

Применение современных методов спектроскопии ЯМР для конформационного анализа олиго- и полисахаридов

А.А.Грачев, А.Г.Герbst, А.С.Шашков, Н.Э.Нифантьев

*Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского Российской академии наук
119991 Москва, Ленинский просп., 47, факс (499) 135–8784*

Рассмотрены современные методы ЯМР для определения констант спин-спинового взаимодействия и величин ядерного эффекта Оверхаузера и применение этих данных в экспериментальном конформационном анализе олиго- и полисахаридов.
Библиография — 95 ссылок.

Оглавление

I. Введение	776
II. Структурные и спектральные (ЯМР) характеристики, используемые в конформационном анализе олиго- и полисахаридов	776
III. Современные методы определения констант спин-спинового взаимодействия и особенности их использования в конформационном анализе олиго- и полисахаридов	777
IV. Современные методы регистрации ядерного эффекта Оверхаузера и особенности его использования в конформационном анализе олиго- и полисахаридов	788
V. Заключение	794

I. Введение

Развитие методов конформационного анализа олиго- и полисахаридов, начавшееся в 70–80-х гг. XX в., было связано с основополагающими работами в области гликобиологии, которые продемонстрировали исключительно важную роль производных углеводов во многих процессах клеточного узнавания. Именно в это время были установлены структуры многих классов углеводных соединений, в том числе детерминантов групп крови,^{1,2} микробных полисахаридов,^{3,4} гликолипидов, гликопротеинов и др.,⁵ а также выполнены классические исследования биосинтеза сложных природных гликоконъюгатов⁶ и механизма их распознавания углеводсвязывающими белками разных типов.^{7–9} Тем самым была создана основа для успешного изучения в

последующие годы роли природных гликоконъюгатов в тромбообразовании, при развитии опухолей и метастазов, при воспалениях, микробных инфекциях и других опасных заболеваниях.^{10–17} Понимание на молекулярном уровне механизмов возникновения и протекания перечисленных процессов может служить инструментом для поиска новых лекарственных препаратов и оптимизации их структуры.¹⁸

Активность производных углеводов в биологических процессах напрямую связана с их пространственной организацией, поэтому выяснение закономерностей конформационного поведения олиго- и полисахаридов в растворе является актуальнейшей задачей современной физической химии природных соединений. Данная область включает в себя как теоретические исследования конформационных свойств, в том числе и их предсказание, так и экспериментальный анализ конформаций производных углеводов в растворе. Ранее авторами был опубликован обзор¹⁹, в котором рассмотрены современные расчетные методы теоретических исследований конформаций углеводов. В настоящем обзоре обсуждаются современные методы спектроскопии ЯМР для регистрации межпротонных ядерных эффектов Оверхаузера (ЯЭО), межпротонных и протон-углеродных вицинальных констант спин-спинового взаимодействия (КССВ), а также области их применения в конформационном анализе углеводов в растворе.

II. Структурные и спектральные (ЯМР) характеристики, используемые в конформационном анализе олиго- и полисахаридов

Многочисленные исследования разными независимыми методами (рентгеноструктурный анализ кристаллов, спект-

А.А.Грачев. Кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории химии гликоконъюгатов ИОХ РАН.

Телефон: (499)135–6433, e-mail: grachevaa@mail.ru

А.Г.Герbst. Кандидат химических наук, старший научный сотрудник той же лаборатории. Телефон: (499)135–6433, e-mail: alger@ioc.ac.ru

А.С.Шашков. Доктор химических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории ядерного магнитного резонанса ИОХ РАН. Телефон: (499)135–9094, e-mail: shash@ioc.ac.ru

Н.Э.Нифантьев. Доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией химии гликоконъюгатов ИОХ РАН. Телефон: (499)135–8784, e-mail: nen@ioc.ac.ru

Область научных интересов авторов: синтез, спектральный и конформационный анализ природных соединений, изучение взаимосвязи структуры и биологической активности.

Дата поступления 10 апреля 2009 г.

роскопия ЯМР растворов, теоретические расчеты) показывают, что внутрциклические длины связей, валентные и торсионные углы моносахаридных остатков в пиранозной форме мало зависят от типа олигосахарида.²⁰ Для пиранозных остатков в растворе характерно наличие одной преимущественной конформации — 4C_1 или 1C_4 — в зависимости от природы моносахарида. В отличие от пираноз фуранозные циклы являются более подвижными и существуют в виде нескольких взаимопревращающихся конформаций.^{21–23}

Важнейшим структурным элементом, определяющим конформационное состояние олиго- и полисахаридов, является межмоносахаридный мостик (рис. 1), в котором длины связей и валентные углы изменяются незначительно. Конформационная подвижность обеспечивается вращением вокруг связей, входящих в межмоносахаридный мостик.²⁰ Для (1→6)-связанных дисахаридных блоков это торсионные углы φ , ψ и ω (фрагмент А на рис. 1), а для (1→2)-, (1→3)- и (1→4)-связанных дисахаридных блоков — углы φ и ψ (фрагмент В на рис. 1).

Из всех известных экспериментальных методов исследования структуры олиго- и полисахаридов в растворе спектроскопия ЯМР на ядрах 1H и ${}^{13}C$ является наиболее информативной. Сведения о структуре могут быть получены из величин протонных ядерных эффектов Оверхаузера,²⁴ из величин времен спин-решеточной релаксации (T_1) протонов,²⁴ а также из величин гомо- и гетероядерных КССВ между ядрами 1H и ${}^{13}C$.^{25–30}

Измеряемые величины ЯЭО и времен релаксации протонов непосредственно связаны с прямым диполь-дипольным взаимодействием ядер³¹ и имеют одну физическую природу. Константы спин-спиновой взаимодействия отражают косвенное взаимодействие ядерных спинов, передающееся через поляризацию валентных электронов,³² и, таким образом, имеют физическую природу, отличную от природы ЯЭО и времен релаксации. Поэтому существует два независимых подхода для определения структурных параметров олиго- и полисахаридов в растворе с помощью спектроскопии ЯМР.

Следует упомянуть, что сведения о структуре углеводов могут быть также получены из величин прямых диполь-дипольных констант, наблюдаемых в слабоориентированных средах. Однако этот подход рассматриваться не будет, так как тематика данного обзора ограничена изучением олиго- и полисахаридов в растворе. Изучению биомолекул в слабоориентированных средах посвящен обзор³³.

Косвенные сведения о конформации дисахаридных фрагментов углеводов можно получить из значений химических сдвигов ядер ${}^{13}C$, находящихся в непосредственной близости к гликозидной связи. В работе³⁴ было показано, что про-

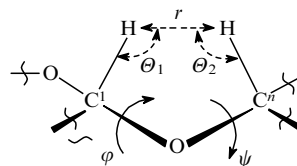


Рис. 2. Взаимодействие аномерного и трансгликозидного протонов в межмоносахаридном мостике, влияющее на величины химических сдвигов сигналов атомов углерода C^1 и C^n , соединенных через гликозилированный атом кислорода.

странственные взаимодействия протонов, принадлежащих соседним моносахаридным остаткам и находящихся вблизи гликозидной связи, влияют на химические сдвиги атомов углерода, связанных с этими протонами (рис. 2). Для количественного расчета изменения химических сдвигов в спектрах ЯМР ${}^{13}C$ использовалась формула Гранта и Чини (1), предложенная в 1967 г.³⁵

$$\delta^{13}C = 1680 \cos\theta \exp(-2.671r), \quad (1)$$

где $\delta^{13}C$ — изменение химического сдвига (м.д.), обусловленное взаимодействием соседних протонов; r — расстояние между взаимодействующими протонами (Å); θ — угол между векторами $C-H$ и $H-N$ (см. рис. 2).

В настоящее время возможно лишь качественное использование формулы (1). Попытки ее количественного применения для расчета эффектов гликозилирования или какого-либо иного типа O -модифицирования (O -сульфатирования, O -фосфорилирования и т.д.) для атомов углерода в олиго- и полисахаридах не приводят к удовлетворительным результатам. Причина в том, что формула была получена и параметризована на грубых механических моделях молекул, поскольку в 60-е гг. XX в. точные данные о конформациях органических молекул были ограничены.

Из-за подвижности гликозидных связей для углеводных молекул характерно существование нескольких энергетических минимумов. Таким образом, необходимо иметь в виду, что экспериментально наблюдаемые характеристики спектров ЯМР являются усредненными по ансамблю допустимых конформеров. Поэтому анализ экспериментальных данных обычно проводят с учетом результатов молекулярного моделирования, основанного на методах молекулярной и квантовой механики.

Для исследования олиго- и полисахаридов в растворе особенно значимы косвенные спин-спиновые взаимодействия и ядерный эффект Оверхаузера. В следующих разделах рассмотрена их взаимосвязь со структурными параметрами молекул, существующие в настоящее время экспериментальные методы их измерения, а также приведены конкретные примеры их применения в структурном анализе углеводов.

III. Современные методы определения констант спин-спиновой взаимодействия и особенности их использования в конформационном анализе олиго- и полисахаридов

Гомо- ($J_{H,H}$) и гетероядерные ($J_{C,H}$) КССВ находят широкое применение в конфигурационном и конформационном анализе углеводов. Так, для определения конфигурации моносахаридных остатков используют величины вицинальных (через три связи) протон-протонных КССВ (${}^3J_{H,H}$).

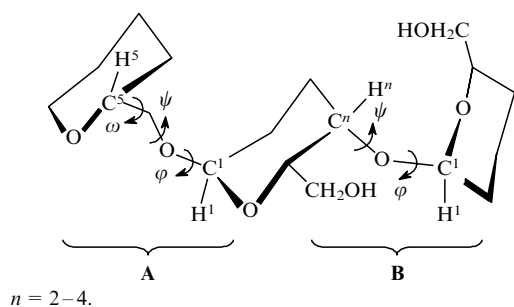


Рис. 1. Торсионные углы при гликозидных связях, определяющие конформации (1→6)-связанных дисахаридных фрагментов (φ , ψ , ω) (фрагмент А) и конформации (1→2)-, (1→3)- и (1→4)-связанных дисахаридных фрагментов (φ , ψ) (фрагмент В).

Для вицинальных констант ${}^3J_{\text{H,H}}$ экспериментально найдена и теоретически обоснована зависимость от двугранного (торсионного) угла $\text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{H}$ (θ). Впервые эта зависимость в виде уравнения (2) была теоретически предсказана Карплусом;³⁶ впоследствии появилось³⁷ модифицированное уравнение (3).

$${}^3J_{\text{H,H}} = A \cos^2 \theta + B, \quad (2)$$

$${}^3J_{\text{H,H}} = A \cos^2 \theta + B \cos \theta + C. \quad (3)$$

Коэффициенты в уравнениях (2) и (3) зависят от длины связи между атомами углерода (константа ${}^3J_{\text{H,H}}$ увеличивается вдвое при уменьшении длины связи $\text{C}-\text{C}$ от 1.46 до 1.34 Å), от валентных углов $\text{H}-\text{C}-\text{C}$ (их уменьшение ведет к увеличению констант), а также от электроотрицательности заместителей при атомах углерода во фрагменте $\text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{H}$ (введение электроотрицательных заместителей уменьшает величину константы ${}^3J_{\text{H,H}}$).²⁵ Влияние последнего фактора особенно трудно учесть, так как величина ${}^3J_{\text{H,H}}$ зависит не только от наличия электроотрицательных заместителей, но и от их расположения относительно протонов в изомерах или ротамерах.

Было предпринято много попыток записи уравнения Карплуса для фрагмента $\text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{H}$ с учетом перечисленных факторов в явном виде.³⁸ Наиболее удачной из них представляется уравнение (4), предложенное Хааснутом,³⁹ в котором учтена зависимость величины константы не только от торсионного угла θ , но и от электроотрицательности первых (α) и вторых (β) атомов в каждом заместителе, а также от взаимной ориентации последних.

$${}^3J_{\text{H,H}} = P_1 \cos^2 \theta + P_2 \cos \theta + \sum_i \Delta\chi_i [P_3 + P_4 \cos^2(\xi_i \theta + P_5 |\Delta\chi_i|)], \quad (4)$$

где P_1-P_5 — параметры (табл. 1), установленные автором эмпирически с помощью метода наименьших квадратов исходя из 315 экспериментальных величин ${}^3J_{\text{H,H}}$;

$$\Delta\chi_i = \chi_i - \chi_{\text{H}},$$

χ_i и χ_{H} — электроотрицательности i -го заместителя и водорода соответственно; $\xi_i = \pm 1$ в зависимости от ориентации i -го заместителя (рис. 3). Для заместителей, содержащих β -атомы,

$$\Delta\chi_i = \Delta\chi_i^{\alpha-\text{атом}} - P_6 \sum_j \Delta\chi_j^{\beta-\text{атом}},$$

где P_6 — параметр (см. табл. 1).

Уравнение (4) может быть использовано и для определения величин констант ${}^3J_{\text{H,H}}$ в углеводах. На практике для этих соединений зачастую решают обратную задачу: исходя из экспериментальных величин ${}^3J_{\text{H,H}}$ и уравнения (4) находят величины торсионных углов θ между двумя вицинальными

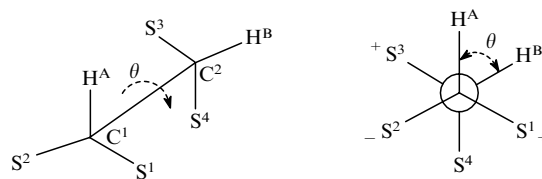


Рис. 3. Определение «положительных» ($\xi_i = +1$) и «отрицательных» ($\xi_i = -1$) заместителей S^i (для уравнения (4)) по отношению к фрагменту $\text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{H}$ молекулы тетразамещенного этана.³⁹

протонами. Как уже упоминалось ранее, конформации моносахаридных остатков в пиранозной форме обычно являются жесткими.²⁰ Поэтому, зная экспериментальные значения ${}^3J_{\text{H,H}}$ между внутрициклическими протонами в пиранозном остатке, легко рассчитать величины соответствующих торсионных углов θ . В свою очередь, зная величины углов, можно определить относительную конфигурацию асимметрических центров молекулы и тем самым определить тип моносахаридного остатка.

В зависимости от взаимной ориентации вицинальных протонов в пиранозных остатках различают три типа констант ${}^3J_{\text{H,H}}$ между ними (рис. 4): ${}^3J_{\text{a,a}}$ — между аксиальными протонами, ${}^3J_{\text{e,a}}$ — между экваториальным и аксиальным протонами и ${}^3J_{\text{e,e}}$ — между экваториальными протонами. Величины этих констант могут изменяться в довольно широком диапазоне (см. рис. 4) в зависимости от типа заместителей S^1 и S^2 у атомов углерода фрагмента $\text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{H}$. Однако в любом пиранозном остатке константы ${}^3J_{\text{a,a}}$ больше по величине, и их легко отличить от КССВ ${}^3J_{\text{e,a}}$ и ${}^3J_{\text{e,e}}$. При этом диапазоны величин констант ${}^3J_{\text{e,a}}$ и ${}^3J_{\text{e,e}}$ перекрываются. Тем не менее эмпирически установлено,²⁶ что каждому пиранозному остатку отвечает свой индивидуальный набор констант ${}^3J_{\text{H,H}}$ между кольцевыми протонами (табл. 2). Исключения составляют производные гликопираноз с конформационно подвижными циклами, а именно: α -альтразы, α - и β -идопиранозы, α - и β -рибопиранозы, α - и β -ликсипиранозы, включая их аналоги, содержащие другие функциональные группы (аминосахара, уроневые кислоты и др.). По этой же причине затруднено определение конфигурации фуранозных остатков, где, например, наличие объемных заместителей при одной из гидроксильных групп, включая аномерную, может изменить преимущественную конформацию цикла по сравнению с таковой для незамещенного остатка²¹⁻²³ и, соответственно, изменить величины констант ${}^3J_{\text{H,H}}$ между кольцевыми протонами.

Следует отметить, что при наличии в олиго- и полисахаридах сильных стерических затруднений могут изменяться конформации даже устойчивых пиранозных циклов. Так, анализ экспериментальных величин ${}^3J_{\text{H,H}}$ для циклических β -олигоглюкозаминов показал,⁴⁰ что они сильно изменяются при переходе от трисахарида **1** к дисахариду **2**.

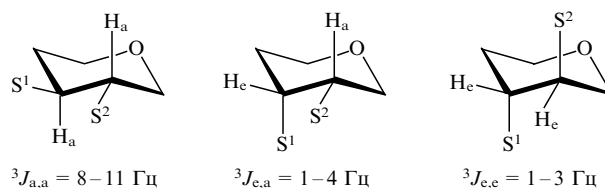


Рис. 4. Типы констант ${}^3J_{\text{H,H}}$ между вицинальными протонами в пиранозных производных и типичные диапазоны их величин.

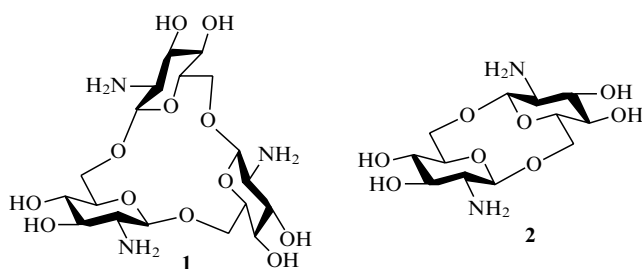
Таблица 1. Зависимость эмпирических параметров P_1-P_6 в уравнении (4) от числа заместителей S^i во фрагменте $\text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{H}$.

