-C}_{(3)}$	-75,55 -75,70	-74,10	—	-73,85	-74,60 -76,25	-73,65
$\text{C}_{(3')}$	—	—	—	—	-72,70 -72,90	-72,70 -72,95
$\alpha\text{-C}_{(4)}$	-69,40	-69,05	-67,90	-73,30	-76,95	-75,35
$\beta\text{-C}_{(4)}$	-69,40	-67,75	—	-72,95 -73,15	-76,70	-74,75 -74,90
$\text{C}_{(4')}$	—	—	—	—	-69,40	-69,40
$\alpha\text{-C}_{(5)}$	-71,25	-73,55	-73,70	-69,40	-69,95 -71,30 -73,25	-71,85
$\beta\text{-C}_{(5)}$	-75,55 -75,70	-77,30	—	-72,95 -73,15	-74,60 -76,25	-74,75 -74,90
$\text{C}_{(5')}$	—	—	—	—	-71,70	-70,80
$\beta\text{-C}_{(6)}$	-60,60	-62,15	-62,10	17,90	-60,55 -60,80	-61,05
$\alpha\text{-C}_{(6)}$	-60,40	-62,15	—	-17,90	-60,55 -60,80	-61,05
$\text{C}_{(6')}$	—	—	—	—	-60,55 -60,80	-60,55
$\text{CH}_3, \text{OCH}_3$	—	—	-55,85	—	—	—

TABELLE II

$^{13}\text{C}$ -chemische Verschiebungen von Epilactose und verwandten Zuckern gegen Tetramethylsilan (extern,  $\delta$ -Werte in p.p.m.)

Atom	D-Galactose	Methyl- $\alpha$ -D-galactosid	Lactose	Methyl- $\beta$ -lactosid	Epilactose
$\alpha$ -C <sub>(1)</sub>	-93,50	-100,65	-91,85	—	-94,95
$\beta$ -C <sub>(1)</sub>	-97,65	—	-95,80	-104,15 -104,30	-94,85
C <sub>(1')</sub>	—	—	-103,00	-104,15 -104,30	-104,20
$\alpha$ -C <sub>(2)</sub>	-70,40 -70,55	-70,50 -70,70	-70,20	—	-71,35
$\beta$ -C <sub>(2)</sub>	-73,10	—	-73,90	-74,00	-71,80
C <sub>(2')</sub>	—	—	-71,05	-72,20	-72,15
$\alpha$ -C <sub>(3)</sub>	-69,60	-69,50	-71,20 -71,50	—	-70,20
$\beta$ -C <sub>(3)</sub>	-74,00	—	-74,45 -74,90	-75,65 -76,00	-74,90
C <sub>(3')</sub>	—	—	-72,60	-73,80	-73,70
$\alpha$ -C <sub>(4)</sub>	-70,40 -70,55	-70,50 -70,70	-78,40	—	-77,75
$\beta$ -C <sub>(4)</sub>	-69,95	—	-78,40	-79,75	-77,35
C <sub>(4')</sub>	—	—	-68,60	-69,80	-69,75
$\alpha$ -C <sub>(5)</sub>	-71,70	-71,95	-71,20 -71,50	—	-72,15
$\beta$ -C <sub>(5)</sub>	-76,35	—	-74,45 -74,90	-75,65 -76,00	-76,10
C <sub>(5')</sub>	—	—	-75,40	-76,55	-76,50
$\alpha$ -C <sub>(6)</sub>	-62,40	-62,45	-60,15	—	-61,55
$\beta$ -C <sub>(6)</sub>	-62,20	—	-60,15	-61,35	-61,55
C <sub>(6')</sub>	—	—	-61,10	-62,25	-62,30
CH <sub>3</sub> , OCH <sub>3</sub>	—	-56,30	—	-58,50	—

verglichen werden. Abb. 5 zeigt das L-Rhamnose-Spektrum vor und nach Einstellung des Mutarotationsgleichgewichts. Das uns zur Verfügung stehende Produkt war  $\alpha$ -L-Rhamnose. Abb. 5a (Aufnahme unmittelbar nach Lösen des Zuckers) zeigt sechs intensive und fünf schwache Signale. Somit können die Signalgruppen der

beiden Anomeren eindeutig voneinander unterschieden werden. Das Signal bei höchstem Feld kann nach 1) (vgl. oben)  $C_{(6)}$  zugeordnet werden. Die Resonanzen von  $\alpha$ - und  $\beta$ - $C_{(6)}$  liegen bei identischen p.p.m.-Werten (Tab. I). Das Signal von  $\beta$ - $C_{(1)}$  mit äquatorial orientierter OH-Gruppe liegt bei höherem Feld als jenes von  $\alpha$ - $C_{(1)}$  mit axialer OH-Gruppe (Ursachen vgl. unter b)).

