薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
100 (5) 535-539 (1980)

ラクト-N-テトラオース誘導体の ^{13}C -Nuclear Magnetic Resonance スペクトル

松田秀人, 手島節三
名古屋市立大学薬学部¹⁾

^{13}C -Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Lacto-N-tetraose Derivative

HIDETO MATSUDA and SETSUZO TEJIMA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University¹⁾

(Received November 24, 1979)

The completely proton-decoupled ^{13}C -nuclear magnetic resonance spectrum of the 1,6-anhydro derivative of O- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopyranose (lacto-N-tetraose) (8) was measured in D_2O . The signals were assigned by direct comparison of the spectra with those of 1,6-anhydro- β -lactose (lactosan) (5) and O- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranose (lacto-N-biose I) (7), and also by examination of the selectively proton-decoupled, and the partially relaxed Fourier transform (PRFT) spectra. The effect of the glycosylation shift was discussed, and the shift values calculated served for the confirmation of the structure of 8.

Keywords— ^{13}C -NMR spectra; 1,6-anhydro derivative; lacto-N-tetraose; lactosan lacto-N-biose I; completely proton-decoupled spectra; selectively proton-decoupled spectra; partially relaxed Fourier transform (PRFT) spectra

最近、糖類の合成反応において、生成物の構造確認や反応機構解析の目的で、他の分析手段とともに、 ^{13}C -nuclear magnetic resonance (^{13}C -NMR) がしばしば利用されるようになった。オリゴ糖合成の研究例²⁾ も急激に増加し、Kochetkov ら³⁾ は、血液型物質 H から分離されたアミノ糖を含むオリゴ糖の ^{13}C -NMR を報告している。今回われわれは、人乳中に含まれるアミノ糖を含む四糖類であるラクト-N-テトラオース (O- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopyranose⁴⁾ の 1,6-anhydro 誘導体を合成し、 ^{13}C -NMR スペクトルのシグナルの帰属を行なったので報告する。糖類の各炭素の化学シフトは測定条件（溶媒、濃度、温度など）によっていくらか変化するので、溶媒として重水を使用し、温度は予期せぬ反応を避けるため 25—30° とした。炭素のシグナルは、ラクト-N-テトラオースの構成単位である 1,6-anhydro- β -D-glucose (1), methyl β -D-galactopyranoside (2), 2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranose (3), および 3 の β アノマー (4) のスペクトルを相互比較し、まず構成二糖類の 1,6-anhydro- β -lactose (lactosan) (5), O- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O-2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranose (6), および 6 の β アノマー (7) (lacto-N-biose I) のスペクトルの各シグナルを帰属し、次いで 5, 7 のスペクトルの相互比較により四糖の 1,6-anhydro 体 (8) のスペクトルのシグナルを帰属した。Chart 1 に 5, 6, 7, 8 の構造を示した。5, 6, 7 の各炭素のシグナルは、すでに報告されている 1, 2, 3, 4 のスペクトルから帰属し Table I に示した。ラクト-N-ビオース I は α 体が結晶として得られ、変旋光して 24 時間後に α, β アノマーの平衡状態となる。⁵⁾ 化合物 7 のシグナルを帰属するために、まず結晶の α アノマー (6) を重水に溶解後直ちにスペクトルを測定し、次いで 2 日後に同条件で測定した。Colson と King⁶⁾ は D-グルコース、D-ガラクトースなどから成る種々の二糖類の

1) Location: Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya, 467 Japan.

2) É. Bar-Guilloux, J. Defaye, H. Driguez, D. Robie, *Carbohydr. Res.*, **45**, 217 (1975); D.D. Cox, E.K. Metzner, E.J. Reist, *ibid.*, **62**, 245 (1978); *idem*, *ibid.*, **63**, 139 (1978); T. Osawa, K. Katano, M. Matsui, *ibid.*, **64**, C3 (1978).

3) A.S. Shashikov, P.A. Nikolay, A.D. Varvara, N.K. Kochetkov, *Carbohydr. Res.*, **72**, 218 (1979).

4) T. Takamura, T. Chiba, H. Ishihara, S. Tejima, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 1497 (1979).

5) H.M. Flowers, R.W. Jeanloz, *J. Org. Chem.*, **28**, 1377 (1963).

6) P. Colson, R.R. King, *Carbohydr. Res.*, **47**, 1 (1976).

Chart 1

TABLE I. Chemical Shifts of the Ring Carbon Atoms of Compounds 5, 6, 7, and 8 (The values of chemical shifts are in ppm.)