Параметр	1 заместитель	2 заместителя	3 заместителя	4 заместителя
P_1	13.70	13.89	13.22	13.24
P_2	-0.73	-0.98	-0.99	-0.91
P_3	0.56	1.02	0.87	0.53
P_4	-2.47	-3.40	-2.46	-2.41
P_5	16.9°	14.9°	19.9°	15.5°
P_6	0.14	0.24	0	0.19

Таблица 2. Экспериментальные величины констант $^3J_{\text{H},\text{H}}$ между кольцевыми протонами $\text{H}^1 - \text{H}^5$ в конформационно устойчивых пиранозных циклах.^{26,27}

Конфигурация ^a	$^3J_{\text{H}^1, \text{H}^2}$, Гц	$^3J_{\text{H}^2, \text{H}^3}$, Гц	$^3J_{\text{H}^3, \text{H}^4}$, Гц	$^3J_{\text{H}^4, \text{H}^5}$, Гц
α -glcp	3.8	9.8	9.6	9.7
β -glcp	8.0	9.6	9.6	9.6
α -manp	1.5	3.3	9.6	9.6
β -manp	1.1	3.5	9.5	9.5
α -alp	3.8	3.3	3.1	9.6
β -alp	8.3	3.2	3.1	9.9
α -galp	4.0	10.2	3.5	1.5
β -galp	7.9	9.9	3.5	1.5
β -altp	1.2	4.0	3.3	9.7
α -talp	1.8	3.3	3.3	1.5
β -talp	1.2	3.2	3.2	1.2
α -gulp	3.8	3.6	3.6	1.4
β -gulp	8.4	3.7	3.7	1.0

^a Обозначения относятся к конфигурации заместителей в пиранозных циклах и не включают природу заместителей при C^5 .



В случае трисахарида **1** константы $^3J_{\text{H},\text{H}}$ (табл. 3) имели типичные величины для $^4\text{C}_1$ -конформаций β -глюкопиранозных остатков (см. табл. 2). А для дисахарида **2** величины $^3J_{\text{H},\text{H}}$ сильно отличались от типичных значений, что говорит о сильном искажении $^4\text{C}_1$ -конформаций пиранозных циклов. Изменение конформаций глюкопиранозных остатков в дисахаридах способствует уменьшению стерического напряжения, возникающего в этой молекуле.

Величины $^3J_{\text{H},\text{H}}$ могут быть определены из мультиплетности сигналов в одномерном спектре ЯМР ^1H . Однако для крупных олиго- и полисахаридов с повторяющимся звеном, включающим в себя большое число моносахаридных остатков, определение величин $^3J_{\text{H},\text{H}}$ из таких спектров зачастую невозможно из-за сильного перекрывания сигналов. В этом случае обычно используют двумерные эксперименты: фазочувствительный $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY,^{41–43} COSY-DQF,^{43,44} E.COSY,^{43,45,46} PE.COSY^{43,47} и гетероядерные $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HMQC,⁴⁸ HSQC,⁴⁹ XLOC^{50–52} (описание этих экспериментов приведено ниже). Применение указанных методов позволяет представить данные, содержащиеся в одномерном спектре ЯМР ^1H , в двух измерениях; в результате сильно уменьшается число перекрывающихся сигналов и становится возможным измерение констант $^3J_{\text{H},\text{H}}$.

Таблица 3. Экспериментальные величины констант $J_{\text{H},\text{H}}$ для циклических три- и диглюкозаминов, определенные из спектров ЯМР ^1H (спектрометр 500 МГц, D_2O , 303 К).⁴⁰

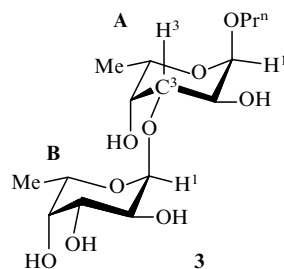
Соединение	$^3J_{\text{H}^1, \text{H}^2}$, Гц	$^3J_{\text{H}^2, \text{H}^3}$, Гц	$^3J_{\text{H}^3, \text{H}^4}$, Гц	$^3J_{\text{H}^4, \text{H}^5}$, Гц	$^3J_{\text{H}^5, \text{H}^6\text{R}}$, Гц	$^3J_{\text{H}^5, \text{H}^6\text{S}}$, Гц	$^2J_{\text{H}^6\text{R}, \text{H}^6\text{S}}$, Гц
$[\beta\text{-(1}\rightarrow\text{6)-GlcNH}_2\text{]}_3$ (1)	8.1	8.9	9.1	9.1	3.9	~ 1	12.2
$[\beta\text{-(1}\rightarrow\text{6)-GlcNH}_2\text{]}_2$ (2)	≤ 1	5.7	9.8	9.8	1.9	≤ 1	12.8

Другой тип констант, которые часто используют для определения конфигурации моносахаридов, — это прямые протон-углеродные константы ($^1J_{\text{C},\text{H}}$). Анализ величин констант между атомами C^1 и H^1 ($^1J_{\text{C}^1, \text{H}^1}$) в моносахаридных остатках позволяет точно различить фуранозную и пиранозную формы молекул: для моносахаридных остатков в фуранозной форме они составляют 173–175 Гц независимо от конфигурации аномерного центра (α или β), в пиранозных остатках с α -конфигурацией аномерного центра эти величины находятся в интервале 168–173 Гц, а с β -конфигурацией — 155–165 Гц. Для определения величин констант $^1J_{\text{C},\text{H}}$ обычно используют эксперименты типа GATED,³² HMQC^{48,53} и HSQC^{49,53} (см. ниже).

С точки зрения технического исполнения, простейшим экспериментом, дающим информацию о КССВ $J_{\text{C},\text{H}}$, является регистрация спектра ЯМР ^{13}C без подавления углерод-протонных спин-спиновых взаимодействий (без «развязки от протонов»). При этом надо учитывать, что спектроскопия ЯМР ^{13}C обладает много меньшей чувствительностью по сравнению со спектроскопией ЯМР ^1H из-за малого содержания изотопа ^{13}C в образце (естественное содержание 1.1%), а также из-за меньшей намагниченности ядер ^{13}C (гироманнитные отношения ядер ^1H и ^{13}C относятся как $\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{C}} = 3.97$). Для получения спектров ЯМР ^{13}C с хорошим соотношением сигнал/шум необходимо проводить длительное накопление спада свободной индукции (ССИ).

Повысить чувствительность эксперимента ЯМР ^{13}C можно за счет ядерного эффекта Оверхаузера, возникающего на ядрах ^{13}C при насыщении переходов ядер ^1H .³² Для этого во время релаксационной задержки t_{rel} проводят широкополосное (режим ВВ, от англ. broad band) радиочастотное облучение малой мощностью всего диапазона резонанса ядер ^1H в молекуле. Это так называемый GATED-эксперимент (рис. 5).

На рис. 6, б представлен GATED-спектр пропил-(1→3)-дифукозида (**3**), полученный авторами настоящего обзора.



В этом спектре сигналы, отвечающие отдельным атомам углерода, расщеплены в мультиплеты за счет КССВ $J_{\text{C},\text{H}}$; при этом проявляются как прямые $^1J_{\text{C},\text{H}}$, так и дальние КССВ $^2J_{\text{C},\text{H}}$, $^3J_{\text{C},\text{H}}$. Этот спектр позволил определить величины констант $^1J_{\text{C}^1, \text{H}^1}$ между аномерными атомами C^1 и H^1 моносахаридных остатков **A** и **B**, которые оказались равными 169.4 Гц (рис. 6, в). Таким образом однозначно показано, что остатки **A** и **B** в исследованном дисахаридах имеют α -конфигурацию. Отметим, что в спектре GATED для атомов C^1 данного соединения не разрешаются дальние кон-

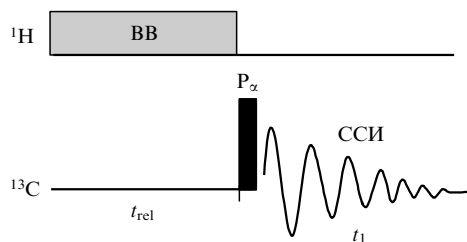


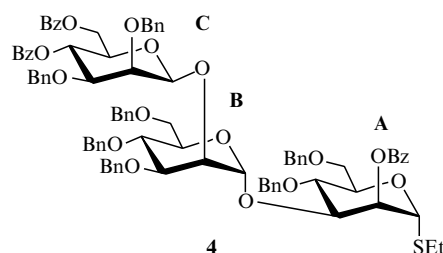
Рис. 5. Импульсная последовательность GATED-эксперимента. P_α — возбуждающий электромагнитный импульс на частоте ядер ^{13}C , генерируемый передатчиком спектрометра; BB — радиочастотное излучение малой мощности, воздействующее на весь диапазон резонанса ядер ^1H ; t_{rel} — релаксационная задержка; ССИ — спад свободной индукции, регистрируемый приемником спектрометра в течение времени t_1 .³²

станты $^2J_{\text{C,H}}$, $^3J_{\text{C,H}}$ из-за их слишком малых величин. Спектр позволяет также определить величину константы $^1J_{\text{C}^3,\text{H}^3}$ (144.2 Гц), однако нахождение точных величин $^3J_{\text{C,H}}$ затруднено высоким уровнем шума в спектре (рис. 6, *d*).

Недостатком эксперимента GATED при определении констант $J_{\text{C,H}}$ является сложность интерпретации его спектра. Как правило, каждый атом углерода в молекуле связан спин-спиновым взаимодействием с несколькими (N) протонами, поэтому его сигнал оказывается расщепленным на 2^N компонент. В структуре олиго- и полисахаридов содержатся большие группы (десятки и даже сотни) неэквивалентных атомов углерода, каждому из которых соответствует несколько линий (за счет расщеплений) в спектре GATED, что делает последние трудноинтерпретируемыми без допол-

нительных экспериментов. Поэтому в случае больших олигосахаридов и полисахаридов для определения прямых констант $^1J_{\text{C,H}}$ обычно используют двумерные эксперименты HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)^{48, 53} и HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) (методы ЯМР, основанные на возбуждении и регистрации гетероядерной многоквантовой или одноквантовой когерентности соответственно).^{49, 53} В отличие от спектров GATED в двумерных спектрах HMQC и HSQC, зарегистрированных в режиме «без развязки», информация по химическим сдвигам ядер ^{13}C и константам $^1J_{\text{C,H}}$ находится в разных измерениях.

На рис. 7 представлен фрагмент спектра HSQC синтетического триманнозида **4**, который содержит корреляционные пики, отвечающие взаимодействию атомов углерода C^1 и протонов H^1 (см.⁵⁴).



Спектр был зарегистрирован в режиме «без развязки» и позволил определить величины констант $^1J_{\text{C}^1,\text{H}^1}$ для маннопиранозных остатков **A**, **B** и **C**, равные 168, 170 и 155 Гц соответственно. При этом для остатков **A** и **B** величины $^1J_{\text{C}^1,\text{H}^1} \geq 168$ Гц, а для остатка **C** $^1J_{\text{C}^1,\text{H}^1} < 165$ Гц. Таким образом, однозначно установлено, что остатки **A** и **B** имеют

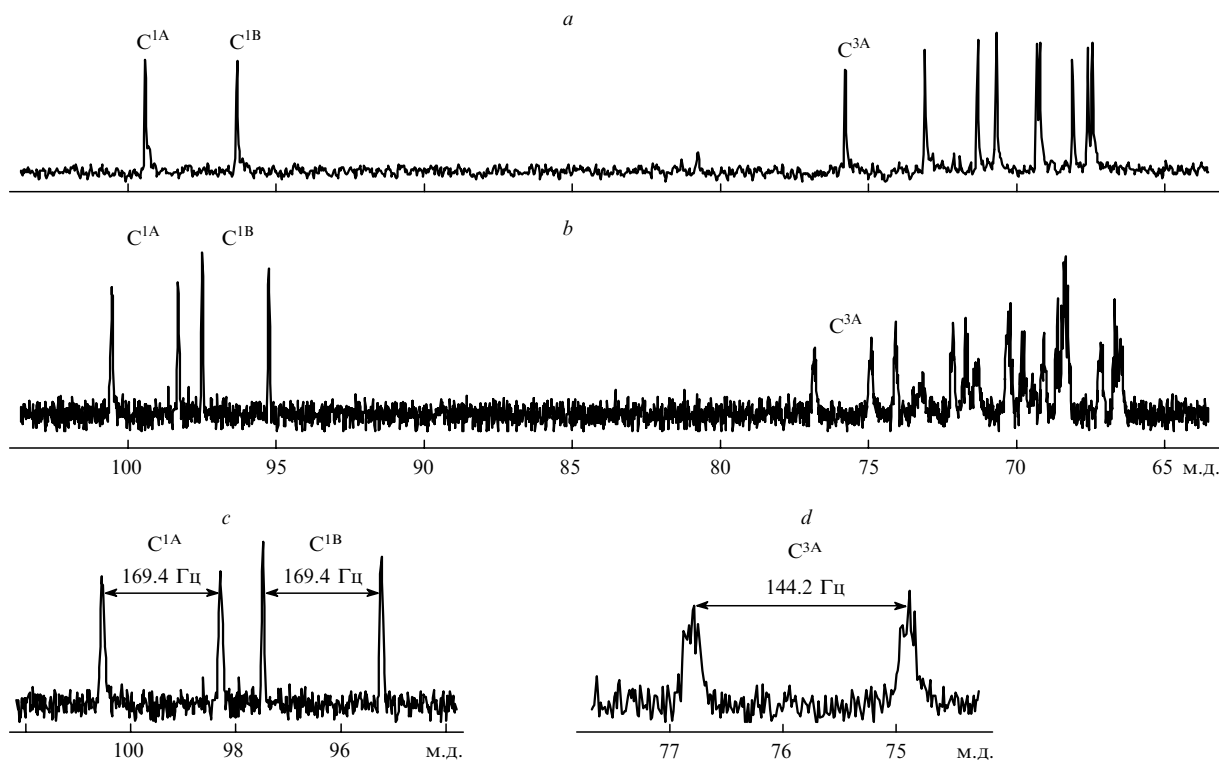


Рис. 6. Спектры ЯМР ^{13}C пропил-(1→3)-дифукозида (**3**) (спектрометр 500 МГц, D_2O , 303 К).

a — спектр с широкополосной «развязкой» от протонов; *b* — спектр GATED; *c* — фрагмент спектра GATED, содержащий сигналы атомов углерода $\text{C}^{1\text{A}}$ и $\text{C}^{1\text{B}}$, расщепленные за счет КССВ $^1J_{\text{C}^1,\text{H}^1}$ (169.4 Гц); *d* — фрагмент спектра GATED, содержащий сигнал атома углерода $\text{C}^{3\text{A}}$.

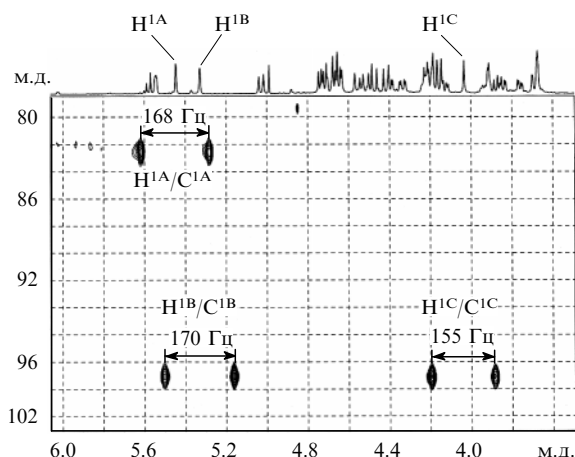


Рис. 7. Фрагмент спектра HSQC (зарегистрирован в режиме «без развязки», спектрометр 500 МГц, CDCl_3 , 303 К) синтетического триманнозида **4**.⁵⁴ Представлена область взаимодействия атомов углерода C^1 и протонов H^1 .

α -конфигурацию, а остаток **C** — β -конфигурацию. Отметим, что определение аномерной конфигурации этих маннопиранозных остатков из величин вицинальных протон-протонных констант ($^3J_{\text{H}^1, \text{H}^2}$), не представляется возможным из-за перекрытия допустимых диапазонов для $J_{\text{a,e}}$ и $J_{\text{e,e}}$ (см. рис. 4).

Спектры HMQC и HSQC различаются лишь тем, что в первом корреляционные пики расщеплены вдоль вертикальной оси (F1-измерение) за счет протон-протонных КССВ $J_{\text{H,H}}$, а потому имеют более широкую форму в этом измерении. В результате спектр HMQC несколько хуже разрешен вдоль оси F1 по сравнению со спектром HSQC. Однако импульсная последовательность эксперимента HMQC содержит меньше импульсов и аппаратных задержек, а потому является более простой и менее требовательной к настройкам прибора.

