



УДК 577.114.012.7:543.422.25

ЯДЕРНЫЙ ЭФФЕКТ ОВЕРХАУЗЕРА И КОНФОРМАЦИОННЫЕ СОСТОЯНИЯ 1 → 4-СВЯЗАННЫХ ГЛЮКОЗИЛРАМНОЗИДОВ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Липкин Г. М., Шапков А. С., Николаев А. В.,
Маян С. С., Кочетков Н. К.Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского,
Академии наук СССР, Москва

Проведено измерение ядерных эффектов Оверхаузера при облучении аномерных протонов (а также других протонов) метил-4-О-(β-D-глюкопиранозил)-α-L-рамнопиранозида и метил-4-О-(α-D-глюкопиранозил)-α-L-рамнопиранозида (а также метил-4-О-(α-D-маннопиранозил)-α-L-рамнопиранозида) в водных растворах. Кроме того, измерены вращательные константы спин-спинового взаимодействия ($^3J_{C,H}$) атомов водорода и углерода вблизи гликозидной связи и связевые оптические вращения (Λ). На основе анализа экспериментальных данных и результатов конформационного расчета дано описание конформационного равновесия в водных растворах рассматриваемых дисахаридов.

Данная работа продолжает серию наших публикаций, посвященных экспериментальному и теоретическому исследованию конформационных свойств дисахаридных структур в водных растворах. Ранее были рассмотрены 1-фосфат α-целлобиозы [1], метил-β-мальтозид [2], метил-4-О-(β-D-глюкопиранозил)-β-D-ксилопиранозид и метил-4-О-(α-D-глюкопиранозил)-β-D-ксилопиранозид [3-5]. В настоящей работе изложены результаты конформационного анализа также 1→4-связанных дисахаридов, но с обращенной абсолютной конфигурацией восстанавливающего остатка — метил-4-О-(β-D-глюкопиранозил)-α-L-рамнопиранозида, метил-4-О-(α-D-глюкопиранозил)-α-L-рамнопиранозида и метил-4-О-(α-D-маннопиранозил)-α-L-рамнопиранозида. Рассмотрение таких структур позволило бы проследить зависимость конформации гликозидной связи как от конфигурации аномерного центра невосстанавливающего остатка, так и от конфигурации одного из остатков.

С этой целью для трех дисахаридов сняты спектры ¹H-ЯМР и при облучении аномерных протонов Н1' невосстанавливающих остатков (а также Н6 рамнозы) измерены ядерные эффекты Оверхаузера (ЯЭО). Методом двумерной спектроскопии ЯМР измерены вицинальные константы спин-спинового взаимодействия (KCCB) $^3J_{C,H}$ ядер углерода и протонов вблизи гликозидной связи, во фрагментах Н1'-С1'-О-С4' и С1'-О-С4'-Н4 (номера со штрихами относятся к атому остатков глюкозы и маннозы). Для более детального анализа конформационного равновесия в водных растворах указанных дисахаридов были также определены величины оптического связевого вращения (Λ).

Пространственно разрешенные конформеры дисахаридов были рассчитаны теоретически в приближении механической модели молекулы. Поскольку экспериментальные параметры являются усредненными по ансамблю конформеров, с учетом их бoльцмановских вероятностей были рассчитаны средние значения ЯЭО, констант $^3J_{C,H}$ и величин Λ.

Конформация 1→4-связанных дисахаридов определяется двумя углами вращения вокруг гликозидной связи: С1'-О(φ) и О-С4(ψ)*. При вычислении потенциальной энергии конформеров учитывали невалент-

* Углы φ и ψ равны нулю при *цис*-ориентации связей С1'-Н1' и О-С4; С1'-О и С4-Н4 соответственно; углы измеряют по часовой стрелке от ближней связи к дальней.

Химические сдвиги (м.д.) и их мультиплетность в спектрах ^1H -ЯМР дисахаридов *D* Glcβ1-4 *L* Rhaα1-OMe (I) и *D* Glcα1-4 *L* Rhaα1-OMe (II)

с – синглет, д – дублет, т – триплет, к – квартет, м – мультиплет

Дисахариды	H1 (д)	H2 (дд)	H3 (дд)	H4 (т)	H5 (дк)	H6 (д)	H1' (д)
(I)	4,72	3,97(м)		3,71	3,78	1,41	4,74
(II)	4,70	3,94	3,82	3,50	3,81	1,40	5,06

