



УДК 577.114.012.7:543.422.25

КОНФОРМАЦИЯ ЦИКЛОГЕПТААМИЛОЗЫ В РАСТВОРЕ
ПО ДАННЫМ СПЕКТРОСКОПИИ ^1H - И ^{13}C -ЯМР
И ТЕОРЕТИЧЕСКИХ РАСЧЕТОВЛипкин Г. М., Шапков А. С., Мамян С. С.,
Кочетков Н. К.Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва

Измерены ядерные эффекты Оверхаузера при облучении аномерных протонов циклогептаамилозы, а также определены vicinalные константы спин-спинового взаимодействия ($^3J_{\text{C,H}}$) атомов углерода и водорода вблизи гликозидной связи в водном растворе. На основании экспериментальных данных, а также теоретического расчета показано, что циклогептаамилоза существует в растворе в конформации с углами вращения ϕ и ψ , равными -10 и $+13^\circ$ во всех дисахаридных звеньях.

Циклогептаамилоза (или β -циклодекстрин) — циклический олигосахарид из семи $\alpha 1 \rightarrow 4$ -связанных остатков глюкозы. Так как образование циклической системы несомненно сопряжено с ограничением свободы вращения вокруг гликозидных связей дисахаридных звеньев по сравнению со свободой вращения в линейных структурах, например мальтозе, мы исследовали циклогептаамилозу в водном растворе методами ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии. В этом случае можно более конкретно соотнести параметры спектров с конформацией олигосахаридов и в конечном счете уточнить зависимость некоторых величин, например констант спин-спинового взаимодействия (КССВ) ядер водорода и углерода вблизи гликозидной связи, от соответствующих углов вращения. Далее, сопоставление параметров спектров ЯМР циклогептаамилозы и мальтозы позволяет провести более детальный анализ конформационной динамики углеводных цепей в растворах. Конформационный анализ мальтозы нами был проведен ранее [1, 2].

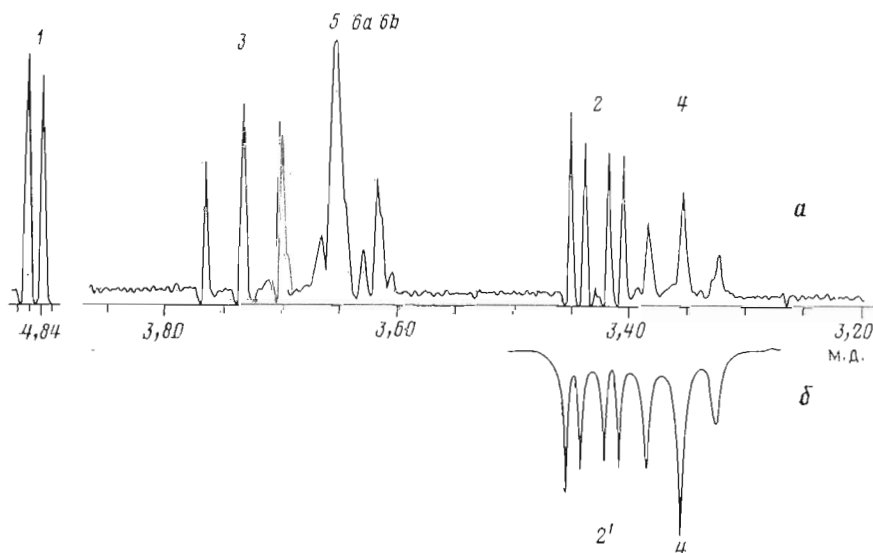


Рис. 1. Спектр ^1H -ЯМР циклогептаамилозы (а) и спектр ЯЭО, полученный при облучении протонов $\text{H1}'$ (б). Цифрами обозначены номера протонов

Химические сдвиги (δ) и мультиплетность сигналов в спектре ^1H -ЯМР циклогептаамилозы

Атом	δ , м. д.	Мультиплетность *
H1	4,85	д
H2	3,43	дд
H3	3,73	т
H4	3,35	т
H5	3,60–3,68	м
H6a	3,60–3,68	м
H6b	3,60–3,68	м

* д — дублет, дд — дублет дублетов, т — триплет, м — мультиплет.