Рассмотрим импульсную последовательность 2D-эксперимента HMQC (рис. 8). Сначала на систему действует неселективный 90° -ный импульс (P_{90}) на частоте протонов, который переводит их векторы намагниченности (рис. 9) в плоскость xu . Далее в течение временного интервала Δ происходит эволюция системы под действием химических сдвигов ядер ^1H и КССВ (как гомоядерных $J_{\text{H,H}}$, так и гетероядерных $J_{\text{C,H}}$). При этом длительность задержки Δ выбирается таким образом, чтобы намагниченности, обусловленные прямыми константами $^1J_{\text{C,H}}$, находились в противофазе: $\Delta = 1/(2 \cdot ^1J_{\text{C,H}})$. Обычно в HMQC-эксперименте Δ задается равной 3.3 мс, что отвечает средней

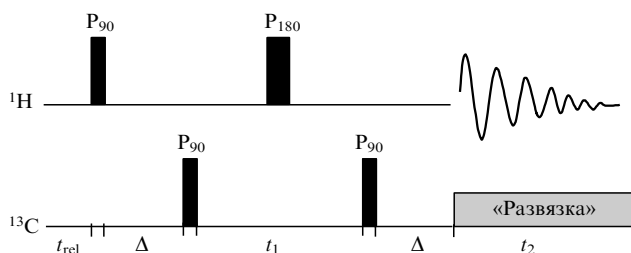


Рис. 8. Импульсная последовательность 2D-эксперимента HMQC (пояснения см. в тексте).

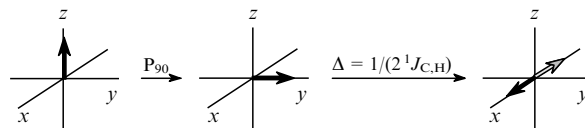


Рис. 9. Эволюция намагниченности ядра ^1H на первой стадии эксперимента HMQC.

Длительность задержки Δ выбирается таким образом, чтобы обеспечить расположение в противофазе намагниченностей протонов, обусловленных КССВ $^1J_{\text{C,H}}$, что необходимо для дальнейшего развития многоквантовой когерентности.

величине константы $^1J_{\text{C,H}}$ в органических молекулах 150 Гц. Это условие необходимо для последующего генерирования гетероядерной многоквантовой когерентности посредством действия 90° -ного импульса на частоте ядер ^{13}C (см. рис. 8), переводящего векторы намагниченностей ядер ^{13}C также в плоскость xu .

Гетероядерная многоквантовая когерентность характеризуется состоянием системы, когда намагниченности ядер обоих типов (^1H и ^{13}C) находятся в поперечной плоскости.⁵³ Представляет интерес развитие многоквантовой когерентности в течение времени эволюции t_1 , но корректное описание этой когерентности в рамках векторной модели невозможно. Известно, что гетероядерная многоквантовая когерентность развивается под действием химических сдвигов как протонов, так и ядер ^{13}C , однако ее особенностью является то, что она не развивается под действием «активных» констант $^1J_{\text{C,H}}$. Напомним, что в 2D-спектре HMQC в F1-измерении не содержится информации о химических сдвигах ядер ^1H , что достигается рефокусировкой их намагниченности, образовавшейся за время эволюционного периода t_1 , посредством 180° -ного импульса на частоте протонов в середине периода t_1 (создание спинового эха). На эволюцию химических сдвигов ядер ^{13}C этот импульс не действует, поэтому химические сдвиги ядер ^{13}C обеспечивают частотную разметку F1-измерения двумерного спектра. В конце периода t_1 на систему действует заключительный 90° -ный импульс на частоте ядер углерода, который выводит их намагниченности из плоскости xu , в то время как намагниченности протонов остаются в этой плоскости. При этом протонные намагниченности, «связанные» между собой константами $^1J_{\text{C,H}}$, опять оказываются в противофазе. Для их рефокусировки в конце импульсной последовательности HMQC встроена вторая задержка Δ (по длительности равная первой задержке Δ), по прошествии которой протонные намагниченности регистрируются в виде ССИ за время t_2 . Результатом двойного фурье-преобразования полученного массива данных является спектр 2D HMQC, корреляции в котором возникают между атомами ^1H и ^{13}C , связанными прямой КССВ $^1J_{\text{C,H}}$. При этом корреляционные сигналы вдоль протонной оси (F2-измерение) расщеплены в дублеты на величины, равные величинам $^1J_{\text{C,H}}$ (см. рис. 7). Если информация о величинах $^1J_{\text{C,H}}$ является избыточной, то 2D HMQC-эксперимент регистрируют в режиме «развязки», что позволяет повысить чувствительность эксперимента за счет слияния компонентов мультиплетных сигналов в синглеты. В этом случае во время регистрации ССИ протонов ядра ^{13}C системы подвергают широкополосному облучению электромагнитным полем, генерируемым передатчиком спектрометра (см. рис. 8). Отметим, что именно спектры 2D HMQC, зарегистрированные в режиме «развязки», используют для определения величин гомоядерных КССВ $J_{\text{H,H}}$.

Вторая задержка Δ в конце импульсной последовательности НМРС (см. рис. 8) позволяет также рефокусировать влияние химических сдвигов ядер ^1H , существующее в течение первой задержки Δ (в начале импульсной последовательности НМРС). Напомним, что в течение первой задержки Δ происходит эволюция системы не только под действием обсуждаемых прямых констант $^1J_{\text{C,H}}$, но и под действием химических сдвигов ядер ^1H и гомоядерных констант $J_{\text{H,H}}$. Однако влияние констант $J_{\text{H,H}}$ на намагниченность ядер ^1H не может быть устранено, поэтому корреляционные пики в спектре НМРС расщеплены за счет $J_{\text{H,H}}$ вдоль оси F1. Как уже было сказано, данное расщепление отсутствует в спектрах HSQC, которые по этой причине лучше разрешены в измерении F1.

Основной проблемой эксперимента НМРС является подавление сигналов $^1\text{H}-^{12}\text{C}$, которые могут закрывать искомые корреляционные пики, обусловленные константами $^1J_{\text{C,H}}$. Применение новых методов градиентной спектроскопии^{55,56} позволило проводить эффективное подавление ненужных компонент намагниченностей (когерентностей) в ходе импульсных последовательностей экспериментов ЯМР. Так, применение импульсных градиентов поля в ходе эксперимента НМРС позволяет полностью уничтожить сигналы $^1\text{H}-^{12}\text{C}$ (см.⁵³).

Еще один тип КССВ, которые часто используют в структурном анализе олиго- и полисахаридов, — это вицинальные протон-углеродные константы ($^3J_{\text{C,H}}$). Как уже было сказано, конформации дисахаридных фрагментов определяются в первую очередь величинами торсионных углов φ и ψ при гликозидных связях (см. рис. 1). При этом каждому углу может быть поставлена в соответствие вицинальная КССВ: углу φ отвечает константа J_φ во фрагменте $^{13}\text{C}^n-\text{O}-\text{C}^1-\text{H}^1$, углу ψ — константа J_ψ во фрагменте $^{13}\text{C}^1-\text{O}-\text{C}^n-\text{H}^n$.

Угловая зависимость Карплуса является универсальной для всех магнитных ядер и, в частности, для спин-спинового взаимодействия ядра ^{13}C и протона через три связи во фрагментах $^{13}\text{C}-\text{X}-\text{Y}-^1\text{H}$, где X и Y — любые атомы.⁵⁷ Для структурной химии олиго- и полисахаридов, как мы уже видели, наиболее важны константы $^3J_{\text{C,H}}$ через атом кислорода во фрагменте $^{13}\text{C}-\text{O}-\text{C}-^1\text{H}$. Сопоставляя данные ЯМР по константам $^3J_{\text{C,H}}$ для разнообразных углеводов, в которых фрагменты $^{13}\text{C}-\text{O}-\text{C}-^1\text{H}$ существуют в одной предпочтительной конформации, и значения торсионных углов в кристаллических структурах этих молекул, определенным методом PCA, авторы работы²⁸ получили уравнение Карплуса (5) для указанного фрагмента (рис. 10).

$$J_\theta = 5.5 \cos^2 \theta - 0.7 \cos \theta + 0.6, \quad (5)$$

где $\theta = \varphi$ или ψ , $J_\theta = J_\varphi$ или J_ψ .

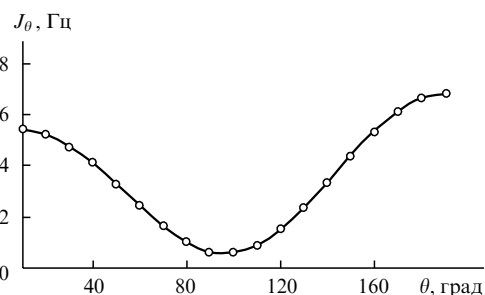
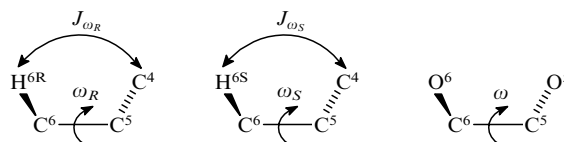


Рис. 10. Зависимость константы J_θ от двугранного угла фрагмента $^{13}\text{C}-\text{O}-\text{C}-^1\text{H}$ в углеводах (см. уравнение (5)).²⁸

Таким образом, зная экспериментальные величины констант J_φ и J_ψ и используя уравнение (5), можно рассчитать величины торсионных углов φ и ψ при гликозидных связях, что открывает путь к конформационному анализу олиго- и полисахаридов. При этом надо принимать во внимание, что наблюдаемые величины констант J_φ и J_ψ являются усредненными по ансамблю допустимых конформеров гликозидной связи. Отметим также, что для фрагмента $^{13}\text{C}-\text{O}-\text{C}-^1\text{H}$ углеводов были получены^{29,30} и другие уравнения, близкие к уравнению (5).

В случае (1→6)-связанных дисахаридных фрагментов (см. рис. 1 и 11) углам φ и ψ отвечают константы J_φ и J_ψ , описываемые уравнением (5), а углу ω могут быть поставлены в соответствие гетероядерные константы $^3J_{\text{H}^{6\text{R}},\text{C}^4}$ и $^3J_{\text{H}^{6\text{S}},\text{C}^4}$ (уравнение (6)⁵⁸) или гомоядерные константы $^3J_{\text{H}^{6\text{R}},\text{H}^5}$ и $^3J_{\text{H}^{6\text{S}},\text{H}^5}$ (уравнения (4) или (7), (8)⁵⁹); уравнения (7), (8) специально адаптированы для расчета констант $^3J_{\text{H,H}}$, отвечающих гидроксиметильной группе гексопиранозных остатков.



$$J_{\omega'} = 8.06 \cos^2 \omega' - 0.87 \cos \omega' + 0.47, \quad \omega' = \omega_R \text{ или } \omega_S, \quad (6)$$

$$^3J_{\text{H}^{6\text{R}},\text{H}^5} = 5.08 + 0.47 \cos \omega + 0.90 \sin \omega - 0.12 \cos(2\omega) + 4.86 \sin(2\omega), \quad (7)$$

$$^3J_{\text{H}^{6\text{S}},\text{H}^5} = 4.92 - 1.29 \cos \omega + 0.05 \sin \omega + 4.58 \cos(2\omega) + 0.07 \sin(2\omega). \quad (8)$$

Отметим, что функции, отвечающие уравнениям (5)–(8), являются периодическими, а потому одному экспериментальному значению константы J может отвечать несколько величин торсионных углов. Неправильные величины углов обычно удаётся исключить на основании данных теоретического конформационного анализа.

Как уже было сказано, определение величин $^3J_{\text{H,H}}$ обычно не вызывает затруднений. Для определения величин $^3J_{\text{C,H}}$ используют эксперименты ЯМР GATED,³² HMBC,^{51,60–63} HSQMBC,^{64,65} 2D J -спектроскопию,^{66,67} а также эксперименты типа E.COSY,^{45,46} X-отфильтрованный NOESY, TOCSY и RELAY COSY.^{68–70} Остановимся более подробно на принципах этих экспериментальных протоколов, обсудим их преимущества и недостатки, рассмотрим конкретные примеры их применения для определения КССВ $^3J_{\text{C,H}}$.

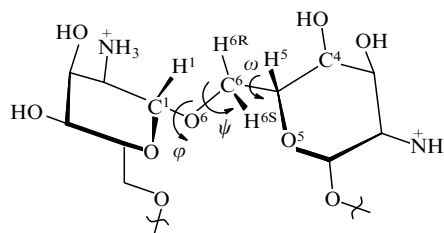


Рис. 11. Торсионные углы φ , ψ и ω в ди- β -(1→6)-глюкозаминовом фрагменте, являющемся основным структурным элементом поли(N-ацетилглюкозамина) — внеклеточного полисахарида (адгезина), продуцируемого *Staphylococcus aureus* и рядом других бактерий.¹⁴

Спектр GATED содержит информацию не только о прямых константах $^1J_{C,H}$, но и о дальних константах $^nJ_{C,H}$ (где $n \geq 2$). На рис. 6,d представлен фрагмент спектра GATED (1→3)-фукобиозида, содержащий сигнал гликозилированного атома углерода C^{3A} . Этот сигнал расщеплен в мультиплет за счет спин-спиновых взаимодействий между этим атомом углерода и протонами H^{3A} ($^1J_{C,H}$), H^{1A} ($^3J_{C,H}$) и H^{1B} ($^3J_{C,H}$) гликозилирующего остатка. В показанном спектре GATED хорошо определяется большая по величине константа через одну связь между атомом углерода C^{3A} и протоном H^{3A} ($^1J_{C,H} = 144.2$ Гц). Однако точное определение малых по величине констант через три связи ($^3J_{C,H}$) оказывается невозможным из-за высокого уровня шума в спектре.

Информация о дальних константах $^nJ_{C,H}$ может быть также получена из экспериментов типа НМВС (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation), позволяющих выявлять гетероядерные корреляции через несколько связей.^{53, 71} В 2D-спектре НМВС (рис. 12) по осям F2 и F1 отложены химические сдвиги 1H и ^{13}C соответственно, а корреляции в спектре находят на пересечении координат, отвечающих химическим сдвигам ядер, которые связаны дальними КССВ. Эксперимент НМВС, пожалуй, наиболее удобен для определения гетероядерных дальних спин-спиновых взаимодействий, поскольку содержит информацию обо всех взаимодействиях такого рода, имеющихся в молекуле. При этом в отличие от спектра GATED данные в спектре НМВС представлены в двух измерениях, что уменьшает вероятность перекрытия сигналов.

Импульсная последовательность 2D-эксперимента НМВС (рис. 13) подобна импульсной последовательности 2D-эксперимента НМҚС (см. рис. 8) за исключением двух моментов. Во-первых, в методе НМВС длительность задержки (Δ) существенно больше. Она выбирается так, чтобы образовать противофазное расположение намагниченностей, обусловленных малыми дальними константами $^nJ_{C,H}$. Как правило, $^nJ_{C,H} < 8$ Гц, поэтому задержка Δ должна быть как минимум 60 мс ($1/2 \ ^nJ_{C,H}$).⁵³ Во-вторых, с

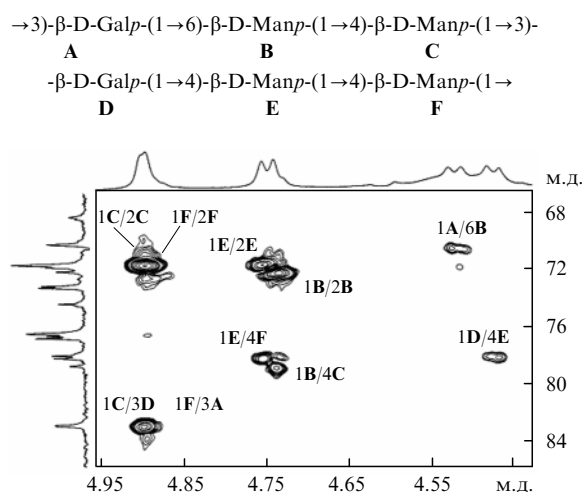


Рис. 12. Фрагмент спектра 1H – ^{13}C НМВС (спектрометр 500 МГц, D_2O) полисахарида клеточной стенки актиномицета *Kineosporia aurantiaca* VKM Ас-702^T (см. 72).

Корреляционные сигналы, присутствующие в спектре, отражают взаимодействия аномерных протонов полисахарида, характеризующиеся дальними константами $^nJ_{C,H}$. Цифры до и после косой черты относятся к атомам H и ^{13}C соответственно остатков А–F.

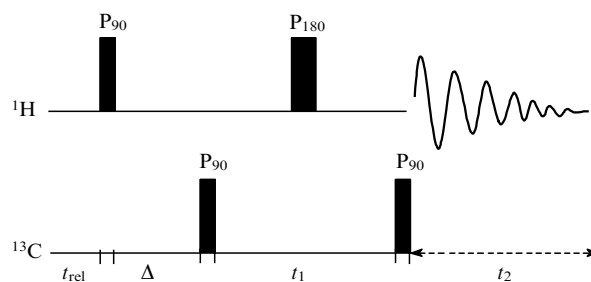


Рис. 13. Импульсная последовательность эксперимента 2D НМВС (пояснения см. в тексте).

целью уменьшения потери чувствительности эксперимента НМВС за счет релаксационных процессов в конце его импульсной последовательности отсутствует вторая рефокусирующая задержка Δ . Это обуславливает искажение фазы сигналов, поэтому спектры НМВС обычно представляют в виде нефазочувствительного спектра мощности. Хотя задержка Δ и выбирается исходя из величин дальних КССВ, иногда задержки, характеризующие прямые взаимодействия ($1/2 \ ^1J_{C,H}$), оказываются пропорциональными величине Δ . В этих случаях корреляции, обусловленные прямыми константами $^1J_{C,H}$, также проявляются в спектре, однако они расщеплены в дублеты вдоль F2-оси, так как в НМВС-эксперименте ССИ протонов регистрируется без «развязки» от ядер ^{13}C . Подавление прямых констант $^1J_{C,H}$ может быть достигнуто с помощью низкочастотного J-фильтра (LPJF-фильтр, от английского low-pass J-filter),⁷³ который гасит модуляции, обусловленные КССВ, с частотами больше заданной (в нашем случае это частота 125 Гц, так как для органических молекул $^1J_{C,H} \geq 125$ Гц). В зависимости от требуемой полосы фильтрации используются LPJF-фильтры с числом ступеней от 1 до 3.