Дисахариды	H2' (дд)	H3' (т)	H4' (дд)	H5' (ддд)	H6'a (дд)	H6'b (дд)	OMe (с)
(I)	3,35	3,56	3,47(м)		3,95	3,78	3,44
(II)	3,57	3,70	3,46	3,99	3,83	3,77	3,41

Таблица 2

Константы спин-спинового взаимодействия (Гц) в спектрах ^1H -ЯМР дисахаридов *D* Glcβ1-4 *L* Rhaα1-OMe (I) и *D* Glcα1-4 *L* Rhaα1-OMe (II)

Дисаха- риды	$J_{1,2}$	$J_{2,3}$	$J_{3,4}$	$J_{4,5}$	$J_{5,6}$	$J_{1',2'}$	$J_{2',3'}$	$J_{3',4'}$	$J_{4',5'}$	$J_{5',6'a}$	$J_{5',6'b}$	$J_{6'a,6'b}$
(I)	1,7	–	8,0	9,2	6,1	7,7	9,1	8,9	–	1,9	5,0	12,0
(II)	1,8	3,4	9,6	9,6	6,2	3,9	9,6	9,2	9,6	3,0	4,8	11,8

ные взаимодействия, которые рассчитывали с помощью функций, предложенных Скоттом и Шерагой [6], а также торсионный вклад с небольшой величиной барьера вращения вокруг гликозидных связей – 0,9 ккал/моль [7]. Обоснование параметризации силового поля при расчетах конформации углеводных цепей в водной среде дано нами в работах [4, 5]. Вместе с тем результаты такого расчета (расчет 1) сопоставляли с результатами, полученными с учетом экзо-аномерного эффекта [8] в форме, описанной в тексте (расчет 2). Необходимые данные по пространственным структурам моносахаридных остатков: метил- α -*D*-глюкопиранозид, метил- β -*D*-глюкопиранозид, метил- α -*D*-маннопиранозид и метил- α -*L*-рамнопиранозид – взяты из работ [9–11] соответственно. Валентный угол у атома кислорода гликозидной связи принят равным его среднему значению – 116,7° [12].

Теоретический расчет ЯЭО для каждого конформера дисахаридов на протоне *d* в условиях насыщения протона $s-f_s^d$ проводили по формуле Ширмера, Ногла и соавт. [13]. Константы $^3J_{C,H}$ для двух углов вращения вокруг гликозидной связи ϕ и ψ , т. е. константы J^ϕ и J^ψ , оценивали по экспериментальной зависимости, найденной Перлиным с соавт. [14]. Связь между оптическим связевым вращением (Λ) и углами ϕ и ψ дана Рисом [15]. Оценив величины $(f_s^d)^{\phi,\psi}$, J^ϕ , J^ψ и Λ в индивидуальных конформерах, можно при учете всей потенциальной энергетической поверхности дисахаридов рассчитать их средние значения $\langle f_s^d \rangle$ и т. д.

Метил-4-O-(β-D-глюкопиранозил)-α-L-рамнопиранозид (I). Отнесение ключевых сигналов в спектре ^1H -ЯМР дисахаридов (1) выполнено с применением методики селективного гомоядерного резонанса в обычном и разностном вариантах (табл. 1 и 2). Облучение аномерного протона H1' вызывает увеличение интенсивности сигналов H2', H3' и H5' собственного остатка глюкозы и повышение интенсивности сигналов H4, H5 соседнего остатка рамнозы (табл. 3), а также сигнала H3, для которого точно определить ЯЭО не удалось из-за перекрывания линий, соответствующих атомам H3 и H2. Возрастание интенсивности сигнала протонов C-метильной группы отсутствует. Параметры спектров ^{13}C -ЯМР вместе с видциальными константами $^3J_{C,H}$ для атомов углерода C1' и C4,