		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
5	A	102.0	70.6	72.0	78.3	74.6	65.7
	B	102.6	71.2	73.1	69.2	75.8	61.6
6	C	91.7	53.5	80.9	69.4	71.9	61.3
	D	104.0	71.4	73.2	69.2	75.9	61.6
7	C	95.4	55.3	83.3	69.4	76.1	61.4
	D	104.0	71.4	73.2	69.2	75.9	61.6
8	A	102.6	71.0	72.6	78.7	75.1	66.2
	B	103.1	71.0	83.0	66.2	76.5 ^{a)}	62.2
	C'	103.8	55.9	83.3	69.7	76.5 ^{a)}	61.8
	D	104.7	71.9	73.7	69.7	76.1 ^{a)}	62.2

a) Assignments which may be reversed.

^{13}C -NMR スペクトルを測定し、非還元グルコピラノース環の炭素の化学シフトは非還元グルコピラノース環の種類に依存せず、また逆に還元グルコピラノース環の炭素の化学シフトは非還元グルコピラノース環の影響をほとんど受けないことを報告している。したがって、溶解直後および 2 日後のスペクトルを比較することにより、ラクト-N-ビオース I の β アノマー (7) のスペクトルのシグナルが容易に帰属される。

ラクトザン (5) のスペクトルにおける C-1 および C-1' 位の帰属は、まず ^1H -NMR により anomeric proton を測定して H-1 位を 5.89 ppm, H-1' 位を 4.96 ppm と帰属してから、次いで selective proton decoupling を行ない、1 位および 1' 位の炭素を帰属した。すなわち、51.813 KHz (5.89 ppm) を照射し C-H の coupling は消すことにより C-1 位を 102.0 ppm, 51.722 KHz (4.96 ppm) を照射することにより C-1' 位を 102.6 ppm と帰属した。C-6 および C-6' 位のシグナルは高磁場領域にあり、おのおのの単糖部分の比較により C-6 位を 65.7 ppm, C-6' 位を 61.6 ppm と帰属した。2 位から 5 位までの炭素はおのおのの単糖 1, 2 の化学シフトとの相互比較により帰属した。ラクト-N-ビオース I (6, 7) の場合も 5 と同様の手法を用いた。まず α アノマー (6) のスペクトルで selective proton decoupling を行ない C-1 位を 91.7 ppm, C-1' 位を 104.0 ppm と帰属

TABLE II. Chemical Shifts of the Ring Carbon Atoms of Lacto-N-biose I and Related Compounds (The values of chemical shifts are in ppm.)

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'
Compound (6) ^{a)}	91.7	53.5	80.9	69.4	71.9	61.3	104.0	71.4	73.2	69.2	75.9	61.6
Compound (9) ^{b)}	91.9	54.2	72.5	69.5	75.9	61.2	101.4	77.3	72.5	69.1	75.9	61.8
Compound (3) ^{c)}	91.6	54.9	72.4	70.9	71.5	61.5						
Compound (4) ^{d)}	95.7	57.6	74.7	70.7	76.8	61.6						
Methyl 2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranoside ⁶⁾	99.1	54.5	72.5	70.8	72.0	61.4						
Methyl 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside ⁶⁾	102.7	57.9	74.8	70.8	76.7	61.6						

a) O- β -D-Galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O-2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranose.

b) O- α -L-Fucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O-2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranose.

c) 2-Acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranose.⁶⁾

d) 2-Acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranose.⁶⁾

し、2 日後に得られたスペクトルから β アノマー (7) の C-1 位を 95.4 ppm, C-1' 位を 104.0 ppm と帰属した。C-2 から C-6' 位までの炭素の帰属はおおのこの単糖部 2, 3, 4 の相互比較により Table I に示したように帰属した。

Kochetkov ら³⁾ による合成三糖 (O- α -L-fucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O-2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranose) (9) におけるラクト-N-ビオース I 部分のシグナルの帰属を、われわれが今回行なったラクト-N-ビオース I の α アノマー (6) のシグナルの帰属と対比して Table II に示した。Perkins ら⁷⁾ によるグルコサミン誘導体のデータも併せて記載する。

Table II の比較において、C-3, C-5, C-1', C-2' 位の帰属に若干の相違がある。すなわち C-3 位に関して Kochetkov らは 72.5 ppm と帰属している。しかし、2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranose (3) において C-3 位は 72.4 ppm であり、三糖 (9) およびラクト-N-ビオース I (6) では C-3 位にガラクトースが結合して、O-galactosylation shift をしているから、6 のように低磁場にある 80.9 ppm のシグナルに帰属するのが正しいように思う。また、C-5 位に関しても Kochetkov らは 75.9 ppm と帰属しているが、 α アノマー (3) では 71.5 ppm, β アノマー (4) では 76.8 ppm であり、9 および 6 は α アノマーであるため、6 のように 71.9 ppm と帰属した方が正しいように思う。