Die Resonanzen von  $C_{(2)}$  und  $C_{(3)}$  sollten bei ähnlichen p.p.m.-Werten liegen, wie die entsprechenden von D-Mannose, bzw. Methyl-D-mannosid ( $\alpha$ - $C_{(3)}$ : -71,05,  $\alpha$ - $C_{(2)}$ : -71,90,  $\beta$ - $C_{(3)}$ : 73,85,  $\beta$ - $C_{(2)}$ : -72,45) – Unter der Annahme, daß  $C_{(5)}$  bei der Substitution des Hydroxyls an  $C_{(6)}$  von D-Mannose durch ein Wasserstoffatom eine relativ starke Hochfeld-,  $C_{(4)}$  jedoch eine relativ starke Tieffeldverschiebung erfahren, werden  $C_{(4)}$  und  $C_{(5)}$  zugeordnet. Diese Verschiebungseffekte sind bei zahlreichen Alkoholen beobachtet<sup>29</sup> worden und wurden bei der theoretischen Zuordnung von Desoxyzuckern beachtet<sup>20</sup>. Die sichere Zuordnung von  $C_{(4)}$  und  $C_{(5)}$  kann jedoch erst durch spezifisch markierte Rhamosen erfolgen (Tab. I).

Abb. 6a,b zeigt das PFT-<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum der Maltose vor (6a) und nach (6b) Einstellung des Mutarotationsgleichgewichts. Nur mutarotierte Lösungen der von uns verwendeten D-Maltose zeigen die Resonanz eines anomeren Kohlenstoffatoms

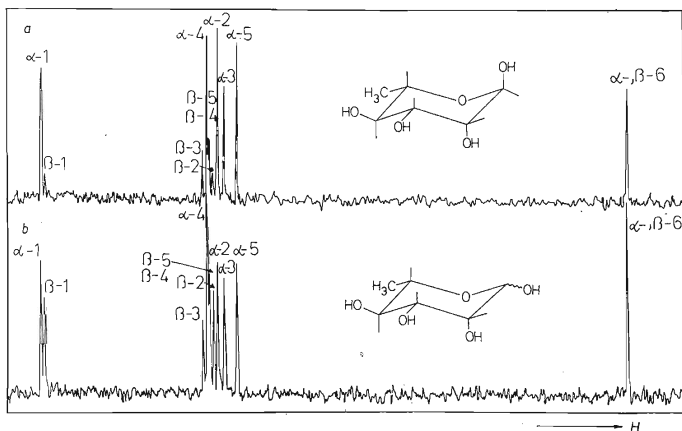


ABB. 5

PLT-<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von L-Rhamnose, 125 mg/ml D<sub>2</sub>O, Impulsintervall 0,82 Sekunden  
 a 1024 Impulse, unmittelbar nach Ansetzen der Lösung aufgenommen; b Außer 2048  
 Impulse, nach Einstellung des Mutarotationsgleichgewichts aufgenommen

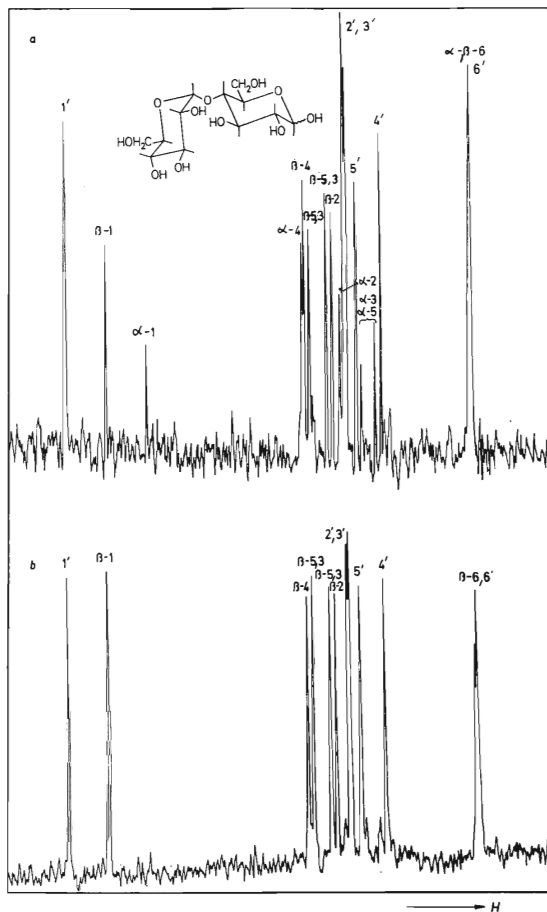


ABB. 6

PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von D-Maltose, 300 mg/1,5 ml  $\text{D}_2\text{O}$ , 4096 Impulse, Pulsintervall 0,82 Sekunden

*a* Unmittelbar nach Ansetzen der Lösung aufgenommen, *b* nach Einstellung des Mutarationsgleichgewichts.



mit axialer Hydroxylgruppe (Abb. 6b). Das von uns verwendete Disaccharid liegt daher im kristallinen Zustand als  $\beta$ -Maltose vor. Aus den Signalintensitäten kann erkannt werden, daß im Mutarotationsgleichgewicht mehr als 60%  $\beta$ -Form vorliegen. Durch Vergleich der Spektren von Glucose und Maltose jeweils vor und nach Einstellung des Mutarotationsgleichgewichts können die Signale im anomeren Bereich ( $C_{(1')}$ :  $-99,60$  p.p.m.,  $\beta$ - $C_{(1)}$ :  $-95,90$  p.p.m.,  $\alpha$ - $C_{(1)}$ :  $-91,95$  p.p.m.), von  $\alpha, \beta$ - $C_{(6)}$  bzw.  $C_{(6')}$  ( $-60,80$  und  $-60,55$  p.p.m.) und von  $C_{(4')}$  ( $-69,40$  p.p.m.),  $\beta$ - $C_{(4)}$  ( $-76,70$  p.p.m.) und  $\alpha$ - $C_{(4)}$  ( $-76,95$  p.p.m.) zugeordnet werden. Die zwischen  $-69,5$  und  $-76,5$  p.p.m. liegenden Signale können auf Grund ihrer Intensität drei verschiedenen Gruppen zugeordnet werden:

1. Am intensivsten sind die Resonanzen des nicht mutarotierenden  $\alpha$ -Glucosidrestes bei  $-71,75$  ( $C_{(5')}$ ),  $-72,70$  ( $C_{(2')}$ ,  $C_{(3')}$ ) und  $-72,90$  ( $C_{(2')}$ ,  $C_{(3')}$ ). Ordnet man die Signale zu, wie Perlin<sup>21</sup> es für  $\alpha$ -D-Glucose vorgeschlagen hat, so ergibt sich die Reihenfolge  $C_{(5')}$ ,  $C_{(2')}$ ,  $C_{(3')}$ . Die p.p.m.-Differenz zwischen  $\alpha$ - $C_{(5)}$  und  $\alpha$ - $C_{(2)}$  ist

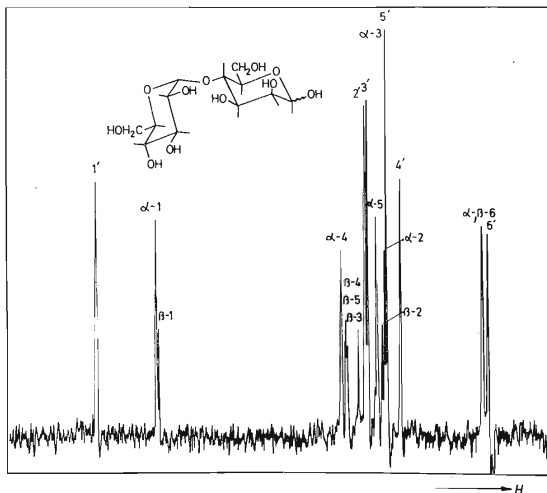


ABB. 7

PFT-<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von Epimaltose

102 mg/1,5 ml D<sub>2</sub>O, 27354 Impulse, Impulsintervall 0,82 Sekunden, nach Einstellung des Mutarotationsgleichgewichts.

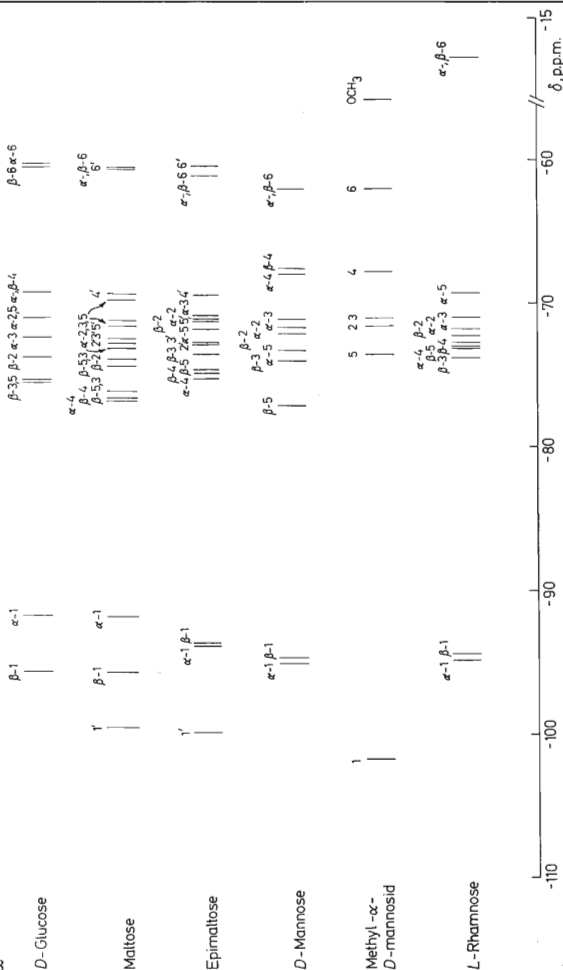


ABB. 8

$^{13}\text{C}$ -NMR-Strich-Spektren von Glucose, Maltose, Epimaltose, Mannose, Methylmannosid und Rhamnose

jedoch im Falle von Glucose nur 0,1 bis 0,2 p.p.m. Die bei Maltose auftretenden größeren Verschiebungsdifferenzen der Resonanzen von  $C_{(5)}$  und  $C_{(2)}$  lassen sich jedoch durch den Einfluß des benachbarten Glucoserestes erklären.

2. Die Signale geringster Intensität bei  $-69,95$ ,  $-71,30$  und  $-73,25$  p.p.m. sind dem  $\alpha$ -Glucoserest der Maltose zuzuordnen. Durch Vergleich mit den Spektren der  $D$ -Glucose ist jedoch die Zuordnung dieser Resonanzen nicht möglich; fest steht nur, daß diese drei Signale durch die Atome  $\alpha$ - $C_{(3)}$ ,  $\alpha$ - $C_{(2)}$  und  $\alpha$ - $C_{(5)}$  verursacht werden müssen. Dieses Beispiel zeigt, daß der Glycosidrest einen relativ starken Einfluß auf die chemische Verschiebung der Signale des mutarotierenden Zuckerteils ausüben kann. Diese vermutlich sterischen Effekte können jedoch noch nicht rationalisiert werden.