Спектр НМВС дает информацию о протонах и ядрах ^{13}C , связанных дальними константами $^nJ_{C,H}$, однако в нем не содержится информации о величинах этих констант. На основе импульсной последовательности НМВС были разработаны эксперименты, позволяющие определять величины дальних констант $^nJ_{C,H}$. Одним из таких экспериментов является 2D J-НМВС.^{51, 61} Спектр 2D J-НМВС (рис. 14) имеет такой же формат, как и обычный спектр 2D НМВС, за исключением того, что корреляционные пики, обусловленные дальними взаимодействиями, в спектре 2D J-НМВС расщеплены в дублеты вдоль ^{13}C -оси (F1-измерение). Величины расщеплений пропорциональны величинам дальних констант $^nJ_{C,H}$, обуславливающих появление этих корреляций. Коэффициент пропорциональности k , определяющий величину расщепления пиков, зависит от условий эксперимента и равен

$$k = \frac{\Delta}{t_1^{\max}},$$

где $t_1^{\max}$ — максимальная длительность эволюционного периода t_1 (рис. 15). При этом величина Δ должна отвечать наименьшей величине дальней константы $^nJ_{C,H}^{\min}$, которую нужно точно измерить, т.е.

$$\Delta = \frac{1}{2 \ ^nJ_{C,H}^{\min}}.$$

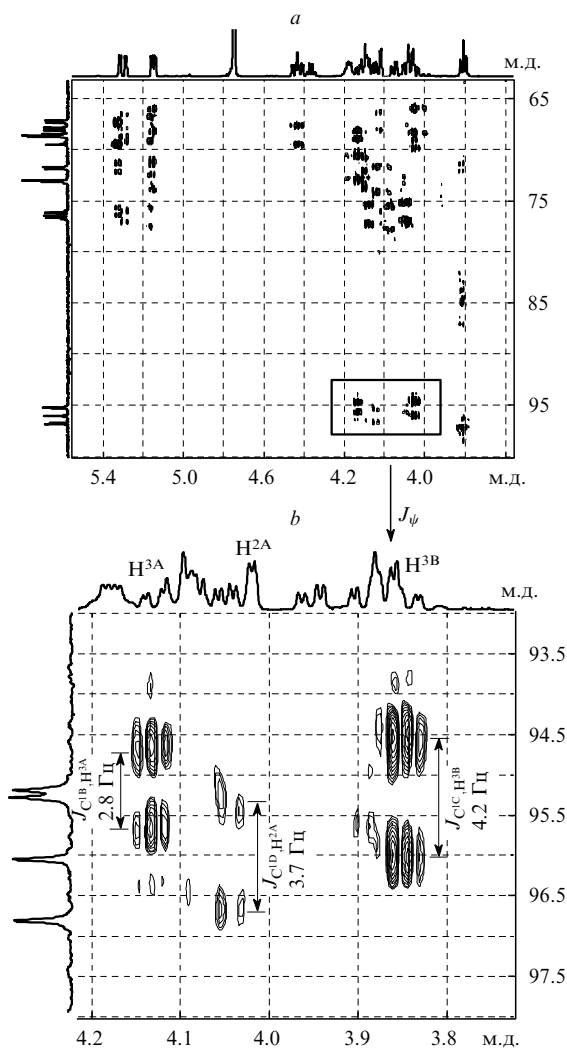


Рис. 14. Применение эксперимента 2D J-NMBC для определения величин дальних констант ${}^nJ_{C,H}$ (см.⁷⁴).

a — спектр J-NMBC сульфатированного тетрафукозида **5** (спектрометр 500 МГц, D₂O, 303 К). В данном спектре корреляции расщеплены вдоль оси ¹³C в дублеты (масштабирующий коэффициент $k = 34$); *b* — фрагмент спектра J-NMBC тетрафукозида **5**, позволивший определить величины констант J_ψ для трех гликозидных связей молекулы.

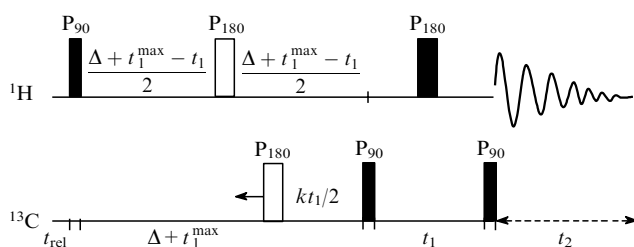


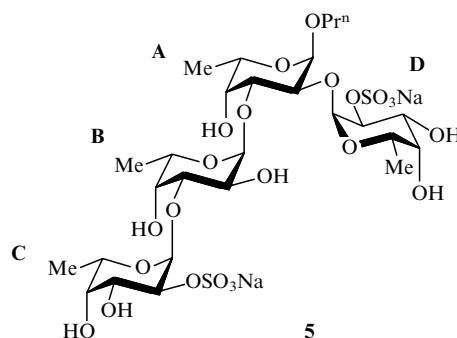
Рис. 15. Импульсная последовательность эксперимента 2D J-NMBC (пояснения см. в тексте).^{51,61}

Приведенный на рис. 14 спектр 2D J-NMBC сульфатированного тетрафукозида **5** позволил определить величины большинства трансгликозидных констант J_ϕ и J_ψ в молекуле (табл. 4).⁷⁴

Таблица 4. Экспериментальные (спектрометр 500 МГц, D₂O, 303 К)^a и рассчитанные значения трансгликозидных констант J_ϕ и J_ψ для сульфатированного тетрафукозида **5**.⁷⁴

Дисахаридный фрагмент	J_ϕ , Гц		J_ψ , Гц	
	эксперимент	расчет	эксперимент	расчет
→3)-α-L-Fuc-(1→3)-α-L-Fuc-OPr ⁿ	4.4 ^b	3.5	2.8	3.0
→3)-α-L-Fuc-(1→3)-α-L-Fuc-(1→	3.7	3.4	4.2	3.7
α-L-Fuc-(1→2)-α-L-Fuc-OPr ⁿ	2.3	2.7	3.7	3.3

^a Большинство констант определены из спектра 2D J-NMBC (рис. 14). ^b Величина константы определена из 2D J_ψ -спектра (его описание см. далее). Определение этой величины из спектра 2D J-NMBC невозможно из-за перекрытия сигналов.



Проведенный для этого соединения⁷⁴ теоретический конформационный анализ методом молекулярной механики (силовое поле MM3) показал существование двух конформеров для (1→3)-связей и одного конформера — для (1→2)-связи. На основании данных теоретического моделирования были рассчитаны среднестатистические значения констант (см. табл. 4). Сопоставление экспериментальных и рассчитанных величин J_ϕ и J_ψ показывает хорошее согласие (расхождение не превышает 1 Гц), что свидетельствует о достоверности данных теоретического конформационного анализа. Таким образом, совместный анализ экспериментальных и теоретических данных позволил определить конформационные характеристики тетрафукозида **5**.

Импульсная последовательность эксперимента 2D J-NMBC (см. рис. 15) отличается от последовательности 2D NMBC (см. рис. 13) наличием дополнительных 180°-ных импульсов на частотах протонов и ядер ¹³C, действующих во время задержки Δ. Моменты их приложения изменяются пропорционально изменению периода t_1 по ходу 2D-эксперимента. Для выделения желаемых намагниченностей и устранения намагниченностей, вызванных неидеальностью 90°- и 180°-ных импульсов, эксперимент 2D J-NMBC проводят с использованием импульсных градиентов поля **B**₀.^{51,55}

В литературе описаны и другие методики измерения дальних констант ${}^nJ_{C,H}$,^{60,62,63} основанные на последовательности NMBC и родственные эксперименту J-NMBC,^{51,61} однако они либо менее удобны практически, либо требуют дополнительных вычислений для получения необходимой информации по величинам констант. Забегая вперед, отметим, что из всех известных на сегодняшний день экспериментов для определения дальних констант ${}^nJ_{C,H}$ эксперимент J-NMBC, по нашему мнению, является наиболее удобным и универсальным.

Спектр 2D HSQMBC (Heteronuclear Single Quantum Multiple-Bond Correlation, гетероядерная корреляция через несколько связей, генерируемая посредством одноквантовой

когерентности)^{64,65} (рис. 16,а) имеет тот же формат, что и спектр 2D HMBC. В нем по осям F2 и F1 отложены химические сдвиги ^1H и ^{13}C соответственно, а корреляционные пики в спектре отвечают парам ядер $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, связанным дальними константами $^nJ_{\text{C,H}}$. При этом спектр содержит информацию обо всех дальних спин-спиновых взаимодействиях $^{13}\text{C}/^1\text{H}$, имеющихся в молекуле. Однако для определения величин $^nJ_{\text{C,H}}$ из спектра 2D HSQMBC необходимо проводить анализ полной формы линии корреляций. На рис. 16 продемонстрировано определение констант $^3J_{\text{C}^{2\text{A}},\text{H}^{1\text{B}}}$ и $^2J_{\text{C}^{1\text{B}},\text{H}^{2\text{B}}}$ в сахарозе.⁶⁴ С этой целью из спектра 2D HSQMBC с помощью одномерных протонных спектров или сечений из спектра 2D HSQC проводилось моделирование формы корреляционных пиков, отвечающих этим константам. В спектре 2D HSQMBC корреляция C^i/H^j (между i -м атомом углерода и j -м протоном, связанными дальней константой $^nJ_{\text{C}^i,\text{H}^j}$) вдоль протонной оси (ось F2) расщеплена в мультиплет за счет дальней константы $^nJ_{\text{C}^i,\text{H}^j}$ и за счет протон-протонных констант $J_{\text{H}^i,\text{H}^k}$, которыми характеризуется протон H^j . При

этом константа $J_{\text{C}^i,\text{H}^j}$ обуславливает противофазное расположение сигналов в мультиплете, а константы $J_{\text{H}^i,\text{H}^k}$ — однофазное. Этот мультиплет может быть смоделирован исходя из соответствующего сигнала протонного спектра. Для этого необходимо сложить два спектра ЯМР ^1H (один из которых находится в противофазе), сдвинутых относительно друг друга на величину константы $J_{\text{C}^i,\text{H}^j}$. Таким образом, для определения константы $J_{\text{C}^i,\text{H}^j}$ с помощью методики 2D HSQMBC нужно смоделировать срез корреляции C^i/H^j с помощью двух протонных спектров. Величина сдвига одного спектра ЯМР ^1H относительно другого равна константе $J_{\text{C}^i,\text{H}^j}$.

Необходимость проведения дополнительного анализа формы линии сигналов делает эксперимент 2D HSQMBC менее удобным для определения дальних констант $^nJ_{\text{C,H}}$, чем эксперимент 2D J-HMBC. Однако эксперимент 2D HSQMBC может быть полезен в том случае, если определение констант с помощью эксперимента 2D J-HMBC невозможно из-за перекрывания корреляционных пиков в его

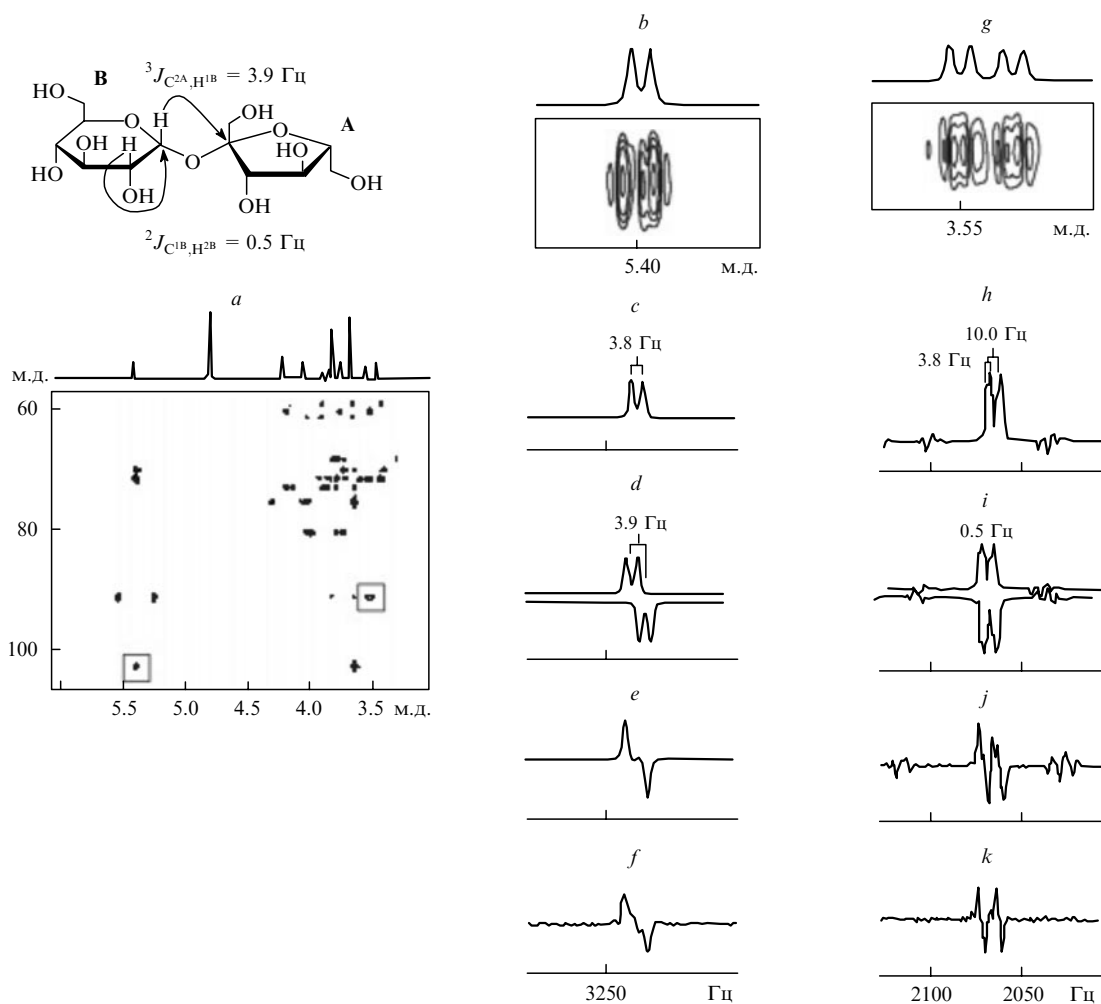


Рис. 16. Процедура определения дальних констант $^nJ_{\text{C,H}}$ из спектра 2D HSQMBC.⁶⁴

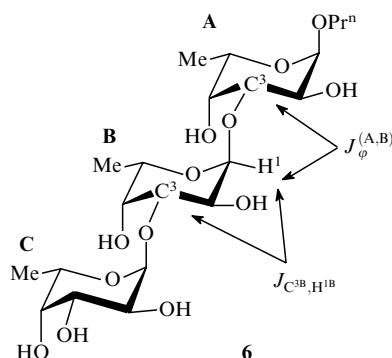
a — спектр 2D HSQMBC сахарозы (спектрометр 600 МГц, D_2O);⁶⁵ *b* — фрагмент спектра 2D HSQMBC, отражающий взаимодействие атомов $\text{C}^{2\text{A}}$ и $\text{H}^{1\text{B}}$; *c* — фрагмент спектра ЯМР ^1H , содержащий сигнал протона $\text{H}^{1\text{B}}$; *d* — два сигнала протона $\text{H}^{1\text{B}}$ в противофазе, сдвинутые относительно друг друга на величину гетероядерной константы $J_{\text{C}^{2\text{A}},\text{H}^{1\text{B}}}$, равной 3.9 Гц; *e* — результат сложения двух сдвинутых относительно друг друга дублетов, представленных на рис. *d*; *f* — горизонтальный срез корреляции $\text{C}^{2\text{A}}/\text{H}^{1\text{B}}$ из спектра 2D HSQMBC; *g* — фрагмент спектра 2D HSQMBC, отражающий взаимодействие атомов $\text{C}^{1\text{B}}$ и $\text{H}^{2\text{B}}$; *h* — срез из спектра 2D HSQC, содержащий сигнал протона $\text{H}^{2\text{B}}$; *i* — два сигнала протона $\text{H}^{2\text{B}}$ в противофазе, сдвинутых относительно друг друга на величину гетероядерной константы $J_{\text{C}^{1\text{B}},\text{H}^{2\text{B}}}$, равной 0.5 Гц; *j* — результат сложения двух сдвинутых относительно друг друга сигналов протона $\text{H}^{2\text{B}}$, представленных на рис. *i*; *k* — горизонтальный срез корреляции $\text{C}^{1\text{B}}/\text{H}^{2\text{B}}$ из спектра 2D HSQMBC.