C-1' 位に関して Pfeffer ら⁸⁾ は、ラクト-N-ビオース I の非還元糖部に対応する methyl β -D-galactopyranoside (2) のスペクトルに対して C-1 位を 104.5 ppm と帰属し、2 の α アノマーに対しては C-1 位を 100.1 ppm と帰属している。しかし、Kochetkov らの三糖 (9) のガラクトース残基では、C-2' 位に fucose が α 結合しているため、 β 炭素である C-1' 位は高磁場にシフトし、101.4 ppm と α アノマーに近い値を示しているものと思われる。反対に、C-2' 位のシグナルが 71.4 ppm と低いのは α 炭素である C-2' 位が O-glycosylation を受けたためと考えられる。

山岡ら⁹⁾ はグリコシド結合した anomeric 炭素のシグナルは、 α 結合では 97—101 ppm に、 β 結合では 103—105 ppm に現われることを報告している。Table I においてラクトザン (5) では C-1 位が 102.0 ppm, C-1' 位が 104.0 ppm に、ラクト-N-ビオース I (6, 7) では C-1' 位が 104.0 ppm に現われるから、5, 6, 7 におけるグリコシド結合は β 結合であると確認できる。

Table III に 5, 6, 7 の glycosylation shift を α および β 炭素に関して示した。杉山¹⁰⁾ および通ら¹¹⁾ によ

7) S.J. Perkins, L.N. Johnson, D.C. Phillips, R.A. Dwek, *Carbohydr. Res.*, **59**, 19 (1977).

8) P.E. Pfeffer, K.M. Valentine, F.W. Parrish, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 1265 (1979).

9) N. Yamaoka, T. Usui, K. Matsuda, K. Tuzimura, H. Sugiyama, S. Seto, *Tetrahedron Lett.*, **1971**, 2047.

10) H. Sugiyama, *Heterocycles*, **11**, 615 (1978).

11) K. Tori, S. Seo, Y. Yoshimura, H. Arita, Y. Tomita, *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 179.

TABLE III. Glycosylation Shift in Compounds 5, 6, 7, and 8

	Shift value						
	C-2	C-3	C-4	C-5	C-2'	C-3'	C-4'
5		-1.3	+6.7	-2.4			
6	-1.4	+8.5	-1.5				
7	-2.3	+8.6	-1.3				
8					-0.2	+9.9	-3.0

Fig. 1. Completely Proton-decoupled ^{13}C -NMR Spectra of 5, 7, and 8 and Proton-decoupled PRFT Spectrum of 8 in D_2O

れば、 α 炭素の β -glycosylation shift は 8—10 ppm 低磁場へ、 α -glycosylation shift は α -axial 立体障害のため 3—7 ppm 低磁場へシフトし、 β 炭素に関してはいずれも 0.5—2 ppm 高磁場シフトするという。ラクト-N-ビオース I の α アノマー (6) では、 α 炭素が 8.5 ppm、 β アノマー (7) では 8.6 ppm 低磁場シフトし、 β 炭素が 1.3—2.3 ppm 高磁場シフトして適切な glycosylation shift をしている。しかし、ラクトザン (5) では α 炭素の glycosylation shift が 6.7 ppm と少し小さい。これは 5 の還元糖部が 1,6-anhydro 構造をとり、1 C conformation をとっているためと考えられる。

これまでの帰属を参考にして四糖 (8) のシグナルの帰属を行なった。Fig. 1 にラクトザン (5)、ラクト-N-ビオース I の β アノマー (7) および四糖 (8) のスペクトルを示した。まず、8 の proton nuclear magnetic resonance (^1H -NMR) を測定し、5 の ^1H -NMR を参考にして H-1 位を 5.89 ppm、H-1' 位を 4.96 ppm と帰属し、また、7 の ^1H -NMR から H-1'' 位を 4.88 ppm と帰属した。したがって、5 と 7 の結合に基づく H-1'' 位は 5.23 ppm と帰属して selective proton decoupling を行なった。すなわち、51.814 KHz (5.89 ppm) を照射して C-H の coupling を消し、C-1 位を 102.6 ppm と帰属した。以下同様に 51.721 KHz (4.96 ppm) を照射して C-1' 位を 103.1 ppm、51.748 KHz (5.23 ppm) を照射して C-1'' 位を 103.8 ppm、51.713 KHz (4.88 ppm) を照射して C-1''' 位を 104.7 ppm と帰属した。これらの anomeric 炭素はすべて β グリコシド領域にあり、 β 結合していることが確認できる。Table II において、4 と methyl 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside のスペクトルを比較してみると、C-1 位が methyl glycoside となっても C-2—C-6 位の炭素のシグナルにはほとんど変化がない。これは C-2 位の NAc 基がかさ高いため、両化合物がともに安定な C 1 conformation をとっているためと考えられ、このことは、5 と 7 の結合の際におけるグルコサミン残基の立体構造にも敷衍できるもの