Таблица 2

Химические сдвиги (δ) в спектре ^{13}C -ЯМР циклогептаамилозы

Атом	δ , м. д.
C1	102,96 (+2,3) *
C2	73,43 (+0,3)
C3	74,40 (+0,1)
C4	82,45 (+4,35)
C5	73,24 (+0,8)
C6	61,8 (–0,4)

* В скобках даны различия в химических сдвигах соответствующих сигналов в спектрах циклогептаамилозы и мальтозы.

Сигналы в спектре ^1H -ЯМР (рис. 1) отнесены методом селективного гомоядерного резонанса как в обычном, так и в разностном вариантах (табл. 1). На рис. 1 приведен также спектр ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО). Облучение H1' вызывает увеличение интенсивности сигнала H2', принадлежащего тому же остатку, на 9,4% и атома H4* соседнего остатка на 12,8%.

КССВ $^3J_{\text{C,H}}$ ядер водорода и углерода вблизи гликозидных связей во фрагментах H1'–C1'–O1'–C4 и C1'–O1'–C4–H4 измерены с помощью двумерной спектроскопии ЯМР (см. «Экспериментальную часть» и рис. 2). Конформация этих фрагментов задается углами вращения $\varphi(\text{C1}'\text{—O1}')$ и $\psi(\text{O1}'\text{—C4})$ **. Поэтому соответствующие константы $^3J_{\text{C,H}}$ ($^3J_{\text{C}_1\text{H}_1}$ и $^3J_{\text{C}_1\text{H}_4}$) будем обозначать как J^φ и J^ψ . КССВ J^φ и J^ψ равны $5,2 \pm 0,1$ и $5,3 \pm 0,1$ Гц соответственно. Химические сдвиги сигналов в спектре ^{13}C -ЯМР циклогептаамилозы приведены в табл. 2. Отнесение сигналов в спектре ^{13}C -ЯМР получено ранее в работе [3].

Конформационный анализ циклогептаамилозы проведен с учетом усредненной геометрии углеводного остатка, предложенной Арноттом и Скоттом [4], так как различия между валентными углами такой структуры и средними углами в остатках глюкозы циклодекстринов [5] не превышают 1–2°. Валентный угол гликозидной связи C–O–C принят равным 117,7°. Эта величина представляет собой среднее значение угла C–O–C в различных комплексах циклогептаамилозы [6]. При оценке энергии конформеров учитывали только атом-атомные функции невалентных взаимодействий Скотта и Шераги [7]. Эти функции при описании

* Номера атомов без штрихов относятся к остатку в дисахаридном звене циклогептаамилозы, расположенном в направлении часовой стрелки.

** Угол φ равен нулю при *цис*-ориентации связей C1'–H1' и O1'–C4; угол ψ равен нулю при *цис*-ориентации связей C1'–O1' и C4–H4; углы измеряют по часовой стрелке от ближней связи к дальней.