спектре. Напомним, что в спектре 2D J-HMBC дальние константы ${}^nJ_{C,H}$ проявляются в расщеплении корреляционных пиков вдоль оси ${}^{13}C$ (измерение F1), поэтому этот спектр хуже разрешен вдоль оси ${}^{13}C$, чем спектр 2D HSQMBC, в котором константы проявляются вдоль оси 1H . Другое значимое преимущество эксперимента 2D HSQMBC состоит в том, что с его помощью можно достаточно точно определять величины $J_{C,H} < 2$ Гц, что затруднительно сделать из данных эксперимента 2D J-HMBC. Как показано на рис. 16, с помощью эксперимента 2D HSQMBC удалось определить величину константы ${}^2J_{C^{1B},H^{2B}}$, равную 0.5 Гц, для сахарозы. Для точного определения этой константы с помощью эксперимента 2D J-HMBC необходимо использовать задержку

$$\Delta = \frac{1}{2^n J_{C,H}^{\min}} = \frac{1}{2J_{C^1,H^2}} = \frac{1}{2 \cdot 0.5} = 1 \text{ с.}$$

Однако за такое время ($\Delta = 1$ с) намагниченность образца почти полностью исчезает (вследствие релаксации), поэтому чувствительность эксперимента 2D J-HMBC становится очень низкой.

В 2D селективном J-спектре^{66,67} (рис. 17) информация о дальних КССВ ${}^nJ_{C,H}$ и химических сдвигах ядер ${}^{13}C$ разнесена по разным измерениям двумерного спектра.



Для получения 2D селективного J-спектра сигнал одного из протонов системы подвергают предварительному облучению. При этом корреляционные пики, отвечающие атомам углерода ${}^{13}C$, связанным дальними КССВ с облучаемым протоном, оказываются расщепленными вдоль оси J (измерение F1) в дублеты на величины, равные величинам КССВ (см. рис. 17). Для облучения сигнала протона необходимо использовать высокоселективные импульсы, чтобы избежать возмущения резонансных линий спутников, обусловленных прямой КССВ ${}^1J_{C,H}$ (величины ${}^1J_{C,H}$ находятся в диапазоне 125–220 Гц). Высокая селективность импульса достигается за счет большого времени облучения сигнала (20–50 мс), что соответствует селективности 50–20 Гц,⁶⁶ и уменьшения его мощности. Таким образом, в ходе периода t_1 данного эксперимента модулируются только дальние константы ${}^nJ_{C,H}$, величины которых в случае олиго- и полисахаридов не превышают 10 Гц. Поэтому в 2D J-эксперименте в измерении F1 (измерение J) обычно используют маленькое спектральное окно $SW \leq 20$ Гц, что позволяет получить очень хорошее разрешение (при небольшом числе зарегистрированных точек по координате t_1) и измерить величины констант с высокой точностью. В случае трифукозида **6** с помощью J-спектра удалось определить трансгликозидную константу $J_{\phi}^{(A,B)} = 3.6$ Гц (см. рис. 17).^{75,76}

В последнее время появилась возможность использовать облучающие импульсы непрямоугольной формы,^{77–80} что

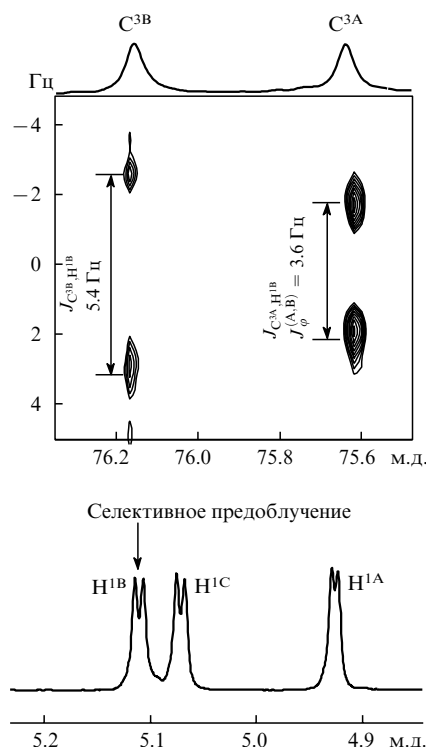


Рис. 17. Фрагмент 2D селективного J-спектра трифукозида **6** (спектрометр 500 МГц, D₂O, 303 К).⁷⁵ Содержащий корреляционные пики атомов углерода C^{3A} и C^{3B}.

Расщепление этих сигналов возникает за счет спин-спиновых взаимодействий с протоном H^{1B}, облучаемым в ходе эксперимента.

позволяет повысить их селективность. Импульс гауссовой формы^{77,78} (рис. 18) — один из наиболее часто используемых селективных импульсов. Этот импульс, в отличие от прямоугольного (см. рис. 18), в частотном представлении не обладает нежелательными «выглиями» на краях облучаемого диапазона и поэтому не возмущает сигналы соседних с облучаемым протонов.

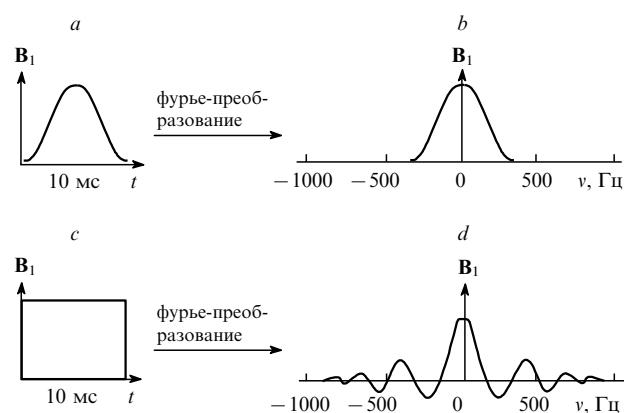


Рис. 18. Селективные импульсы гауссовой (a) и прямоугольной (c) формы и их фурье-образы (частотные представления) (b и d соответственно).

Для повышения чувствительности 2D J -эксперимента обычно используют ядерный эффект Оверхаузера, возникающий на ядрах ^{13}C при предоблучении протонов. Для этого в начале эксперимента в течение релаксационной задержки t_{rel} (порядка 1–5 с) все протоны системы подвергают облучению электромагнитным полем слабой мощности. Повысить чувствительность 2D J -эксперимента можно также за счет переноса поляризации с протонов на атомы углерода ^{13}C . Для этого в начало импульсной последовательности J -эксперимента встраивают последовательности DEPT,⁸¹ INEPT⁸² или PENDANT.⁶⁷

Преимуществом 2D селективного J -эксперимента является малое количество корреляционных пиков, присутствующих в спектре, что снижает вероятность их перекрывания. Каждому атому углерода, связанному дальней константой $^nJ_{\text{C,H}}$ с облучаемым протоном, отвечает только одно расщепление, обусловленное данной КССВ; при этом информация по химическим сдвигам ^{13}C и КССВ оказывается в разных измерениях (F2 и F1 соответственно). В некоторых случаях это помогает определять с помощью данного эксперимента величины $^nJ_{\text{C,H}}$, когда другие эксперименты неэффективны. Так, из спектра 2D J -HMBC трифукозида **6** удалось найти трансгликозидную константу $J_{\phi}^{(\text{B,C})} = J_{\text{C}^{3\text{B}},\text{H}^{1\text{C}}} = 3.8$ Гц (рис. 19), однако определить величину $J_{\phi}^{(\text{A,B})} = J_{\text{C}^{3\text{A}},\text{H}^{1\text{B}}}$ оказалось невозможно из-за перекрывания корреляционных пиков $\text{C}^{3\text{A}}/\text{H}^{1\text{B}}$ и $\text{C}^{3\text{B}}/\text{H}^{1\text{B}}$. Эта константа была определена с помощью 2D селективного J -спектра (см. рис. 17): $J_{\phi}^{(\text{A,B})} = 3.6$ Гц.

К недостаткам селективного J -эксперимента можно отнести наличие в его спектре информации о КССВ атомов углерода только с одним облучаемым протоном. Для определения величин КССВ с другим протоном эксперимент необходимо повторять с селективным импульсом на резонансной частоте соответствующего протона. Стоит также отметить несколько меньшую чувствительность данного эксперимента по сравнению с экспериментами GATED, J -HMBC и HSQMBC.

Описана⁶⁷ также импульсная последовательность инвертированного 2D селективного J -эксперимента (рис. 20), в котором по оси F2 расположен спектр ЯМР ^1H исследуемого соединения. При этом корреляционные пики, отвечающие протонам, которые непосредственно связаны с атомами ^{13}C , имеющими дальние КССВ с селективно облучаемым прото-

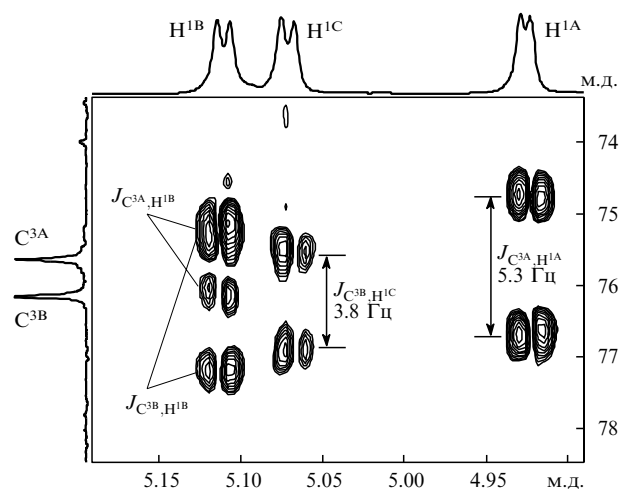


Рис. 19. Фрагмент спектра 2D J -HMBC трифукозида **6** (спектрометр 500 МГц, D_2O , 303 К),⁷⁵ отражающий взаимодействия атомов $\text{C}^{3\text{A}}$ и $\text{C}^{3\text{B}}$ с аномерными протонами $\text{H}^{1\text{A}}$, $\text{H}^{1\text{B}}$ и $\text{H}^{1\text{C}}$.

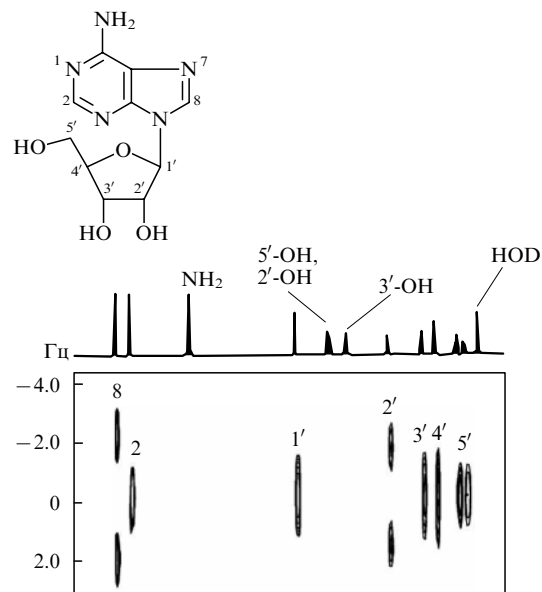


Рис. 20. Инвертированный 2D селективный J -спектр аденозина (спектрометр 400 МГц, DMCO-d_6 , 303 К).⁶⁷

Корреляции, отвечающие протонам $\text{H}^{2'}$ и H^8 , расщеплены в дублеты за счет спин-спиновых взаимодействий атомов $\text{C}^{2'}$ и C^8 с селективно инвертированным протоном $\text{H}^{1'}$.

ном, оказываются расщепленными в дублеты на величину этой КССВ.

Еще один класс экспериментов ЯМР, из которых может быть получена информация о дальних гетероядерных КССВ, — это эксперименты типа E.COSY^{45,46} (X-отфильтрованные 2D NOESY, TOCSY или RELAY COSY^{68–70}). В двумерных спектрах этих экспериментов кросс-пики, отвечающие взаимодействиям протонов, оказываются расщепленными за счет гетероядерных КССВ. При этом тип расщепления аналогичен расщеплению корреляций в спектрах E.COSY (рис. 21).

Например, в X-отфильтрованном эксперименте 2D NOESY^{68,69} кросс-пики оказываются расщепленными вдоль одной оси за счет прямой гетероядерной константы $^1J_{\text{X,H}}$ с одним из взаимодействующих протонов, а вдоль второй оси — за счет дальней константы $^nJ_{\text{X,H}}$ с другим взаимодействующим протоном. Как правило, прямые гетероядерные константы $^1J_{\text{X,H}}$ имеют большие значения, что

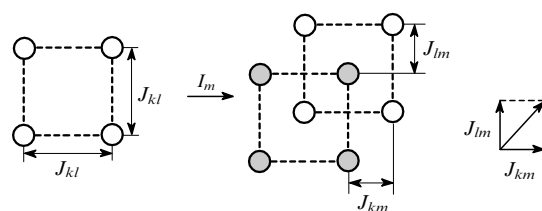


Рис. 21. Форма кросс-пиков в спектрах E.COSY.

Показан кросс-пик, отвечающий взаимодействию ядерных спинов I_k и I_l в трехспиновой системе $I_k I_l I_m$. Константа J_{kl} обуславливает расщепление кросс-пика на четыре компоненты, расположенные по вершинам квадрата. Этот квадрат реплицируется за счет КССВ J_{km} и J_{lm} между активными спинами k и l и пассивным спином m . Для определения величин КССВ J_{km} и J_{lm} из мультиплетности кросс-пика необходимо, чтобы хотя бы одна из этих КССВ имела большое значение, что обеспечит разрешение компонент кросс-пика относительно друг друга.

способствует разрешению компонент мультиплетов и, таким образом, позволяет определить малые величины дальних констант ${}^nJ_{\text{Х,Н}}$. Разделение прямых (${}^1J_{\text{Х,Н}}$) и дальних (${}^nJ_{\text{Х,Н}}$) гетероядерных констант в кросс-пиках протонных корреляционных спектров по разным осям (F1 и F2) вызвано тем, что намагниченность, обусловленная ЯЭО между двумя протонами, в период t_1 эволюционирует на частоте одного протона, а в период t_2 — на частоте другого.

Отметим, что для определения гетероядерных КССВ ${}^nJ_{\text{С,Н}}$ в случае олиго- и полисахаридов с помощью экспериментов E.COSY необходимо, чтобы образец был на 100% обогащен магнитным изотопом углерода ${}^{13}\text{C}$ по X-ядру. В противном случае в спектрах будет происходить перекрывание кросс-пиков, отвечающих ядрам изотопов углерода ${}^{13}\text{C}$ и ${}^{12}\text{C}$, что сделает невозможным определение дальних гетероядерных констант ${}^nJ_{\text{С,Н}}$. Однако при исследовании олиго- и полисахаридов редко приходится иметь дело с образцами, на 100% обогащенными изотопом ${}^{13}\text{C}$, поэтому на практике X-отфильтрованные эксперименты 2D NOESY, TOCSY и RELAY COSY редко употребляются при исследовании этих соединений, включая конформационный анализ.

Напомним, что гомоядерный эксперимент ${}^1\text{H} - {}^1\text{H}$ E.COSY,^{43,45,46} его модификация PE.COSY,^{43,47} а также гетероядерный эксперимент ${}^1\text{H} - {}^{13}\text{C}$ XLOC,^{50–52} в котором кросс-пики имеют форму, как в E.COSY-спектрах, могут быть использованы также для определения величин констант $J_{\text{Н,Н}}$.

IV. Современные методы регистрации ядерного эффекта Оверхаузера и особенности его использования в конформационном анализе олиго- и полисахаридов

Явление ядерного эффекта Оверхаузера заключается в изменении интенсивности сигнала ЯМР какого-либо ядра при насыщении резонанса другого ядра, взаимодействующего с первым по диполь-дипольному механизму.⁸³ Величина ЯЭО (f_k^d) определяется как отношение изменения интенсивности сигнала d в условиях насыщения ядра k к его интенсивности в отсутствие насыщения (уравнение (9a)).

$$f_k^d = \frac{I_d - I_d^0}{I_d^0}, \quad (9a)$$

где I_d^0 — интенсивность сигнала ядра d в спектре ЯМР в отсутствие насыщения резонанса ядра k , I_d — интенсивность сигнала d при насыщении резонанса ядра k . Интенсивности сигналов (I) в спектрах ЯМР прямо пропорциональны величинам продольной намагниченности ядер (S), поэтому выражение (9a) можно переписать в виде уравнения (9b):

$$f_k^d = \frac{S_d - S_d^0}{S_d^0}. \quad (9b)$$

Ядерный эффект Оверхаузера является следствием стремления системы взаимодействующих ядер перейти в состояние теплового равновесия после изменения заселенностей спиновых состояний ядра k . Этот процесс сопровождается перераспределением избыточной энергии на другие ядра системы, связанные диполь-дипольным взаимодействием, что и приводит к изменению интенсивностей сигналов необлученных ядер.

Таким образом, ЯЭО, в отличие от КССВ, может быть использован для исследования взаимного расположения в пространстве ядер, разделенных большим числом связей.

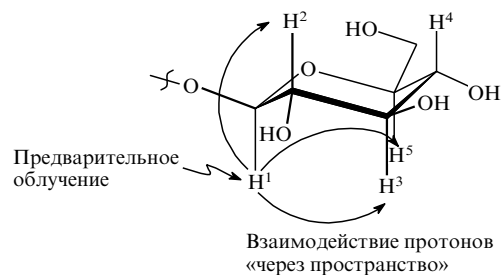


Рис. 22. Взаимодействия протонов в остатке β -L-глюкопиранозы, приводящие к ЯЭО при облучении протона H^1 .