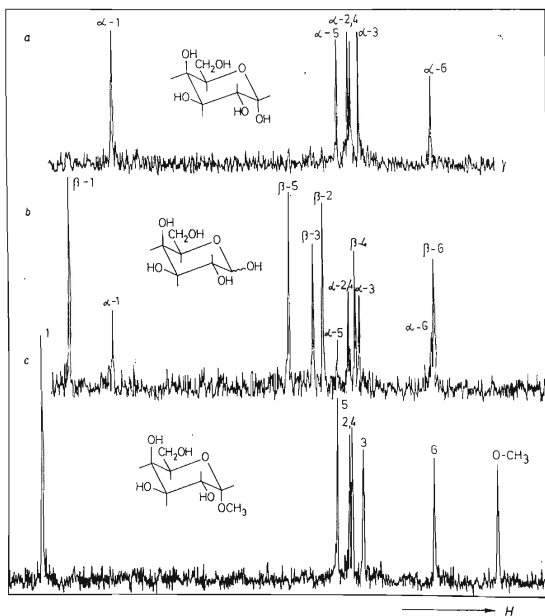


ABB. 9

$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren

*a*  $D$ -Galactose, *c* Methyl- $\alpha$ - $D$ -galactosid, 110 mg/ml  $\text{D}_2\text{O}$ , 512 Impulse, Impulsintervall 0,82 Sekunden, unmittelbar nach Ansetzen der Lösung; *b* vgl. *a* jedoch nach 3 Tagen.

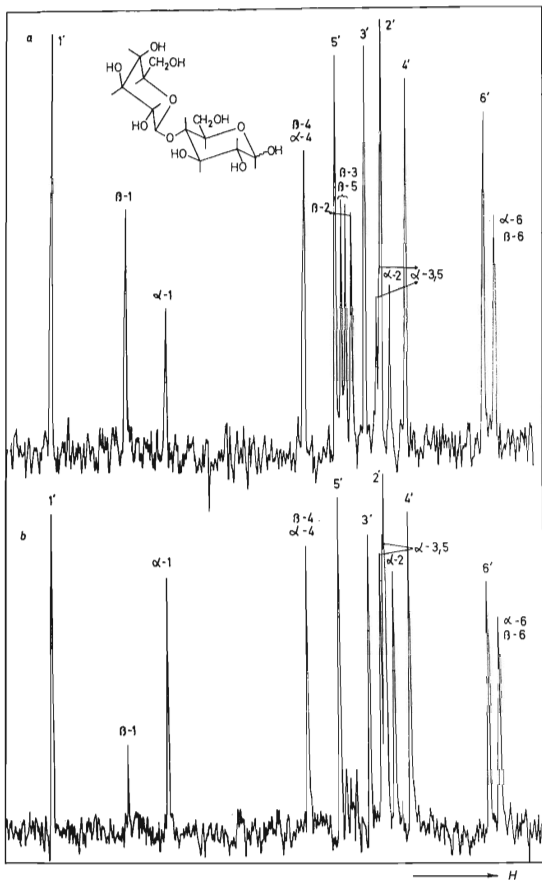
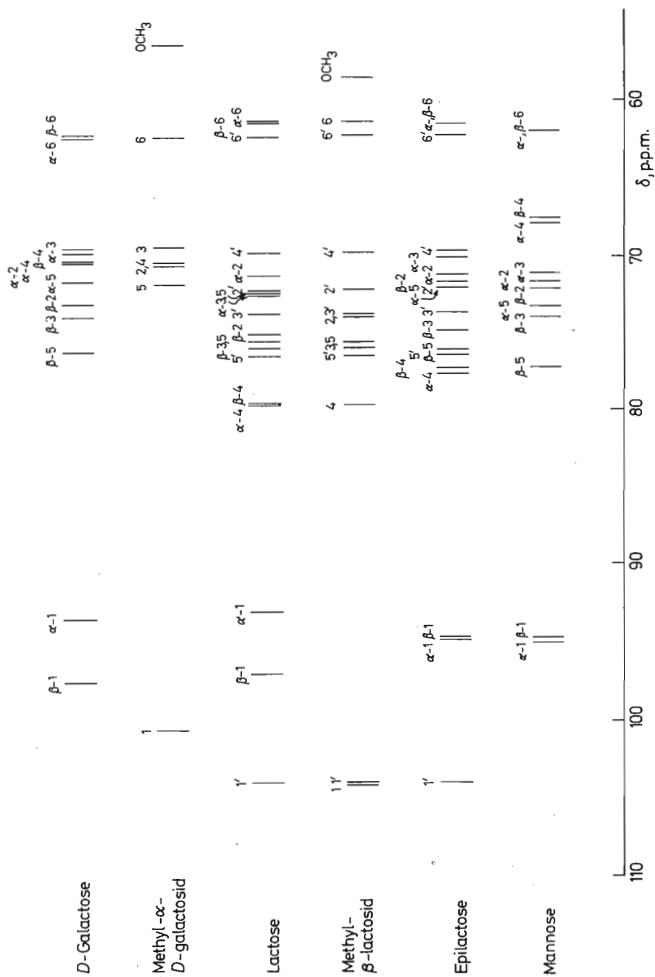


ABB. 10

$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von Lactose, gesättigte Lösung, 8192 Impulse, Impulsintervall 0,82 Sekunden  
*a* Unmittelbar nach Ansetzen der Lösung; *b* Nach 3 Tagen.