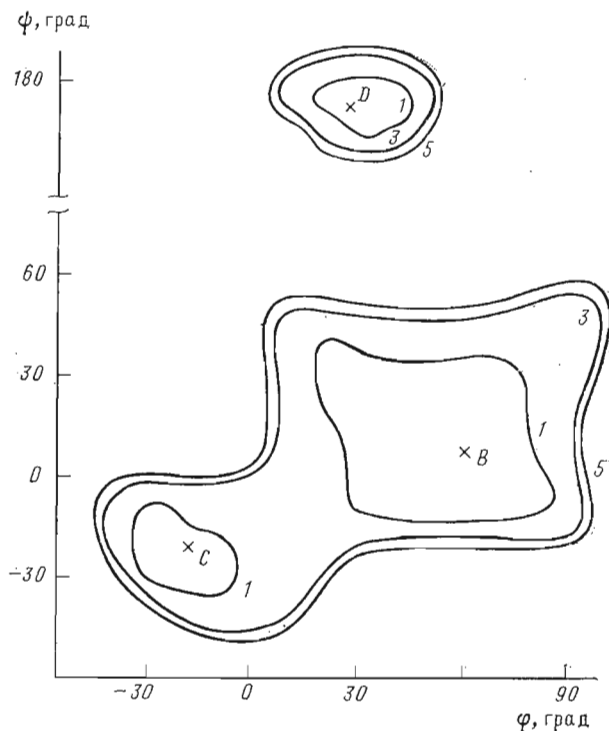


Рис. 1. Конформационная карта $\varphi(C1'-O) - \psi(O-C4)$ дисахарида $DGlc\beta 1-4LRha\alpha 1-OMe$ (I). Эквипотенциальные кривые (в ккал/моль) даны относительно энергии оптимальной конформации B (табл. 5). Крестиком помечены положения минимумов B, C и D. Стрелками показаны протоны, дающие отклик в ЯЭО

т. е. J^{φ} и J^{ψ} , приведены в табл. 4. Константы J^{φ} и J^{ψ} равны 4,2 и 5,2 Гц соответственно. Связевое оптическое вращение определено, согласно [15], по оптическому вращению дисахарида (I) [16] и оптическому вращению метилгликозидов составляющих его остатков; величина Λ равна -10° .

На конформационной карте дисахарида (I) (рис. 1) имеются три локальных минимума с углами вращения φ, ψ $60, 10; -20, -20; 30, 170^{\circ}$ (табл. 5). Такие же оптимальные конформеры найдены и для другого $\beta 1 \rightarrow 4$ -связанного дисахарида — целлобиозы. Им соответствуют символы B, C и D в табл. 2 работы [1]. Вместе с тем один из предпочтительных конформеров целлобиозы — конформер A в случае соединения (I) отсутствует. Это сопряжено с тем, что в дисахариде (I) при отрицательных значениях угла ψ , меньших -35° (в конформации A угол ψ равен -40° [1]), возникают невалентные отталкивания между метильной группой в положении 5 остатка рамнозы и остатком глюкозы. С этим обстоятельством связаны различия в конформационном распределении двух дисахаридов.

Таблица 3

Ядерный эффект Оверхаузера (%) при облучении протона $H1'$ дисахарида $DGlc\beta 1-4LRha\alpha 1-OMe$ (I)

Наблюдаемые протоны	ЯЭО	Наблюдаемые протоны	ЯЭО
$H2'$	2,5	$H4$	8,2
$H3'$	6,4	$H5$	3,2
$H5'$	7,1	$H3$	*

* ЯЭО количественно не определен из-за перекрывания сигналов $H2$ и $H3$.

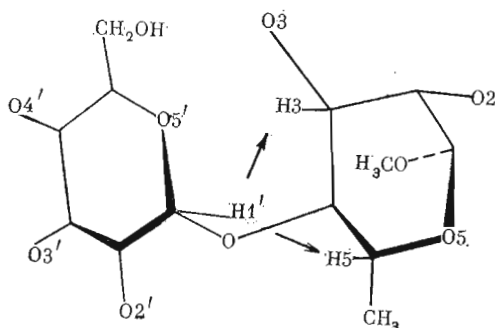


Рис. 2. Молекулярная модель конформера *D* ($\varphi=30$, $\psi=170^\circ$) дисахарида *DGlcβ1-4LRhaz1-OMe*

Как в случае целлобиозы, в рассматриваемом дисахариде допустимым по невалентным взаимодействиям оказывается конформер *D* с углами вращения φ , ψ 30° , 170° , в котором атом $H1'$ глюкозы сближен с атомами $H3$ и $H5$ рамнозы до расстояний всего лишь 2,2 и 2,0 Å (рис. 2). Более того, в дисахариде (I) эта форма является глобальной по энергии (табл. 5) из-за наличия оптимальных невалентных взаимодействий атомов двух остатков (например, $O2'$ и $C5-CH_3$). Однако статистический вес формы *D*, найденный на основе расчета соответствующей статистической суммы $\left(\sum_D e^{-E(\varphi, \psi)/kT}$, где символ *D* означает, что суммирование прове-

дено по значениям углов φ и ψ области *D* на рис. 1), составляет только 20%, тогда как формы *B* — 66% (расчет 1, табл. 5). Отсюда видно, насколько важен учет энтропийного фактора при оценке вероятности того или иного конформера.