В случае олиго- и полисахаридов величины ЯЭО могут быть использованы как для установления конфигурации моносахаридных остатков (исходя из величин ЯЭО между протонами одного кольца, рис. 22), так и для изучения конформаций этих молекул в растворе. В последнем случае наиболее значимыми оказываются величины ЯЭО между протонами, разделенными гликозидными связями (рис. 23). В конформационном анализе олиго- и полисахаридов наиболее часто изучают величины ЯЭО, возникающие на протонах гликозидированного остатка при предоблучении аномерного протона (H^1) гликозилирующего остатка (см. рис. 23). Из рисунка видно, что обнаруживаемые при этом межпротонные взаимодействия помогают делать наиболее полные выводы о конформациях дисахаридных фрагментов, входящих в структуру исследуемых веществ.

Импульсная последовательность эксперимента для регистрации ЯЭО между протонами отличается от последовательности обычного эксперимента ЯМР ${}^1\text{H}$ наличием длительного радиочастотного излучения малой мощности (CW) с частотой, соответствующей резонансу протона k (рис. 24).³² В этот промежуток времени (τ_s) в системе проис-

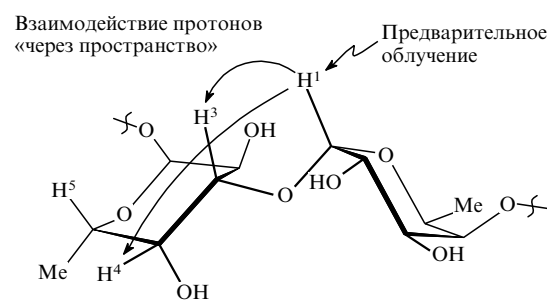


Рис. 23. Пример взаимодействия протонов из разных остатков дисахаридного фрагмента, приводящего к ЯЭО при облучении протона H^1 «гликозилирующего» остатка.

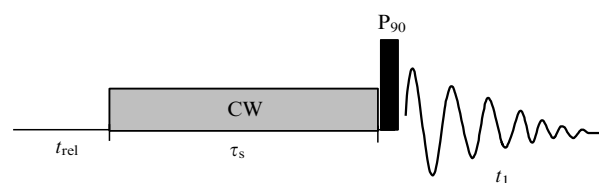


Рис. 24. Импульсная последовательность эксперимента для регистрации протонного ЯЭО (пояснения см. в тексте).⁸⁴

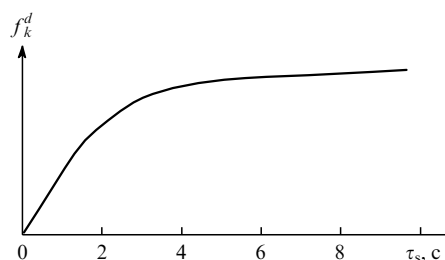


Рис. 25. Общий вид зависимости величины ЯЭО для протона d (f_k^d) от времени облучения протона k .

ходит развитие ЯЭО, что изменяет интенсивность детектируемых сигналов.

Для минимизации артефактов, возникающих в результате действия радиочастотного излучения (CW), на практике обычно имеют дело с разностными спектрами ЯЭО. Для этого сначала регистрируют спектр, в котором частота излучения (CW) соответствует частоте насыщаемого сигнала k , а затем регистрируют спектр, в котором частота излучения попадает на свободную от сигналов область спектра. Вычитанием этих двух спектров получают разностный спектр ЯЭО.

В зависимости от времени (τ_s) облучения протона k (см. рис. 24) изменяются величины ЯЭО, наблюдаемые на сигналах других протонов системы. Общий вид зависимости величины ЯЭО для протона d (f_k^d) от времени облучения протона k представлен на рис. 25. Из графика видно, что сначала с увеличением времени облучения ядра k происходит усиление ЯЭО, однако при больших временах облучения величина ЯЭО выходит на плато, что соответствует достижению системой нового состояния равновесия.

В зависимости от длительности времени облучения системы различают эксперименты по равновесному и неравновесному ЯЭО.⁸⁴ В случае равновесного ЯЭО возмущение разности заселенностей переходов ядра k происходит в течение столь длительного времени, что система успевает достигнуть нового состояния равновесия. Обычно требуется, чтобы время облучения в 2–3 раза превосходило самое большое время релаксации в молекуле (для протонов в производных углеводов это $\sim 7-9$ с).

Ноггл и Ширмер получили⁸³ уравнение, позволяющее рассчитывать величины межпротонных равновесных ЯЭО в молекулах:

$$f_k^d = \left\{ \left[\frac{6\tau_c}{1 + (2\omega_0\tau_c)^2} - \tau_c \right] / \left[\frac{3\tau_c}{1 + (2\omega_0\tau_c)^2} + \tau_c + \frac{6\tau_c}{1 + (2\omega_0\tau_c)^2} \right] \right\} \cdot \left(\sum_{j \neq d} \frac{r_{dk}^{-6}}{r_{dj}^{-6}} - \sum_{j \neq k, d} \frac{r_{dj}^{-6} f_k^j}{\sum_{j \neq d} r_{dj}^{-6}} \right), \quad (10)$$

где r_{dj} — расстояние между протонами d и j , τ_c — время изотропной вращательной корреляции.

Таким образом, величина равновесного ЯЭО (f_k^d) оказывается зависимой от нескольких факторов, в первую очередь от расстояния между насыщаемым протоном k и наблюдаемым протоном d (обратно пропорциональна r_{dk}^6), от времени корреляции протонов τ_c и Ларморовой частоты протонов ω_0 (рис. 26). Подчеркнем, что уравнение (10) было получено в предположении, что преобладающий вклад в релаксацию вносит внутримолекулярное диполь-дипольное взаимодействие протонов. Если в релаксацию существенный вклад

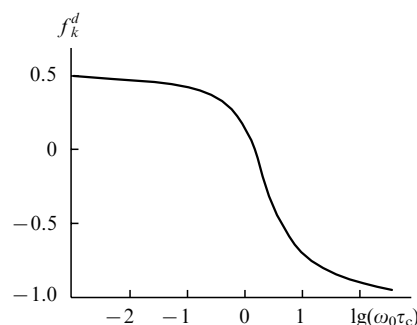


Рис. 26. Зависимость величины ЯЭО от произведения $\omega_0\tau_c$.⁸³

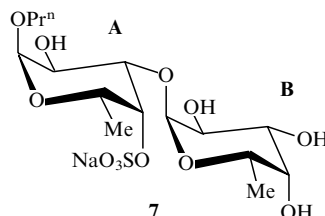
вносят другие механизмы, то реальная величина ЯЭО будет меньше рассчитанной по уравнению (10).

Для небольших органических молекул времена корреляции лежат в интервале $10^{-12} < \tau_c < 10^{-10}$ с; например, для моносахаридных остатков $\tau_c \approx 10^{-11}$ с, а для дисахаридов $\tau_c \approx 10^{-10}$ с. При частоте прибора 500 МГц Ларморова частота протонов $\omega_0 \approx 10^9$, поэтому $\omega_0^2\tau_c^2 \ll 1$. В этом случае выражение, стоящее в фигурных скобках уравнения (10), равно 0.5 и таким образом уравнение (10) упрощается:

$$f_k^d = \frac{r_{dk}^{-6}}{2 \sum_{j \neq d} r_{dj}^{-6}} - \sum_{j \neq k, d} \frac{r_{dj}^{-6} f_k^j}{2 \sum_{j \neq d} r_{dj}^{-6}}. \quad (11)$$

Для таких систем наблюдаются положительные ЯЭО, т.е. при насыщении резонанса протона k интенсивность сигнала наблюдаемого протона d увеличивается. В случае системы из двух взаимодействующих протонов величина $f_k^d = 0.5$ и не зависит от расстояния между облучаемым и наблюдаемым протонами. Величина $f_k^d = 0.5$ является максимальным положительным ЯЭО, который может достигаться в системе взаимодействующих протонов. Условие $\omega_0^2\tau_c^2 \ll 1$ называется условием предельного сужения, оно соответствует полному исчезновению диполь-дипольного уширения линий в спектрах ЯМР.

Величины равновесного ЯЭО были использованы авторами настоящего обзора для сравнительного конформационного анализа пропил-3-*O*-(α -L-фукопиранозил)- α -L-фукопиранозиды (3) и его C⁴-сульфатированного производного 7 (рис. 27).⁸⁵



С этой целью проводилось селективное насыщение резонанса протона H¹ гликозилирующего остатка, что приводило к возникновению ЯЭО на сигналах протонов H³, H⁴ и H⁵ гликозилируемого остатка A (рис. 27 и 28, табл. 5). Обнаружено, что сульфатирование OH-группы при C⁴ в дисахариде приводит к уменьшению величины ЯЭО для протона H⁴ с 88.8 до 41.5%. В то же время теоретический конформационный анализ, проведенный для этих соединений⁸⁵ и основанный на расчетах методом молекулярной механики (силовое поле ММ3), показал существование двух конформеров (I и II) для (1→3)-связанных дисахаридных фрагментов этих молекул (рис. 29). При этом переход от дисахарида 3 к сульфати-

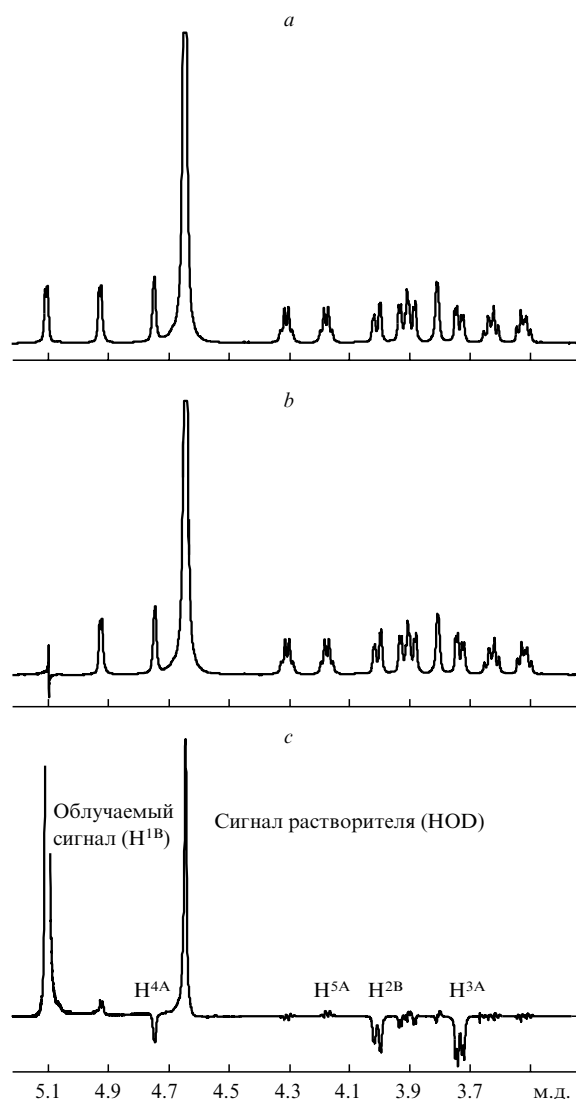


Рис. 27. Измерение равновесного ЯЭО в дифукозиде **7**.⁸⁵ *a* — спектр ЯМР ^1H дифукозида **7**, полученный с помощью импульсной последовательности эксперимента ЯЭО (см. рис. 24); радиочастотному облучению (CW) подвергалась свободная от сигналов область спектра; *b* — спектр равновесного ЯЭО дифукозида **7**, полученный в результате насыщения резонанса протона $\text{H}^{1\text{B}}$ в течение 7.2 с (спектрометр 500 МГц, D_2O , 307 К); *c* — разностный спектр ЯЭО, полученный вычитанием спектра *b* из спектра *a* (интенсивность спектра *c* для наглядности увеличена относительно спектров *a* и *b*). На спектре отмечены основные сигналы, обусловленные ЯЭО.

рованному дисахариду **7** сопровождался уменьшением доли конформера **I**. Величины ЯЭО, вычисленные из данных молекулярно-механических расчетов и уравнения (11), хорошо согласовались с экспериментальными величинами (см. табл. 5), что свидетельствует о достоверности результатов молекулярного моделирования.

Отметим особо, что в приведенном примере для протонов H^5 дифукозида **3** и его C^4 -сульфатированного производного **7** наблюдались отрицательные величины ЯЭО (см. табл. 5), что не характерно для прямых протон-протонных ЯЭО-взаимодействий в условиях предельного сужения ($\omega_0^2\tau_c^2 \ll 1$) и обусловлено спиновой диффузией.^{53,84} Дело в том, что в молекулах кроме прямых взаимодействий между парами протонов могут наблюдаться вторичные эффекты,

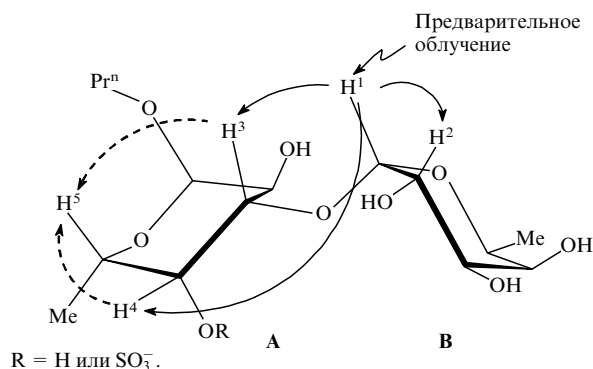


Рис. 28. Основные взаимодействия ЯЭО в дифукозиде **3** и C^4 -сульфатированном дифукозиде **7**, возникающие при насыщении резонанса протона H^1 гликозилирующего остатка **B**. Сплошными стрелками показаны прямые ЯЭО-взаимодействия (положительные), штриховыми стрелками — вторичные ЯЭО-взаимодействия (отрицательные).

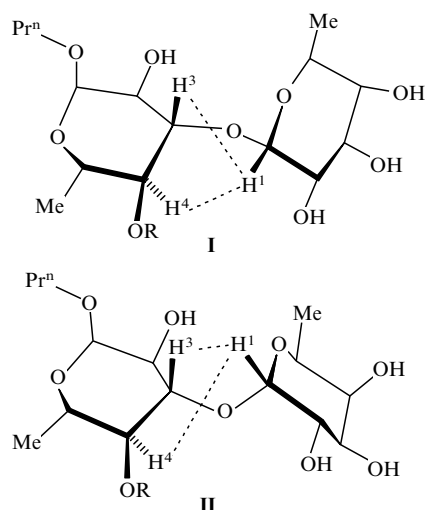
обусловленные передачей внесенного в молекулу возмущения по цепочке протонов. Так, в рассматриваемых дифукозидах **3** и **7** при преднасыщении резонанса протона H^1 гликозилирующего остатка (**B**) возникает изменение разности заселенностей уровней протонов H^3 и H^4 гликозилируемого остатка (**A**) (см. рис. 28), что приводит к возникновению положительного ЯЭО. Эти протоны, в свою очередь, оказывают влияние на протон H^5 (спиновая диффузия), что приводит к возникновению на нем ЯЭО противоположного знака. При этом прямой ЯЭО для протона H^5 практически не проявляется вследствие его удаленности от облучаемого протона H^1 . Кроме сигналов ЯЭО в спектре (см. рис. 27, *c*) присутствуют маленькие ложные сигналы, характерной особенностью которых является искаженная фаза. Появление этих сигналов обусловлено нестабильностью магнитного поля спектрометра во времени, а также неточной воспроизводимостью электромагнитных импульсов, что приводит к неидеальному вычитанию спектров *a* и *b*.

Для молекул средней величины может возникнуть ситуация, когда $\omega_0\tau_c \approx 1$ и ЯЭО не наблюдается вовсе ($f_k^d = 0$). Это означает, что сигнал рассматриваемого протона полностью исчезает в спектре ЯЭО. Действительно, при $\omega_0\tau_c = 1.118$ числитель в уравнении (10) равен нулю. При частоте прибора 500 МГц соответствующее значение τ_c составляет $3.5 \cdot 10^{-10}$ с.

Если $\omega_0^2\tau_c^2 \gg 1$ (этому условию удовлетворяет $\tau_c > 3.5 \cdot 10^{-10}$ с), выражение, стоящее в фигурных скобках в

Таблица 5. Экспериментальные (спектрометр 500 МГц, D_2O) и рассчитанные относительные величины равновесного ЯЭО, наблюдаемые на протонах гликозилируемого остатка в дифукозиде **3** и C^4 -сульфатированном дифукозиде **7** при насыщении в течение 7.2 с резонанса протона H^1 гликозилирующего остатка **B**.⁸⁵

Соединение	Протон	Величина ЯЭО, %	
		эксперимент	расчет
Дифукозид 3	H^3	100	100
	H^4	88.8	85.0
	H^5	–12.9	–14.1
C^4 -Сульфатированный дифукозид 7	H^3	100	100
	H^4	41.5	49.0
	H^5	–13.3	–11.9



R = H или SO₃⁻.

Рис. 29. Конформеры I и II, характерные для дифукозида 3 и его C⁴-сульфатированного производного 7.⁸⁵

уравнении (10), становится равным -1 и формула для расчета величины ЯЭО принимает следующий вид:

$$f_k^d = -\frac{r_{dk}^{-6}}{\sum_{j \neq d} r_{dj}^{-6}} + \sum_{j \neq k, d} \frac{r_{dj}^{-6} f_k^j}{\sum_{j \neq d} r_{dj}^{-6}}. \quad (12)$$

Таким образом, в растворах с большой вязкостью или в растворах больших молекул (больших олигосахаридов, полисахаридов и т.д.) наблюдаются отрицательные величины ЯЭО. Для системы из двух протонов в таких условиях $f_k^d = -1$, что представляет собой минимально возможное значение ЯЭО.