3. Übrig bleiben schließlich noch drei Resonanzen des  $\beta$ -Glucoserestes der Maltose. Sie haben mittlere Signalintensität und liegen bei  $-76,25$ ,  $-74,60$  und  $-74,00$  p.p.m. Ordnet man die Signale analog zu denen von Glucose zu<sup>21</sup>, so ergibt sich die Reihenfolge von höherem nach tieferem Feld:  $\beta$ -2,  $\beta$ -3,5. Auch hier bewirkt der Glucosidrest eine stärkere Signaltrennung der Resonanzen von  $\beta$ -C<sub>(3)</sub> und  $\beta$ -C<sub>(5)</sub>.

Abb. 7 zeigt das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Epimaltose. Die Signalzuordnung erfolgt durch Vergleich der oben angeführten Spektren mit dem Spektrum von Epimaltose. Da der Glucoserest nicht mutarotieren kann, liefern seine C-Atome die intensivsten Signale im Spektrum, die sich durch Vergleich mit den Spektren von D-Glucose und Maltose von höherem nach tieferem Feld zuordnen lassen (auch hier gelten dieselben Einschränkungen wie bei der Diskussion der Maltose angegeben): C<sub>(6')</sub> ( $-60,55$  p.p.m.), C<sub>(4')</sub> ( $-69,40$  p.p.m.), C<sub>(5')</sub> ( $-70,80$  p.p.m.), C<sub>(2')</sub>, C<sub>(3')</sub> ( $-72,70$ ,  $-72,95$  p.p.m.) und C<sub>(1')</sub> ( $-99,90$  p.p.m.). Wie das D-Mannosespektrum (Abb. 1a) zeigt, sind im Mutarotationsgleichgewicht die Resonanzen des  $\alpha$ -Anomeren wesentlich intensiver. Dasselbe trifft für die Signale des mutarotierenden Mannoserestes des Disaccharids Epimaltose zu. Die alle anderen Signale überragende Resonanz bei  $-70,80$  p.p.m. wird vermutlich durch zwei Kohlenstoffatome verursacht. Nimmt man an, daß außer für C<sub>(4)</sub> die Kohlenstoffatome von Mannose und vom Mannoserest der Epimaltose gleiche Signalfolgen haben, dann ergibt sich von höherem nach tieferem Feld folgende Signalzuordnung:  $\alpha$ -C<sub>(3)</sub> ( $-70,80$  p.p.m.),  $\alpha$ -C<sub>(2)</sub> ( $-71,05$  p.p.m.),  $\beta$ -C<sub>(2)</sub> ( $-71,25$  p.p.m.),  $\alpha$ -C<sub>(5)</sub> ( $-71,85$  p.p.m.),  $\beta$ -C<sub>(3)</sub> ( $-73,65$  p.p.m.),  $\beta$ -C<sub>(4')</sub>,  $\beta$ -C<sub>(5)</sub> ( $-74,75$  /  $-74,90$  p.p.m.),  $\alpha$ -C<sub>(4)</sub> ( $-75,35$  p.p.m.),  $\beta$ -C<sub>(1)</sub> ( $-93,65$  p.p.m.) und  $\alpha$ -C<sub>(1)</sub> ( $-93,85$  p.p.m.). Es sei nochmals betont, daß diese Zuordnung nur unter der oben angeführten Voraussetzung gültig ist. Die Signale des  $\beta$ -Mannoserestes können an ihrer geringen Signalintensität erkannt werden. Tabelle I und Abb. 8 zeigen die durch den Vergleich mit  $\beta$ -D-Mannose getroffenen Zuordnungen. Da der Mannoserest über C<sub>(4)</sub> mit dem Glucoserest verknüpft ist, zeigen  $\alpha$ - und  $\beta$ -C<sub>(4)</sub> gegenüber C<sub>(4)</sub> von Mannose die erwartete Tieffeldverschiebung von 7–10 p.p.m.<sup>27</sup>.

### *Epilactose*

Abb. 9 zeigt die PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von Galactose und Methyl- $\alpha$ -D-galactosid. Selbst nach einer Akkumulationszeit von 512 Impulsen können nur die Signale des uns zur Verfügung stehenden Anomeren erkannt werden (Abb. 9a). Nach drei Tagen sind die Signale des durch Mutarotation entstehenden neuen Anomeren

#### Abb. 11

$^{13}\text{C}$ -NMR-Strich-Spektren von Galactose, Methyl- $\alpha$ -D-galactosid, Lactose, Methyl- $\beta$ -lactosid, Epilactose und Mannose

wesentlich intensiver als die zuerst aufgetretenen Resonanzen. Da im Anomerenbereich das neu entstehende Signal um mehr als 4 p.p.m. bei tieferem Feld liegt, muß unser Ausgangsmaterial  $\alpha$ -D-Galactose sein. Im Mutarotationsgleichgewicht muß auf Grund der Signalintensitäten mehr als 60%  $\beta$ -D-Galactose vorliegen. Dies stimmt mit Protonenresonanzmessungen überein<sup>8</sup>. Eindeutig können auch die Resonanzen von  $\alpha$ -C<sub>(6)</sub> und  $\beta$ -C<sub>(6)</sub> auf Grund der Intensitätsunterschiede zugeordnet werden (vgl. Tab. II). Bei der Zuordnung der übrigen Signale herrscht in der Literatur<sup>20,21,27</sup> nur Übereinstimmung für  $\beta$ -C<sub>(5)</sub>,  $\beta$ -C<sub>(3)</sub>,  $\beta$ -C<sub>(2)</sub> und  $\alpha$ -C<sub>(5)</sub>.