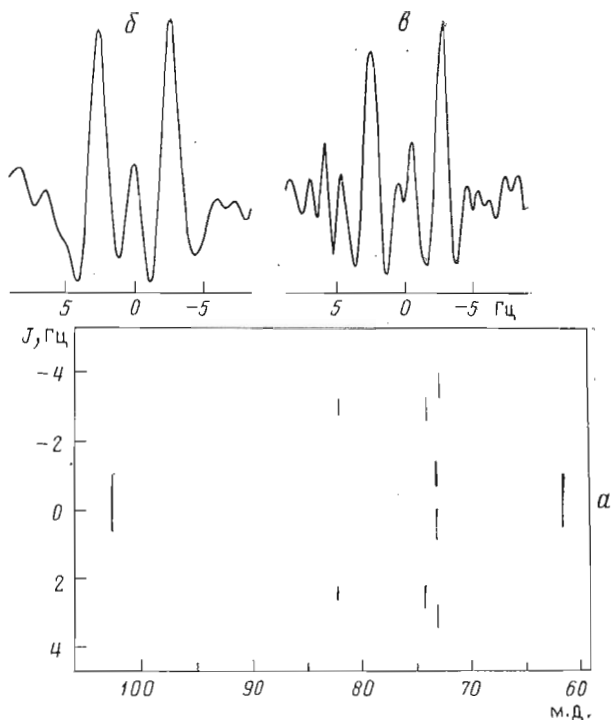


Рис. 2. Двумерный J -спектр циклогептаамилозы, полученный при селективном облучении протонов $H1'$ (*a*). *b* — сечение вдоль химического сдвига углерода $C4$ в двумерном спектре, полученном при селективном облучении протонов $H1'$ (*a*); *a* — сечение по химическому сдвигу $C1'$ в двумерном спектре, полученном при селективном облучении протонов $H4$

конформационных свойств олигосахаридов в водной среде фактически представляют собой потенциалы средней силы (см. [1]).

Теоретическая конформация циклогептаамилозы была найдена из условия циклического замыкания семи остатков глюкозы и равенства углов вращения вокруг гликозидных связей φ и ψ во всех дисахаридных звеньях. В этом случае структура циклогептаамилозы соответствует одному витку спирали с осью симметрии седьмого порядка и с величиной трансляции остатка вдоль оси спирали h , равной 0 Å. На рис. 3 в зависимости от углов вращения φ и ψ представлены изолинии значений n (числа остатков в витке), равных 7, т. е. определяющая все спирали амилозы с осью симметрии C_7 , и изолинии значений h , равных 0 Å, т. е. определяющая циклические структуры. Величины n и h рассчитывали по алгоритму [8]. Очевидно, пересечение линий $n=7$ и $h=0$ (рис. 3) определяет искомые углы вращения. Из двух возможных наборов углов вращения φ и ψ в циклогептаамилозе: $-10, 13^\circ$ и $17, -2^\circ$ — реальной является только первая пара, так как энергия невалентных взаимодействий двух соседних остатков глюкозы в первом случае составляет $-2,4$ ккал/моль, тогда как во втором $+9,1$ ккал/моль. Молекулярная модель найденной конформации циклогептаамилозы показана на рис. 4.

Для нескольких комплексов β -циклодекстринов с органическими лигандами был проведен рентгеноструктурный анализ [9–11], на основе которого были найдены средние значения углов φ и ψ для дисахаридных звеньев этих структур в кристаллическом состоянии. Они равны -11 и 10° соответственно [6] и практически совпадают с углами, найденными нами расчетным путем для изолированной молекулы. Более того, β -циклодекстрины сохраняют симметрию седьмого порядка [9, 10], что возможно только при равенстве значений углов φ и ψ во всех дисахаридных звеньях. Поэтому примененный в данной работе метод конформационного анализа циклогептаамилозы является приемлемым. Напротив, в структурах цикло-

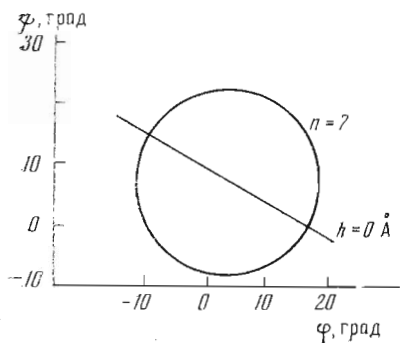


Рис. 3

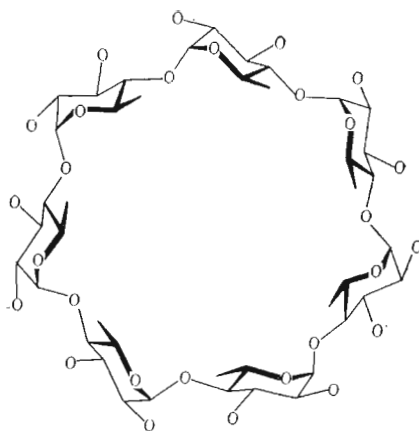


Рис. 4

Рис. 3. Линии одинаковых значений числа остатков в витке n и трансляции остатка h (для случая $n=7$ и $h=0$ Å) для спиралей амилозы в зависимости от углов вращения φ и ψ