То обстоятельство, что первый член в уравнениях (11) и (12) значительно превышает составляющие второй суммы, открывает путь к определению величин ЯЭО методом итераций. Для этого на основании данных по расстояниям между протонами рассчитываются величины

$$\sum_{j \neq d} \frac{r_{dk}^{-6}}{r_{dj}^{-6}},$$

которые подставляются в полные уравнения ЯЭО (10)–(12), в результате чего находятся уточненные значения.

Чувствительность эксперимента по равновесному ЯЭО весьма высока. Серьезным недостатком этой методики является то, что она требует предварительного селективного облучения одной из резонансных линий в спектре ЯМР ¹H. Таким образом, методика измерения равновесного ЯЭО может быть с успехом использована лишь для молекул с хорошо разрешенными сигналами в спектре ЯМР ¹H.

В случае экспериментов по неравновесному ЯЭО используют времена облучения значительно короче необходимых для установления в системе нового состояния равновесия.⁸⁴ При этом обычно применяют импульсную последовательность, несколько отличающуюся от приведенной на рис. 24. Это так называемый эксперимент 1D NOESY (рис. 30).

На первом этапе эксперимента по неравновесному ЯЭО (см. рис. 30), как и в эксперименте по измерению равновесного ЯЭО, вносится возмущение в разность заселенностей энергетических уровней облучаемого ядра k . Однако в нерав-

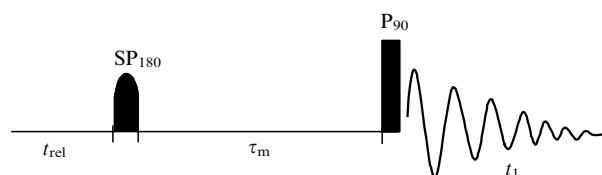


Рис. 30. Импульсная последовательность эксперимента 1D NOESY (пояснения см. в тексте).

новесных экспериментах ЯЭО производят инвертирование намагниченности ядра k (вектор намагниченности направляется вдоль оси $-z$), в отличие от равновесного метода ЯЭО, где происходит выравнивание заселенностей энергетических уровней ядра k (насыщение переходов ядра k). Инвертирование сигнала протона k достигается действием селективного 180°-ного импульса (SP₁₈₀) на частоте этого протона (ν_k). После действия селективного импульса в течение времени τ_m , называемого временем смешивания, происходит перераспределение возмущения, внесенного в заселенности энергетических уровней ядра k , на другие протоны системы (возникновение ЯЭО). Далее действием неселективного 90°-ного импульса (P₉₀) векторы намагниченностей протонов переводятся в плоскость xy , где они регистрируются в виде ССИ катушкой приемника спектрометра ЯМР.³² Отметим, что в одномерных экспериментах NOESY применяют селективный импульс прямоугольной формы (например, импульс гауссовой формы, см. рис. 18). Это позволяет в меньшей степени, чем в случае равновесных экспериментов ЯЭО, затрагивать сигналы, находящиеся по соседству с облучаемым, и тем самым измерять величины ЯЭО с более высокой точностью.

Общий вид зависимости величины неравновесного ЯЭО для протона d от времени смешивания τ_m представлен на рис. 31. Видно, что при малых временах τ_m зависимость носит линейный характер, как и зависимость на рис. 25. Начальный рост ЯЭО для ядра d пропорционален константе скорости кросс-релаксации (R_{kd}) между облучаемым (k) и наблюдаемым (d) протонами даже в мультиспиновой системе:

$$\frac{dS_d}{dt} \propto R_{kd}. \quad (13)$$

Константа скорости кросс-релаксации задается выражением

$$R_{kd} = \frac{1}{10} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \gamma^4 h^2 \left(\frac{6\tau_c}{1 + (2\omega_0\tau_c)^2} - \tau_c \right) \frac{1}{r_{kd}^6}, \quad (14)$$

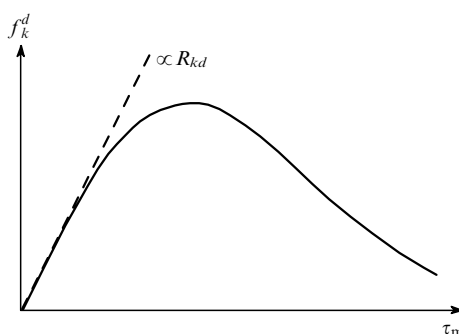


Рис. 31. Зависимость величины неравновесного ЯЭО для протона d (f_k^d) при облучении протона k от времени смешивания τ_m .⁵³

где μ_0 — магнитная постоянная вакуума, γ — гиромагнитное отношение протона, h — постоянная Планка.

Выражение (13) представляет собой так называемое условие начальной аппроксимации скорости роста неравновесного ЯЭО.⁵³ При малых значениях времени τ_m пара ядер ведет себя так, как если бы они были изолированной системой, при этом величина ЯЭО между ними прямо пропорциональна τ_m . При больших временах смешивания скорость релаксации ядра d становится сопоставимой со скоростью кросс-релаксации, что вызывает отклонение функции ЯЭО от линейного закона и ее спад до нуля при $\tau_m \gg T_1$ (T_1 — время продольной релаксации ядра d). Таким образом, применение условия начальной аппроксимации возможно только при временах смешивания $\tau_m \ll T_1$.

Учитывая тот факт, что константа скорости кросс-релаксации R_{kd} между наблюдаемым (d) и облучаемым (k) протонами обратно пропорциональна шестой степени расстояния между этими атомами (r_{kd}^{-6}) (уравнение (14)), из соотношения (13) легко получить следующее уравнение:

$$f_k^d = c r_{kd}^{-6} \tau_m, \quad (15)$$

где c — константа, включающая в себя фундаментальные постоянные и время корреляции молекулы (τ_c).⁵³ Уравнение (15) может быть напрямую использовано для определения межпротонных расстояний r_{kd} по известным величинам ЯЭО. При этом время корреляции может быть найдено из данных по временам релаксации T_1 ядер ^{13}C (см.⁸⁶).

На практике воспроизводимое измерение величин ЯЭО зависит от ряда условий эксперимента: концентрации и природы образца, присутствия парамагнитных примесей, степени насыщения переходов облучаемого сигнала, инструментальных условий. Однако отношение двух ЯЭО в пределах одной молекулы, называемое относительным ЯЭО, менее чувствительно ко всем этим факторам и обратно пропорционально шестой степени отношения соответствующих межпротонных расстояний.

$$\frac{f_k^d}{f_n^m} = \left(\frac{r_{kd}}{r_{nm}} \right)^{-6}. \quad (16)$$

Именно уравнение (16) используется на практике для определения пространственной структуры молекул исходя из экспериментальных величин неравновесного ЯЭО.

Эксперимент NOESY по наблюдению неравновесных ЯЭО может быть проведен как в одномерном (1D) так и в двумерном (2D) вариантах.^{53, 84} В спектре 2D NOESY^{87, 88} содержится информация обо всех межпротонных ЯЭО молекулы (рис. 32). Теоретически спектр 2D NOESY можно рассматривать как набор одномерных спектров, в каждом из которых происходит селективное облучение одного из протонов системы. При этом для получения спектра 2D NOESY не требуется проводить селективного облучения протонов, обычно затрудненного перекрытием сигналов в одномерном спектре ЯМР ^1H .

На рис. 32, *b* в качестве примера приведен спектр 2D NOESY *O*-антигенного полисахарида *Acinetobacter baumannii* O-7,⁸⁹ содержащего в повторяющемся фрагменте шесть моносахаридных остатков (см. рис. 32, *a*): четыре из них (A–D) формируют основную цепь полисахарида и два входят в боковую группу.

При проведении конформационного анализа полисахаридов и особенно олигосахаридов необходимо учитывать тот факт, что эти соединения являются конформационно подвижными и, как правило, не существует одной-единственной конформации, точно удовлетворяющей эксперимен-

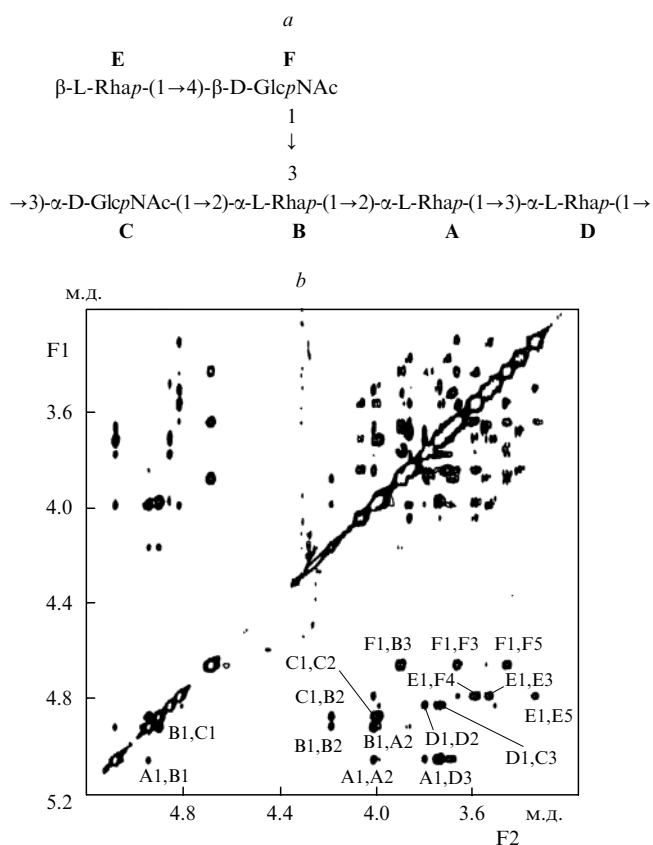
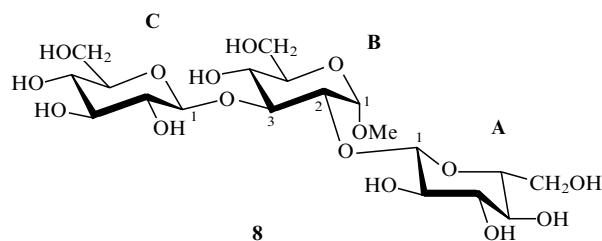


Рис. 32. Первичная структура (*a*) и спектр 2D NOESY (*b*) *O*-антигенного полисахарида *Acinetobacter baumannii* O-7.⁸⁹ Недиагональные пики в спектре возникают в результате ЯЭО между пространственно приближенными протонами.

тально регистрируемым в спектрах величинам ЯЭО и КССВ. Поэтому при моделировании молекул углеводов приходится либо учитывать совокупность конформеров, либо усреднять результаты молекулярно-динамических расчетов. Например, в результате расчетов методом молекулярной динамики триглюкозида **8** была показана⁹⁰ возможность существования для этого соединения нескольких предпочтительных конформеров, соответствующих энергетическим минимумам.



Усредненные величины межпротонных расстояний, вычисленные теоретически по результатам этих расчетов, хорошо совпадали с полученными из экспериментальных величин ЯЭО (табл. 6). В то же время совпадение величин КССВ было хуже (табл. 7), хотя тенденции в изменении величин констант расчетами воспроизводились. Это показывает, что при исследованиях конформаций олиго- и полисахаридов методами ЯМР полезно совмещать различные методики (например, регистрацию ЯЭО и КССВ).

Таблица 6. Межпротонные расстояния, рассчитанные теоретически и из экспериментальных величин ЯЭО, для 2,3-разветвленного триглокозида **8**.⁹⁰

Протоны	Расстояния, Å	
	расчет из данных молекулярной динамики	расчет из экспериментальных величин ЯЭО
H ^{1B} ...H ^{2B}	2.42	2.42
H ^{2B} ...H ^{1A}	2.28	2.25
H ^{3B} ...H ^{1C}	2.29	2.26
H ^{1B} ...H ^{1A}	3.01	3.16

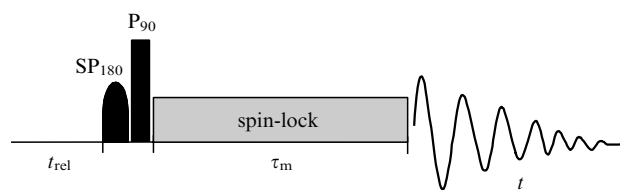
Таблица 7. Рассчитанные и экспериментальные величины констант $^3J_{C,H}$ для 2,3-разветвленного триглокозида **8**.⁹⁰

Взаимодействующие атомы	Величина $^3J_{C,H}$, Гц	
	расчет	эксперимент
H ^{1A} /C ^{2B}	3.9	3.8
H ^{2B} /C ^{1A}	3.7	4.5
H ^{1C} /C ^{3B}	3.6	3.9
H ^{3B} /C ^{1C}	6.0	4.9

В заключение рассмотрим особенности наблюдения ЯЭО в случае соединений, для которых $\omega_0\tau_c \approx 1$. Обычно такие соединения имеют молекулярную массу 1000–2000 (в зависимости от вязкости раствора и резонансной частоты используемого спектрометра ЯМР). Для таких молекул наблюдаемые величины ЯЭО будут близки к нулю, и на их основании нельзя сделать выводов о конформациях. Решение этой проблемы было найдено с внедрением в спектроскопию ЯМР экспериментов ROESY,⁹¹ в которых ядерный эффект Оверхаузера развивается не в мощном стационарном магнитном поле спектрометра (B_0), а в магнитном поле B_1 , создаваемом передатчиком спектрометра ЯМР. При этом изменяется динамика ЯЭО: $\gamma B_1 \ll \gamma B_0$ и, соответственно, $\omega_1 \ll \omega_0$. В результате условие $\omega_1^2\tau_c^2 \ll 1$ выполняется для всех реальных величин τ_c , и поэтому все молекулы ведут себя так, как будто они находятся в режиме предельного сужения. Исключить действие поля B_0 удастся за счет развития ЯЭО в плоскости x_y , перпендикулярной направлению поля B_0 . Импульсная последовательность одномерного эксперимента ROESY представлена на рис. 33.

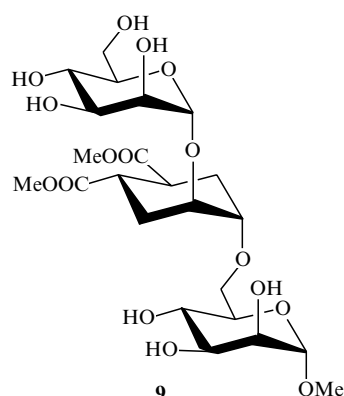
На первом этапе 1D-эксперимента ROESY, как и в 1D-эксперименте NOESY, производится инвертирование намагниченности протона k (вектор намагниченности направляется вдоль оси $-z$) действием селективного импульса SP₁₈₀. Следующий неселективный 90°-ный импульс P₉₀ переводит намагниченности всех протонов в плоскость x_y , где они удерживаются вдоль оси y действием на них маломощного поля B_1 передатчика (импульс spin-lock) в течение времени τ_m . При этом ситуация во время действия импульса spin-lock напоминает ситуацию за время смешивания τ_m в неравновесном эксперименте 1D NOESY, за исключением мощностей магнитных полей ($B_0 \gg B_1$), в которых развиваются ЯЭО.

Эксперименты ROESY (как и NOESY) в основном проводят в двумерном варианте. Однако измерение экспериментальных величин ЯЭО в спектрах ROESY сопряжено с дополнительными сложностями из-за появления корреляций (TOCSY-пики) между протонами, связанными спин-спиновым взаимодействием.⁹² Это вызвано тем, что импульс spin-lock,⁹¹ используемый в эксперименте ROESY для разви-

**Рис. 33.** Импульсная последовательность одномерного эксперимента ROESY (пояснения см. в тексте).

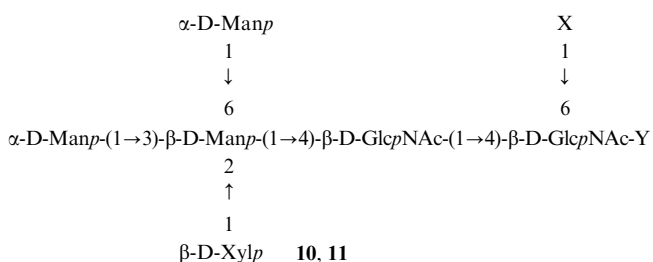
тия ЯЭО, подобен импульсу для развития эффекта Хартмана – Ханна⁹³ в эксперименте TOCSY.

В работе⁹⁴ на основании спектра ROESY был проведен конформационный анализ псевдотрисахарида **9**, структурно родственного (1→2),(1→6)-связанному маннотриозиду.



В спектрах ЯМР 1H соединения **9**, зарегистрированных на спектрометрах со слабыми и средними магнитными полями, сигналы многих протонов перекрываются, поэтому для изучения этой молекулы был задействован прибор с сильным магнитным полем (800 МГц). В этом случае в спектре ЯМР 1H сигналы некоторых протонов все еще перекрываются, но число таких сигналов сильно уменьшается. Установление пространственной структуры псевдотрисахарида **9** проводилось на основании экспериментальных величин ЯЭО. Для определения последних был использован 2D-эксперимент ROESY, так как на спектрометре с резонансной частотой протонов 800 МГц для этого соединения выполняется условие $\omega_0\tau_c \approx 1$ и эксперимент NOESY оказывается малоинформативным. Спектр ROESY позволил определить предпочтительные конформации псевдотрисахарида **9** и провести их сопоставление с конформациями соответствующего (1→2),(1→6)-связанного маннотриозида.