Für die noch fehlenden Signale geben<sup>20,27</sup> von höherem nach tieferem Feld die Reihenfolge  $\alpha$ -C<sub>(3)</sub>,  $\beta$ -C<sub>(4)</sub>,  $\alpha$ -C<sub>(2)</sub>/ $\alpha$ -C<sub>(4)</sub>, Perlin und Mitarbeiter<sup>21</sup> die Reihenfolge  $\alpha$ -C<sub>(4)</sub>,  $\alpha$ -C<sub>(2)</sub>/ $\alpha$ -C<sub>(3)</sub>,  $\beta$ -C<sub>(4)</sub> an. Wie Abb. 9b zeigt, ist das zweite Signal dieser Vierergruppe am intensivsten und muß zur  $\beta$ -Anomerengruppe gehören; es kann außerdem kein Doppelsignal sein, wie dies von Perlin<sup>21</sup> und Mitarbeitern angenommen wird: Die Resonanz von  $\beta$ -C<sub>(4)</sub> (vgl. Abb. 9b) fehlt im Spektrum der  $\alpha$ -D-Galactose (vgl. Abb. 9a); im Resonanzbereich dieser Vierergruppe kann aber höchstens ein Signal des  $\beta$ -Anomeren liegen. Daher übernehmen wir in dieser Arbeit die in<sup>20,27</sup> angegebene Signalfolge, obgleich erst durch die Synthese und Messung spezifisch <sup>13</sup>C- oder <sup>2</sup>H-angereicherte Galactosen eindeutige Zuordnungen getroffen werden können.

Die Interpretation des <sup>13</sup>C-NMR-Spektrums von Lactose wurde kürzlich von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen publiziert<sup>26,27</sup>. Die Zuordnungen wurden durch Spektrenvergleich, Berücksichtigung unterschiedlicher Signalintensitäten und Aufnahmen vor und nach Einstellung des Mutarotationsgleichgewichts<sup>19</sup> getroffen (Tab. II). Während die Signale von Methyl- $\beta$ -lactosid von beiden Arbeitsgruppen gleich zugeordnet worden sind (vgl. Tab. II), wurden die Lactosesignale C<sub>(2)</sub>,  $\alpha$ -C<sub>(2)</sub>,  $\alpha$ -C<sub>(5)</sub>, C<sub>(3)</sub> und  $\alpha$ -C<sub>(3)</sub> verschieden interpretiert. Korrelationen mit zwei verschiedenen Zuordnungen der Signale des Glucosespektrums<sup>20,21</sup> können Grund für diese Diskrepanz sein. Durch Vergleich mit dem nach Perlin und Mitarbeiter<sup>21</sup> interpretierten D-Glucosespektrum möchten wir für die oben angegebenen fünf Signale von höherem nach tieferem Feld folgende Zuordnung treffen: Die beiden Signale höchster Intensität müssen dem Galactoserest zugeordnet werden. Durch Vergleich mit  $\beta$ -D-Galactose (vgl. oben) wird das Signal bei höherem Feld C<sub>(2)</sub>, und das bei tieferem Feld C<sub>(3)</sub>, zugeordnet (vgl. Tab. II und Abb. 10). Neben dem Peak von C<sub>(2)</sub> liegt in Richtung Standard ein Signal und zwischen den Resonanzen von C<sub>(2)</sub> und C<sub>(3)</sub> liegen zwei weitere Peaks, deren Intensitäten nach Einstellung des Mutarotationsgleichgewichts abnehmen, also eindeutig dem  $\alpha$ -D-Glucoserest zuzuordnen sind (vgl. Abb. 10a und 10b). Durch Vergleich mit dem D-Glucosespektrum folgt, daß das durch  $\alpha$ -C<sub>(2)</sub> und  $\alpha$ -C<sub>(5)</sub> verursachte Doppelsignal dieses Monosaccharids im Disaccharid Maltose aufspalten muß.

Da gegenüber der Glucose im Glucopyranosylrest der Lactose das  $\alpha$ -C<sub>(3)</sub> und  $\alpha$ -C<sub>(5)</sub> benachbarte  $\alpha$ -C<sub>(4)</sub> mit einem Galactopyranosylrest verknüpft ist, sollte erwartungs-

gemäß im Disaccharid die Resonanzlage von  $\alpha\text{-C}_{(2)}$  kaum, dagegen die von  $\alpha\text{-C}_{(5)}$  stärker verschoben sein. Entsprechend möchten wir für die fünf, bisher noch nicht sicher zugeordneten Signale von höherem nach tieferem Feld folgende Reihenfolge vorschlagen:  $\alpha\text{-C}_{(2)}$ ,  $\text{C}_{(2')}$ ,  $\alpha\text{-C}_{(3)}/\alpha\text{-C}_{(5)}$ ,  $\text{C}_{(3')}$ . Obgleich erst die Messung spezifisch isotopenmarkierter Verbindungen eine eindeutige Zuordnung zuläßt, kann aus Abb. 9a und 9b entnommen werden, daß im Gegensatz zu den früheren Arbeiten<sup>26</sup> zwei Signale von C-Atomen des  $\alpha\text{-D}$ -Glucoserestes zwischen den Resonanzen von  $\text{C}_{(3')}$  und  $\text{C}_{(2')}$  liegen, und ein Signal bei höherem Feld erscheint; daher ist die in<sup>26</sup> angegebene Reihenfolge  $\text{C}_{(2')}$ ,  $\alpha\text{-C}_{(2)}/\alpha\text{-C}_{(5)}$ ,  $\text{C}_{(3')}$ ,  $\alpha\text{-C}_{(3)}$  sicherlich nicht korrekt.