と考えられる．以上のことから二糖部分 5 および 7 のスペクトルとの相互比較により四糖 (8) のスペクトルを考えれば良いと思われる．したがって、C-6, C-6', C-6'', C-6''' 位に関してもスペクトルの相互比較により Table II のように帰属した．しかし、他の炭素の帰属に関してはこれだけでは困難なため、緩和時間の差を利用した．直接結合したプロトンをもつ ^{13}C 核の緩和では ^{13}C - ^1H 間双極子相互作用が支配的であることが多くの化合物について確認され、ショ糖でも同様であることが示されている.¹²⁾ Pulse Fourier transform NMR による測定では、パルス繰返し時間を適切に設定するために、 ^{13}C - ^1H 間双極子緩和に対するスピン—格子緩和時間 (T_1) の測定を行なうが、この T_1 値の比較がスペクトルの帰属に有用な手段であることはよく知られている．

Allerhand と Doddrell¹³⁾ は、stachyose(O- α -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-O- α -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 8)-O- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O- β -D-fructofuranose) について partially relaxed Fourier transform (PRFT) 法の測定を行ない、分子運動が大きいため T_1 の比較的長い末端の galactose および fructose に基づくシグナルと、中央の galactose, glucose によるシグナルとを判別できることを報告している．そこで四糖 (8) に PRFT 法の測定を行ない、Fig. 1 にそのスペクトルを示した． T_1 が短い、すなわち分子運動が小さいと正の値を示し、 T_1 が長い、すなわち分子運動が大きいと負の値を示す．この結果から、還元末端の 1,6-anhydro- β -D-glucose (1) 部分の T_1 が長いことがわかり、負のシグナルを A 部分と帰属した．しかし C-5', C-5'', C-5''' 位は帰属があいまいなため Table I のように示した．

Table III に 8 に関する glycosylation shift を示した．Lemieux と Driguez¹⁴⁾ は、O- α -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O- α -D-galactopyranose および O- α -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O- β -D-galactopyranose において、 β 炭素である C-4 位がおおの 3.7 ppm, 3.9 ppm と大きく高磁場に shift することを報告している．また、Voelter ら¹⁵⁾ は、galactopyranose をメチル化すると β 炭素が axial 配向であれば、-4.5 ppm 高磁場シフトすることを示し、Gorin¹⁶⁾ は C-3 位に置換基のあるマンノースの C-2 位の高磁場シフトを報告している．Table III に示したように、四糖 (8) の C-3' 位の α 炭素は 9.9 ppm 低磁場シフトして適切な β -glycosylation shift を示し、 β 炭素である C-4' 位は 3.0 ppm と大きく高磁場シフトしていることから、四糖 (8) においてはラクト-N-ビオース I が C-3' 位に β 結合していることが確かめられる．なお、Table III においてラクトザン (5) の C-3 位は β 炭素であり、しかも 1,6-anhydro 構造のため 1 C conformation をとり、axial 配向となるが、ガラクトースやマンノースのように *cis*-diol 構造を有していないため、大きな高磁場シフトはみられなかったと考えられる．

このように ^{13}C -NMR は合成したラクト-N-テトラオースの構造確認に有用であり、しかも化合物を分解することなく簡単に早く行なえる利点があることがわかった．

実 験 の 部

^{13}C -FTNMR は日本電子 JNM-FX 100 装置を用い、25 MHz で測定した．サンプル 50 mg を重水に溶かし、外径 5 mm のサンプル管に入れ、25—30° で測定した．FT 条件はパルス幅 7 μsec 、パルス角度 45°、スペクトル幅 5000 Hz、使用データ点 8192 とした．ジオキサンもしくは二重管⁸⁾を使用してテトラメチルシランを内部標準として用い、化学シフトはすべてテトラメチルシランに対する δ 値として ppm 単位で示した．

PRFT 法はパルス幅 28—14 μsec 、パルス角度 180—90°、インターバル 0.18 sec、待ち時間 7.0 sec で測定した．

謝辞 本研究に当り貴重な御助言をいただいた本学 竹田忠紘助教授、 ^{13}C -NMR を測定していただきました総合機器分析施設 熊谷登喜子氏に感謝いたします．

12) A. Allerhand, D. Doddrell, R. Komoroski, *J. Chem. Phys.*, **55**, 189 (1971).

13) A. Allerhand, D. Doddrell, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2777 (1971).

14) R.U. Lemieux, H. Driguez, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 4069 (1975).

15) W. Voelter, E. Breitmaier, E.B. Rathbone, A.M. Stephen, *Tetrahedron*, **29**, 3845 (1973).

16) P.A. Gorin, *Carbohydr. Res.*, **39**, 3 (1975); *idem*, *Can. J. Chem.*, **51**, 2375 (1973).