Рис. 4. Молекулярная модель циклогептаамилозы ($\varphi=-10^\circ$, $\psi=13^\circ$, $\tau=117,7^\circ$); O — атомы кислорода

гексаамилозы колебания значений углов достигают $30-50^\circ$, что сопряжено с потерей симметрии шестого порядка. Из сопоставления расчетных и рентгеноструктурных данных следует, что образование циклической системы из семи остатков глюкозы приводит к конформационно-жесткой структуре с практически фиксированными значениями углов вращения $\varphi \approx -10^\circ$ и $\psi \approx 10^\circ$. Вероятно, такая конформация циклогептаамилозы должна сохраняться и в растворе. Структурная жесткость циклогептаамилозы в растворах подтверждается спектрами кругового дихроизма [12].

В конформационном расчете циклогептаамилозы мы специально не учитывали внутримолекулярные водородные связи. Тем не менее в найденной структуре образование водородных связей $O2 \dots O3$, наблюдаемых в кристаллическом состоянии циклогептаамилозы, вполне возможно, поскольку расстояние между этими атомами равно 2,8 Å. Таким образом, в этом примере внутримолекулярные водородные связи выступают в роли только дополнительного фактора в стабилизации уже сформировавшейся конформации.

Обратимся к экспериментальным данным для водных растворов циклогептаамилозы. Облучение протона $H1'$ вызывает ЯЭО на протонах $H4$ и $H2'$. ЯЭО на атоме $H4$ в 1,4 раза больше, чем на атоме $H2'$ (12,8 и 9,4% соответственно). Это указывает на меньшее расстояние между аномерным протоном $H1'$ и протоном агликона $H4$ по сравнению с расстоянием между протонами $H1'$ и $H2'$ в остатке глюкозы.

Расчет ЯЭО в обсуждаемой конформации циклогептаамилозы по формуле Ширмера и Ногла с учетом «трехспинового эффекта» [13] оценивает ЯЭО на протоне $H4$ в 29%, а на протоне $H2'$ — в 20%. Следует указать, что имеет смысл сопоставлять не абсолютные, а относительные теоретические и экспериментальные величины ЯЭО. В данном случае отношение расчетных ЯЭО на протонах $H4$ и $H2'$ оказывается равным 1,45, т. е. оно близко к экспериментальному. Это указывает на совпадение рассчитанной конформации с конформацией циклогептаамилозы, существующей в водном растворе. В этой конформации ($\varphi=-10^\circ$ и $\psi=13^\circ$) расстояние $H1'-H4$ (2,0 Å) действительно меньше расстояния $H1'-H2'$ (2,45 Å).

Соотношение ЯЭО на протонах $H4$ и $H2'$ при облучении протона $H1'$, наблюдаемое в циклогептаамилозе, является максимальным в допустимых конформациях свободного дисахаридного звена $Glc\alpha 1-4Glc$. Это обстоятельство, по-видимому, указывает на отсутствие конформационного равновесия в водных растворах циклогептаамилозы. Напротив, в мальтозе, в которой значения углов φ и ψ могут изменяться в широких пределах, ЯЭО

на протоне Н4 меньше, чем на Н2', и соотношение указанных ЯЭО, согласно экспериментальным и расчетным данным, составляет только 0,7 [2]. Возможность теоретического описания перераспределения величин ЯЭО при переходе от мальтозы к циклогептаамилозе в целом указывает на правильность описания конформационных свойств этих структур в водных растворах.