Die Zuordnung bei Epilactose erfolgt analog wie oben unter Epimaltose und Lactose besprochen und aus den Strichspektren von Abb. 11. Die Signale des nicht mutarotierenden Galactoserestes können an ihrer großen Intensität erkannt werden. Unter der Voraussetzung, daß die C-Atome in  $\beta\text{-D}$ -Galactose und im  $\beta\text{-D}$ -Galactopyranosylrest von Epilactose gleiche Signalfolgen haben, erfolgt die Zuordnung:  $\text{C}_{(6')}$  ( $-62,30$  p.p.m.),  $\text{C}_{(4')}$  ( $-69,75$  p.p.m.),  $\text{C}_{(2')}$  ( $-72,15$  p.p.m.),  $\text{C}_{(3')}$  ( $-73,70$  p.p.m.),  $\text{C}_{(5')}$  ( $-76,50$  p.p.m.) und  $\text{C}_{(1')}$  ( $-104,20$  p.p.m.). Die Signalzuordnung für den mutarotierenden Mannoserest erfolgt nach den bei der Diskussion der Epimaltose angegebenen Kriterien:  $\alpha$ -,  $\beta\text{-C}_{(6)}$  ( $-61,55$  p.p.m.),  $\alpha\text{-C}_{(3)}$  ( $-70,20$  p.p.m.),  $\alpha\text{-C}_{(2)}$  ( $-71,35$  p.p.m.),  $\beta\text{-C}_{(2)}$  ( $-71,80$  p.p.m.),  $\alpha\text{-C}_{(5)}$  ( $-72,15$  p.p.m.),  $\beta\text{-C}_{(3)}$  ( $-74,90$  p.p.m.),  $\beta\text{-C}_{(5)}$  ( $-76,10$  p.p.m.),  $\beta\text{-C}_{(4)}$  ( $-77,35$  p.p.m.) und  $\alpha\text{-C}_{(4)}$  ( $-77,75$  p.p.m.).

## EXPERIMENTELLER TEIL

### Aufnahme der $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren

Die protonenbreitbandentkoppelten  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden nach der Impuls-Fourier-Transform-Technik mit einem Bruker HFX-90 NMR-Spektrometer aufgenommen ( $^{13}\text{C}$ : 22.628 MHz,  $^1\text{H}$ : 90 MHz). Als Proben wurden je 1,5 ml einer  $\text{D}_2\text{O}$ -Lösung der unter den Abbildungen verzeichneten Zuckereinwaagen verwendet. Die Probenröhrchen hatten einen Durchmesser von 10 mm. Die Temperatur wurde während der Messungen auf 300 K gehalten. Als Standard wurde externes Dioxan in einer im Probenrohr zentrierten Kapillare von 2 mm Durchmesser verwendet. Stabilisiert wurde auf das Deuteriumsignal des als Lösungsmittel verwendeten  $\text{D}_2\text{O}$ . Die bei 95% der vollen Radiofrequenzsendeleistung des Gerätes erhaltenen Impulsinterferogramme wurden in einem Fabritek 1074 Rechner (4 K) 1024 bis 4096 mal akkumuliert. Die Impulsbreite betrug 5  $\mu\text{S}$  Sekunden, das Impulsintervall war 0,82 Sekunden (50 Hz/cm). Die akkumulierten Interferogramme wurden mit einem Digital PDP-8-I-Rechner (4 K) Fourier transformiert und phasenkorrigiert. Die Signalpositionen wurden zunächst als Adressendifferenzen bezüglich des Standardsignals Dioxan digital erhalten. Die aus den Adressendifferenzen maschinell berechneten chemischen Verschiebungen gegen Dioxan ( $-66,5$  p.p.m. gegen Tetramethylsilan) wurden auf Tetramethylsilan umgerechnet. Die Meßgenauigkeit betrug  $\pm 1$  Adresse. Bei einem Impulsintervall von 0-82 Sekunden, 2048 Adressen pro Spektrum (2500 Hz) und 22,628 MHz entsprach dies einem  $\delta$ -Fehler von  $\Delta\delta = \pm 0,054$  p.p.m.



## Darstellung der Kohlenhydrate

Die hier untersuchten Zucker D-Galactose, D-Glucose, Lactose, Maltose, D-Mannose und L-Rhamnose sind Proben der Firma E. Merck AG, Darmstadt. Die restlichen Zucker wurden nach den Literaturangaben synthetisiert. Die Drehwerte ( $c = 1$ , H<sub>2</sub>O, 16–23°C) wurden mit einem Digitalpolarimeter OLD-5 der Firma Zeiss, Oberkochen, bestimmt. Die  $[\alpha]_D$ -Werte sind durch Extrapolieren errechnet.