Вместе с тем в работе⁹⁵ было показано, что для определения пространственной структуры гекса- (**10**) и гептасахаридов (**11**), представляющих собой фрагменты *N*-гликана



X = H (**10**), α -L-Fucp (**11**); Y = (1→OMe).

α -D-гемоцианина улитки *Helix pomatia*, предпочтителен эксперимент NOESY. При этом величины ЯЭО, наблюдаемые в спектрах NOESY (спектрометр 500 МГц, D₂O, 282 К), были отрицательные ($\omega_0^2\tau_c^2 > 1$). Спектры ROESY также давали информацию о пространственной структуре олигосахаридов **10** и **11**, однако из-за большого числа TOCSY-пиков, присутствующих в спектрах и перекрывающихся с ROESY-пиками, получаемые сведения о структурах были менее точные. Конформационный анализ гекса- и гептасахаридов **10** и **11**, проведенный на основании экспериментальных величин ЯЭО и расчетов методом молекулярной динамики, позволил определить, что для дисахаридных фрагментов α -D-Manp-(1→6)- β -D-Manp, α -L-Fucp-(1→6)- β -D-GlcpNAc и α -D-Manp-(1→3)- β -D-Manp характерно наличие нескольких конформационных минимумов, в то время как для фрагмента β -D-Xylp-(1→2)- β -D-Manp-(1→4)- β -D-GlcpNAc-(1→4)- β -D-GlcpNAc существует одна предпочтительная конформация.⁹⁵

V. Заключение

Завершая рассмотрение способов регистрации КССВ и ЯЭО методами спектроскопии ЯМР, а также применения этих спектральных параметров в конформационном анализе олиго- и полисахаридов в растворе, необходимо отметить, что эксперименты по исследованию гетероядерных КССВ $J_{C,H}$ обладают меньшей чувствительностью, чем эксперименты по протон-протонным ЯЭО. Это в основном связано с низким природным содержанием изотопа углерода ¹³C (1.1%) в органических соединениях, а также из-за меньшей намагниченности ядер ¹³C по сравнению с протонами ¹H (гироманнитные отношения этих ядер соотносятся как $\gamma_H/\gamma_C = 3.97$). Поэтому точное определение экспериментальных величин констант $J_{C,H}$ часто является очень сложной, а иногда и экспериментально невыполнимой задачей. В то же время преимуществом экспериментов по наблюдению гетероядерных констант $J_{C,H}$, особенно в двумерном варианте, перед экспериментами по ЯЭО является их большая разрешенность. При регистрации КССВ $J_{C,H}$ методами двумерной спектроскопии ЯМР одно из измерений спектра обычно отвечает химическим сдвигам ядер ¹³C, которые в олиго- и полисахаридах изменяются в гораздо более широком диапазоне (0–110 м.д.), чем химические сдвиги в спектрах ЯМР ¹H (0–6 м.д.). Особенно актуальной проблема разрешенности спектров становится в случае крупных олиго- и полисахаридов, содержащих десятки и даже сотни неэквивалентных ядер.

Необходимо подчеркнуть, что величины КССВ и ЯЭО по-разному отражают изменения в геометрии молекулы. Если величины вицинальных КССВ пропорциональны квадрату косинуса соответствующего двугранного угла ($\cos^2\theta$), то величины ЯЭО обратно пропорциональны шестой степени расстояния между взаимодействующими атомами (r^{-6}). Поэтому структурные выводы, полученные на основании исследования величин КССВ и ЯЭО, могут существенно дополнять друг друга при использовании в конформационном анализе углеводов. Необходимо также учитывать, что экспериментальные величины ЯЭО и КССВ являются усредненными по всем доступным конформациям углеводов в растворе. Такие же усредненные величины могут быть получены с помощью теоретического конформационного анализа, основанного на методах молекулярной и квантовой механики. Поэтому именно совместный анализ экспериментальных результатов, рассмотренных в данном обзоре, и теоретических исследований позволяет получить наиболее полные представления о пространственной структуре олиго- и полисахаридов в растворе.

Авторы благодарны доктору химических наук В.И.Польшакову, кандидату химических наук Ю.А.Стреленко и доктору химических наук А.И.Усову за критическое прочтение обзора и полезные замечания.

Обзор подготовлен при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 08-03-00 884-а) и Программы грантов Президента Российской Федерации для поддержки молодых ученых (гранты МК-5970.2008.3 и МК-5879.2008.3).

Литература

1. W.T.J.Morgan, W.M.Watkins. *Br. Med. Bull.*, **25**, 30 (1969)
2. W.M.Watkins. In *Advances in Human Genetics. Vol. 10*. (Eds H.Harris, K.Hirschhorn). Plenum, New York, 1980. P. 1
3. J.V.Höltje, U.Schwarz. In *Molecular Cytology of Escherichia Coli*. Academic Press, London, 1985. P. 77
4. E.T.Rietschel, H.Brade. *Sci. Am.*, **267**, 54 (1992)
5. L.Kjellén, U.Lindahl. *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 443 (1991)
6. M.Yanagishita. *Experientia*, **49**, 366 (1993)
7. M.L.Phillips, E.Nudelman, F.C.A.Gaeta, M.Perez, A.K.Singhal, S.I.Hakomori, J.C.Paulson. *Science*, **250**, 1130 (1990)
8. G.Walz, A.Arufto, W.Kalanus, M.Bevilacqua, B.Seed. *Science*, **250**, 1132 (1990)
9. J.B.Lowe, L.M.Stoolman, R.P.Nair, R.D.Larson, T.L.Berhend, R.M.Marks. *Cell*, **63**, 475 (1990)
10. A.Chandrasekaran, A.Srinivasan, R.Raman, K.Viswanathan, S.Raguram, T.M.Tumpey, V.Sasisekharan, R.Sasisekharan. *Nat. Biotechnol.*, **26**, 107 (2008)
11. K.T.Welch, T.A.Turner, C.E.Preast. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 6573 (2008)
12. H.Xin, S.Dziadek, D.R.Bundle, J.E.Cutler. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 13526 (2008)
13. J.Teijler, F.Skogman, H.Leffler, U.J.Nilsson. *Carbohydr. Res.*, **342**, 1869 (2007)
14. M.L.Gening, Y.E.Tsvetkov, G.B.Pier, N.E.Nifantiev. *Carbohydr. Res.*, **342**, 567 (2007)
15. R.Schwartz-Albiez, Y.Adams, C.-W.von der Leith, P.Mischnick, K.T.Andrews, M.Kirschfink. *Glycoconjugate J.*, **24**, 57 (2007)
16. D.Schwizer, H.Gäthje, S.Kelm, M.Porro, O.Schwardt, B.Ernst. *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 4944 (2006)
17. K.Aplander, J.Teijler, J.Tofted, S.Carlsson, B.Kahl-Knutsson, A.Sundin, H.Leffler, U.J.Nilsson. *Carbohydr. Res.*, **341**, 1363 (2006)
18. A.Imberty, H.Lortat-Jacob, S.Pérez. *Carbohydr. Res.*, **342**, 430 (2007)
19. А.Г.Герbst, А.А.Грачев, А.С.Шашков, Н.Э.Нифантьев. *Биорг. химия*, **33**, 28 (2007)
20. Г.М.Липкинд. Дис. д-ра хим. наук. ИОХ АН СССР, Москва, 1991
21. P.Finch. *Carbohydrates. Structures, Syntheses and Dynamics*. Springer-Verlag, Berlin, 1999
22. N.Cyr, A.S.Perlin. *Can. J. Chem.*, **57**, 2504 (1979)
23. S.J.Angyal. *Carbohydr. Res.*, **77**, 37 (1979)
24. R.U.Lemieux, K.Bock, L.T.J.Delbaere, S.Koto, V.S.Rao. *Can. J. Chem.*, **58**, 631 (1980)
25. J.A.Schwarcz, A.S.Perlin. *Can. J. Chem.*, **50**, 3667 (1972)
26. C.Altona, C.A.G.Haasnoot. *Org. Magn. Reson.*, **13**, 417 (1980)
27. A.S.Shashkov, Z.Pakulski, B.Grzeszczyk, A.Zamojski. *Carbohydr. Res.*, **330**, 289 (2001)
28. B.Mulloy, T.A.Frenkiel, D.B.Davies. *Carbohydr. Res.*, **184**, 39 (1988)
29. I.Tvaroška, M.Hricovíni, E.Peráková. *Carbohydr. Res.*, **189**, 359 (1989)
30. F.Cloran, I.Carmichael, A.S.Serianni. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 9843 (1999)
31. F.Heatley, L.Akhter, R.T.Brown. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 919 (1980)

32. Н.М.Сергеев. *Спектроскопия ЯМР*. МГУ, Москва, 1981
33. А.А.Шахатуни, А.Г.Шахатуни. *Успехи химии*, **71**, 1132 (2002)
34. A.S.Shashkov, G.M.Lipkind, Y.A.Knirel, N.K.Kochetkov. *Magn. Reson. Chem.*, **26**, 735 (1988)
35. D.M.Grant, B.V.Cheney. *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 5315 (1967)
36. M.Karplus. *J. Chem. Phys.*, **30**, 11 (1959)
37. M.Karplus. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2870 (1963)
38. M.J.Minch. *Concep. Magn. Reson., Part A*, **6**, 41 (1994)
39. C.A.G.Haasnoot, F.A.A.M.de Leeuw, C.Altona. *Tetrahedron*, **36**, 2783 (1980)
40. A.A.Grachev, A.G.Gerbst, M.L.Gening, D.V.Titov, Yu.E.Tsvetkov, A.S.Shashkov, N.E.Nifantiev. In *The VIth International Congress of Young Chemists «YoungChem 2008»*. Cracow, 2008. P. 110
41. D.Marion, K.Wüthrich. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **113**, 967 (1983)
42. F.Delaglio, Z.Wu, A.Bax. *J. Magn. Reson.*, **149**, 276 (2001)
43. J.Cavanagh, W.J.Fairbrother, A.G.Palmer III, N.J.Skelton. *Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice*. (2nd Ed.). Academic Press, New York, 2007
44. M.Rance, O.W.Sørensen, G.Bodenhausen, G.Wagner, R.R.Ernst, K.Wüthrich. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **117**, 479 (1983)
45. C.Griesinger, O.W.Sørensen, R.R.Ernst. *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 6394 (1985)
46. C.Griesinger, O.W.Sørensen, R.R.Ernst. *J. Chem. Phys.*, **85**, 6837 (1986)
47. L.Mueller. *J. Magn. Reson.*, **72**, 191 (1987)
48. D.Yang, X.Xu, C.Ye. *Magn. Reson. Chem.*, **30**, 711 (1992)
49. S.Simova. *Magn. Reson. Chem.*, **36**, 505 (1998)
50. M.D.Sørensen, S.M.Kristensen, J.J.Led, O.W.Sørensen. *J. Magn. Reson., Ser. A*, **103**, 364 (1993)
51. A.Meissner, O.W.Sørensen. *Magn. Reson. Chem.*, **39**, 49 (2001)
52. J.Zhang, A.Spring, M.W.Germann. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 5380 (2009)
53. T.D.W.Claridge. *High Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. Pergamon Press, Oxford, 1999
54. A.A.Karelin, Y.E.Tsvetkov, L.Paulovičová, S.Bystrický, E.Paulovičová, N.E.Nifantiev. *Carbohydr. Res.*, **344**, 29 (2009)
55. R.E.Hurd. *J. Magn. Reson.*, **87**, 422 (1990)
56. T.Parella. *Magn. Reson. Chem.*, **36**, 467 (1998)
57. P.E.Hansen. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **14**, 175 (1981)
58. R.Aydin, H.Günther. *Magn. Reson. Chem.*, **28**, 448 (1990)
59. R.Stenutz, I.Carmichael, G.Widmalm, A.S.Serianni. *J. Org. Chem.*, **67**, 949 (2002)
60. G.Zhu, A.Bax. *J. Magn. Reson., Ser. A*, **104**, 353 (1993)
61. C.H.Gotfredsen, A.Meissner, J.Ø.Duus, O.W.Sørensen. *Magn. Reson. Chem.*, **38**, 692 (2000)
62. W.Willker, D.Leibfritz. *Magn. Reson. Chem.*, **33**, 632 (1995)
63. K.Furukata, H.Seto. *Tetrahedron Lett.*, **40**, 6271 (1999)
64. R.T.Williamson, B.L.Márquez, W.H.Gerwick, K.E.Kövér. *Magn. Reson. Chem.*, **38**, 265 (2000)
65. K.E.Kövér, G.Batta, K.Fehér. *J. Magn. Reson.*, **181**, 89 (2006)
66. A.Bax, R.Freeman. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 1099 (1982)
67. M.Liu, R.D.Farrant, J.M.Gillam, J.K.Nicholson, J.C.Lindon. *J. Magn. Reson., Ser. B*, **109**, 275 (1995)
68. G.T.Montelione, M.E.Winkler, P.Rauenbuehler, G.Wagner. *J. Magn. Reson.*, **82**, 198 (1989)
69. G.Wider, D.Neri, G.Otting, K.Wüthrich. *J. Magn. Reson.*, **85**, 426 (1989)
70. A.S.Edison, W.M.Westler, J.L.Markley. *J. Magn. Reson.*, **92**, 434 (1991)
71. A.Bax, M.F.Summers. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2093 (1986)
72. E.M.Tul'skaya, S.N.Senchenkova, L.I.Evtushenko, A.S.Shashkov, I.B.Naumova. *Carbohydr. Res.*, **340**, 1247 (2005)
73. H.Kogler, O.W.Sørensen, G.Bodenhausen, R.R.Ernst. *J. Magn. Reson.*, **55**, 157 (1983)
74. A.A.Grachev, A.G.Gerbst, N.E.Ustyuzhanina, A.S.Shashkov, A.I.Usov, N.E.Nifantiev. *J. Carbohydr. Chem.*, **25**, 315 (2006)
75. A.A.Grachev, A.G.Gerbst, N.E.Ustyuzhanina, E.A.Khatuntseva, A.S.Shashkov, A.I.Usov, N.E.Nifantiev. *J. Carbohydr. Chem.*, **24**, 85 (2005)
76. A.A.Grachev, A.G.Gerbst, N.E.Ustuzhanina, V.B.Krylov, A.S.Shashkov, A.I.Usov, N.E.Nifantiev. *Mendeleev Commun.*, **17**, 57 (2007)
77. C.Bauer, R.Freeman, T.Frenkiel, J.Keeler, A.J.Shaka. *J. Magn. Reson.*, **58**, 442 (1984)
78. H.Kessler, U.Anders, G.Gemmecker, S.Steuernagel. *J. Magn. Reson.*, **85**, 1 (1989)
79. S.Berger. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **30**, 137 (1997)
80. R.Freeman. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **32**, 59 (1998)
81. D.M.Doddrell, D.T.Pegg, M.R.Bendall. *J. Magn. Reson.*, **48**, 323 (1982)
82. D.P.Burum, R.R.Ernst. *J. Magn. Reson.*, **39**, 163 (1980)
83. J.Noggle, R.E.Schirmer. *The Nuclear Overhauser Effect*. Academic Press, New York, 1971
84. Э.Дероум. *Современные методы ЯМР для химических исследований*. Мир, Москва, 1992
85. A.G.Gerbst, N.E.Ustuzhanina, A.A.Grachev, E.A.Khatuntseva, D.E.Tsvetkov, A.S.Shashkov, A.I.Usov, N.E.Nifantiev. *J. Carbohydr. Chem.*, **21**, 313 (2002)
86. J.-R.Brisson, J.P.Carver. *Biochemistry*, **22**, 1362 (1984)
87. J.Jeener, B.H.Meier, P.Bachmann, R.R.Ernst. *J. Chem. Phys.*, **71**, 4546 (1979)
88. R.Wagner, S.Berger. *J. Magn. Reson., Ser. A*, **123**, 119 (1996)
89. S.R.Haseley, S.G.Wilkinson. *Carbohydr. Res.*, **306**, 257 (1998)
90. R.Eklund, G.Widmalm. *Carbohydr. Res.*, **338**, 393 (2003)
91. A.A.Bothner-By, R.L.Stephens, J.Lee, C.D.Warren, R.W.Jeanloz. *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 811 (1984)
92. A.Bax, D.G.Davis. *J. Magn. Reson.*, **63**, 207 (1985)
93. A.Bax, D.G.Davis. *J. Magn. Reson.*, **65**, 355 (1985)
94. S.Mari, I.Sánchez-Medina, P.Mereghetti, L.Belvisi, J.Jiménez-Barbero, A.Bernardi. *Carbohydr. Res.*, **342**, 1859 (2007)
95. J.P.M.Lommers, J.J.M.van Rooijen, L.M.J.Kroon-Batenburg, J.P.Kamerling, J.F.G.Vliegenthart. *Carbohydr. Res.*, **337**, 2279 (2002)

APPLICATION OF ADVANCED NMR TECHNIQUES FOR CONFORMATIONAL ANALYSIS OF OLIGO- AND POLYSACCHARIDES

A.A.Grachev, A.G.Gerbst, A.S.Shashkov, N.E.Nifantiev

N.D.Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences

47, Leninsky prosp., 119991 Moscow, Russian Federation, Fax +7(499)135-8784

Modern NMR techniques for determination of spin-spin coupling constants and Nuclear Overhauser Effects and the use of these data in the experimental conformational analysis of oligo- and polysaccharides are considered.

Bibliography — 95 references.

Received 10th April 2009