Таким образом, наблюдаемые ЯЭО находятся в согласии с конформацией циклогептаамилозы с углами вращения $\varphi = -10^\circ$ и $\psi = 13^\circ$ в каждом звене. Это обстоятельство с высокой степенью точности позволяет отнести наблюдаемые константы ${}^3J_{C,H}$ (5,2 и 5,3 Гц) к конкретным углам вращения вокруг гликозидных связей. В данном случае двугранному углу $\sim 10^\circ$ соответствует константа ${}^3J_{C,H}$ 5,2–5,3 Гц. Экстраполяция до 0° по зависимости Карилуса ($\cos^2 \varphi$) приводит к константе ${}^3J_{C,H}$ 5,4 Гц. Таким образом, циклогептаамилоза оказалась уникальным объектом, позволившим достаточно точно определить предельное значение вициальной константы ${}^3J_{C,H}$ между атомами углерода и водорода при *cis*-расположении связей С–Н и С–О во фрагментах Н–С–О–С. Полученный результат также позволил убедиться в правильности предложенной Перлиным и соавт. [14] зависимости КССВ ${}^3J_{C,H}$ от углов вращения вокруг гликозидных связей, по которой величина ${}^3J_{C,H}$ при *cis*-оидном расположении взаимодействующих ядер равна 5,3 Гц.

На примере циклогептаамилозы прослеживается зависимость химических сдвигов в спектрах ${}^{13}C$ -ЯМР от конформации углеводных цепей. Так, разница в химических сдвигах атомов С4 гликозилированных остатков в мальтозе и циклогептаамилозе достигает 4,3 м. д., сами химические сдвиги равны 78,1 и 82,45 м. д. соответственно (табл. 2). Допущенная близость электронных состояний гликозидных связей в этих двух структурах, что вполне корректно, так как валентные углы при мостиковом атоме кислорода равны $\sim 117^\circ$, мы можем изменения в положениях сигнала С4, а также сигнала С1' в основном приписать конформационным различиям мальтозы и циклогептаамилозы. Зависимость химических сдвигов в спектрах ${}^{13}C$ -ЯМР от углов вращения φ и ψ в случае олиго- и полисахаридов ранее была отмечена в работах [15, 16].

Согласно теории Гранта и Чини [17], ван-дер-ваальсово взаимодействие протонов, разделенных двумя связями С–С (или С–О), приводит к дополнительному смещению сигналов соединенных с ними атомов углерода в слабое поле. То обстоятельство, что протоны Н1' и Н4 в циклогептаамилозе сближены (2,0 Å – см. выше) в большей мере, чем в мальтозе (2,5 Å – см. [2]), позволяет качественно объяснить наблюдаемое отличие химических сдвигов сигналов углеродов в циклогептаамилозе и мальтозе (табл. 2).

Расчет конформационного вклада в α -эффект гликозилирования при переходе от мальтозы к циклогептаамилозе был проведен как по формуле Гранта и Чини [17], так и по более простой модели, развитой в работе [18]. Для этого рассчитывали среднее значение возмущения химического сдвига сигнала С4 (как и С1') при учете всей поверхности невалентных взаимодействий мальтозы (см. [1]) и возмущение сигналов С4 и С1' в найденной конформации циклогептаамилозы. Разность химических сдвигов сигналов, рассчитанная по формуле Гранта и Чини, равна 1,8 м. д., а по формуле из работы [18] – 3,3 м. д., т. е. расчет правильно воспроизводит тенденцию смещения сигналов атомов С1' и С4 в слабое поле в случае циклогептаамилозы. Таким образом, химический сдвиг в спектрах ${}^{13}C$ -ЯМР является параметром, весьма чувствительным к конформациям углеводных структур. Это обстоятельство следует учитывать при обсуждении пространственного строения олиго- и полисахаридов в водных растворах.