Epilaktose: Smp. 194–195°C,  $[\alpha]_D^{20} + 26^\circ$  (Lit.<sup>30</sup>); Epimaltose: Smp. 214–215°C,  $[\alpha]_D^{20} + 113.8^\circ$  (Lit.<sup>31</sup>); Methyl- $\alpha$ -D-galactosid: Smp. 104–105°C,  $[\alpha]_D^{20} + 162,8^\circ$  (Lit.<sup>32</sup>); Methyl- $\beta$ -D-lactosid: Smp. 208–209°C,  $[\alpha]_D^{20} + 6,1^\circ$  (Lit.<sup>33</sup>); Methyl- $\alpha$ -D-mannosid: Smp. 191–192°C  $\alpha]_D^{20} + 78,9^\circ$ (Lit.<sup>34</sup>). Alle Konstanten sind in Übereinstimmung mit Literaturangaben.

## LITERATUR

- Breitmaier E., Jung G., Voelter W.: *Angew. Chem.* 83, 659 (1971); *Angew. Chem., Internat. Edit.* 10, 673 (1971).
- Voelter W., Breitmaier E., Jung G., Keller T., Hiss D.: *Angew. Chem.* 82, 812 (1970); *Angew. Chem., Internat. Edit.* 9, 803 (1970).
- Voelter W., Jung G., Breitmaier E., Price R.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 352, 1034 (1971).
- Breitmaier E., Jung G., Voelter W.: *Chimia (Aarau)* 26, 136 (1972).
- Breitmaier E., Voelter W.: *European J. Biochem.* 31, 234 (1972).
- Jardetzky C. D., Jardetzky O.: *J. Am. Chem. Soc.* 81, 222 (1959).
- Jardetzky C. D.: *J. Am. Chem. Soc.* 82, 229 (1960).
- Lemieux R. U., Stevens J. D.: *Can. J. Chem.* 44, 249 (1966).
- McCloskey J. A., Lawson A. M., Tsuboyama K., Krueger P. M., Stillwell R. N.: *J. Am. Chem. Soc.* 90, 4182 (1968).
- DeJongh D. C., Radford T., Hribar J. D., Hanessian S., Bieber M., Dawson G., Sweeley C. C.: *J. Am. Chem. Soc.* 91, 1728 (1969).
- König W. A., Zech K., Uhmann R., Voelter W.: *Chem. Ber.* 105, 262 (1972).
- Harada N., Sato H., Nakanishi K.: *Chem. Commun.* 1970, 1691.
- Voelter W., Kuhfittig G., Schneider G., Bayer E.: *Liebigs Ann. Chem.* 734, 126 (1970).
- Voelter W., Kuhfittig G., Oster O., Bayer E.: *Chem. Ber.* 104, 1234 (1971).
- Voelter W., Records R., Bunnenberg E., Djerassi C.: *J. Am. Chem. Soc.* 90, 6163 (1968).
- Voelter W., Barth G., Records R., Bunnenberg E., Djerassi C.: *J. Am. Chem. Soc.* 91, 6165 (1969).
- Harris T. L., Hirst E. L., Wood C. E.: *J. Chem. Soc. (London)* 1937, 848.
- Listowsky I., Avigad G., England S.: *J. Am. Chem. Soc.* 87, 1765 (1965).
- Voelter W., Breitmaier E., Jung G.: *Angew. Chem.* 83, 1011 (1971); *Angew. Chem. Internat. Edit.* 10, 935 (1971).
- Dorman D. E., Roberts J. D.: *J. Am. Chem. Soc.* 92, 1355 (1970).
- Perlin A. S., Casu B., Koch H. J.: *Can. J. Chem.* 48, 2596 (1970).
- Breitmaier E., Voelter W., Jung G., Tänzer C.: *Chem. Ber.* 104, 1147 (1971).
- Voelter W., Breitmaier E., Jung G.: *Angew. Chem.* 83, 937 (1971); *Angew. Chem. Internat. Edit.* 10, 862 (1971).
- Breitmaier E., Voelter W., Jung G.: *Proc. 2nd Conference on Applied Physical Chemistry*, Bd. 1, S. 61, Veszprém. Hungarian Academy of Sciences, Budapest 1971.
- Voelter W., Breitmaier E., Price R., Jung G.: *Chimia (Aarau)* 25, 168 (1971).
- Dorman D. E., Roberts J. D.: *J. Am. Chem. Soc.* 93, 4463 (1971).

27. Breitmaier E., Jung G., Voelter W.: *Chimia (Aarau)* 25, 362 (1971).
28. Isbell H. S.: *J. Res. Natl. Bur. Std.* 66A, 233 (1962).
29. Roberts J. D., Weigert F. J., Kroschwitz J. I., Reich H. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 92, 1338 (1970).
30. Haskins W. T., Hann R. M., Hudson C. S.: *J. Am. Chem. Soc.* 64, 1852 (1942).
31. Haworth W. N., Hirst E. L., Reynolds R. J. W.: *J. Chem. Soc. (London)* 1934, 302.
32. Fischer E., Beensch L.: *Ber.* 27, 2478 (1894).
33. Smith F., Van Cleve J. W.: *J. Am. Chem. Soc.* 74, 1912 (1952).
34. Fischer E., Beensch L.: 29, 2927 (1896).