Экспериментальная часть

Спектры 1H - и ${}^{13}C$ -ЯМР циклогептаамилозы (3% раствор в D_2O) снимали на приборе АМ-300 (Bruker) при $40^\circ C$ с рабочей частотой по протонам 300 МГц, а по углеродам – 72 МГц. В качестве внутренних стандартов использованы 4,4-диметил-4-

силапентасульфонат (Na-соль) для спектра ^1H -ЯМР и метанол для спектра ^{13}C -ЯМР. Величины ЯЭО измерены по методике [19] при следующих параметрах: 0,5 с (время облучения) и 0,8 с (время релаксационной задержки). ЯЭО (%) были выражены как отношение интегральных интенсивностей сигналов наблюдаемого и облучаемого протонов в разностном спектре. Видимальные КССВ ($^3J_{\text{C,H}}$) определяли с помощью двумерной спектроскопии по методикам, описанным в работах [20, 21].

ЛИТЕРАТУРА

1. Lipkind G. M., Verovsky V. E., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1984. V. 133. P. 1—13.
2. Shashkov A. S., Lipkind G. M., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1986. V. 147. № 2. P. 175—182.
3. Colson P., Jennings H. J., Smith I. C. P. // J. Amer. Chem. Soc. 1974. V. 96. № 26. P. 8081—8087.
4. Arnott S., Scott W. E. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1972. № 2. P. 324—335.
5. Hingerty B., Saenger W. // J. Amer. Chem. Soc. 1976. V. 98. № 11. P. 3357—3365.
6. Lindner K., Saenger W. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1980. V. 92. № 3. P. 933—938.
7. Scott R. A., Sheraga H. A. // J. Chem. Phys. 1966. V. 44. № 8. P. 3054—3068.
8. Sugeta H., Miyazawa T. // Biopolymers. 1967. V. 5. № 7. P. 673—679.
9. Hamilton J. A., Sabesan M. N., Steinrauf L. K., Geddes A. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1976. V. 73. № 3. P. 659—664.
10. Hamilton J. A., Steinrauf L. K., Van Etten R. L. // Acta crystallogr. 1968. V. B24. № 11. P. 1560—1562.
11. Lindner K., Saenger W. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1978. V. 17. № 9. P. 694—695.
12. Saenger W. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1980. V. 19. № 2. P. 383.
13. Shirmer R. E., Noggle J. H., Davis J. P., Hart P. A. // J. Amer. Chem. Soc. 1970. V. 92. № 11. P. 3266—3273.
14. Hamer G. K., Balza F., Cyr F., Perlin A. S. // Can. J. Chem. 1978. V. 56. № 24. P. 3109—3116.
15. Saito H., Izumi G., Mamizuka T., Suzuki S., Tabeta R. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1982. № 24. P. 1386—1388.
16. Inoue Y., Okuda T., Chujo R. // Carbohydr. Res. 1985. V. 141. № 2. P. 179—190.
17. Grant D. M., Cheney B. V. // J. Amer. Chem. Soc. 1967. V. 89. № 21. P. 5315—5318.
18. Липкинд Г. М., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 3. С. 407—418.
19. Wagner G., Wüthrich K. // J. Magn. Resonance. 1979. V. 33. № 3. P. 675—680.
20. Cidley M. J., Bociek S. M. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1985. № 4. P. 220—222.
21. Bax A., Freeman R. // J. Amer. Chem. Soc. 1982. V. 104. № 4. P. 1099—1100.

Поступила в редакцию
10.IX.1986

DETERMINATION OF CYCLOHEPTAAMYLOSE CONFORMATION IN SOLUTION BY USING ^1H - AND ^{13}C NMR AND THEORETICAL CALCULATIONS

LIPKIND G. M., SHASHKOV A. S., MAMYAN S. S., KOCHETKOV N. K.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

Nuclear Overhauser effects arising on pre-irradiation of anomeric protons, and vicinal coupling constants $^3J_{\text{C,H}}$ near glycosidic linkage have been measured for cycloheptaamylose in aqueous solution. On the basis of the experimental data as well as of theoretical calculations, it is shown that the cycloheptaamylose conformation in solution is characterised by torsional angles $\varphi=10^\circ$ and $\psi=+13^\circ$ in all disaccharide units.