В конформере *B* ($\varphi=60^\circ$, $\psi=10^\circ$), которому, несмотря на несколько большую энергию, соответствует максимальный статистический вес, связь $O-C4$ располагается точно в *gash*-ориентации по отношению к связи $C1'-O5'$ остатка глюкозы, и эта структура является оптимальной по критерию *экзо*-аномерного эффекта [17]. Напротив, в конформере *C* ($\varphi=-20^\circ$, $\psi=-20^\circ$, табл. 5) агликон располагается приблизительно в *транс*-ориентации к связи $C1'-O5'$, т. е. по указанному выше критерию он мало реален. Согласно расчету 1, учитывающему только невалентные взаимодействия, его вероятность также невелика (14%, табл. 5). Таким образом, преимущественной пространственной формой дисахарида (I) оказывается конформер *B*.

В работах [1, 4] нами было показано, что положительное связевое вращение Λ целлобиозы прежде всего обусловлено присутствием в водном растворе конформера *A*, для которого теоретическое значение Λ составляет $+122^\circ$. Если в дисахариде (I) пространственная форма *A* отсутствует, то для него величина Λ должна быть существенно меньше. Действительно,

Таблица 4

Химические сдвиги (м.д.) в спектрах ^{13}C -ЯМР дисахаридов *DGlcβ1-4LRhaz1-OMe* (I) и *DGlcα1-4LRhaz1-OMe* (II), а также $KCCB$ $^3J_{C4, H1'}$ (J^φ) и $^3J_{C1', H4}$ (J^ψ) (Гц)

Дисахариды	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C1'	C2'	C3'	C4'	C5'	C6'	OMe
(I)	101,8	71,15	71,45	82,25	68,0	18,0	104,3	75,1	77,0	70,8	77,0	61,95	55,9
	$J^\varphi 4,2 \pm 0,2$; $J^\psi 5,2 \pm 0,2$												
(II)	101,7	71,4	70,15	82,5	67,7	18,0	100,8	72,7	73,95	70,5	73,0	61,4	56,0
	$J^\varphi 4,4 \pm 0,2$; $J^\psi 5,2 \pm 0,2$												

Рассчитанные параметры оптимальных конформеров дисахарида
D Glc β 1-4-*L* Rha α 1-ОМе (I)

Параметры	Конформеры			Средние значения *
	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	
φ, ψ , град	60, 10	-20, -20	30, 170	37, 30
U , ккал/моль	-3,0	-2,8	-3,4	
$f_{H1'}^{H4}$, %	18	24	-1	18,0
$f_{H1'}^{H3}$	0	-1	23	3,9
$f_{H1'}^{H5}$	-1	-1	26	4,2
$f_{H1'}^{H6}$	0	2	0	0,0
$f_{H1'}^{H2'}$				6,5
$f_{H1'}^{H3'}$				15,0
$f_{H1'}^{H5'}$				19,1
J^{φ} , Гц	2,0	4,8	4,3	3,6
J^{ψ}	5,1	4,8	5,8	5,0
Λ , град	-20	+187	+24	+10
Статистические веса, % **	66	14	20	

* Получены при учете невалентных взаимодействий (расчет 1).

** Вычислены по свободным энергиям конформеров.

экспериментальная величина Λ в этом случае равна -10° , тогда как для метил- β -целлобиозида она составляет $+64^\circ$ [15]. Из этих данных также можно заключить, что в случае дисахарида (I) преимущественным конформером является *B*, так как только он в отличие от *C* и *D* дает отрицательное связевое вращение (табл. 5). Этот вывод согласуется и с результатами расчета, по которому вероятность формы *B* составляет 70% (табл. 5).

Сопоставим рассчитанные ЯЭО при условии облучения протона $H1'$ дисахарида (I) с величинами ЯЭО, наблюдаемыми экспериментально (табл. 3). Средние значения $\langle f_s^j \rangle$ приведены в табл. 5. Для качественных заключений в табл. 5 даны рассчитанные ЯЭО в оптимальных конформерах дисахарида (I). Здесь важно подчеркнуть, что величины ЯЭО существенно определяются условиями съемки спектра 1H -ЯМР, поэтому будем сравнивать не абсолютные, а относительные величины ЯЭО. Как видно из табл. 5, оптимальные конформеры *B* и *C* могут обуславливать ЯЭО на протоне $H4$ остатка рамнозы, тогда как конформеры *D* — только на протонах $H3$ и $H5$. Поскольку ЯЭО обнаружены на всех трех указанных атомах, все три пространственные формы должны быть представлены в водном растворе дисахарида (I).

Особенно следует обратить внимание на реальность структуры *D* с углом вращения ψ ($O-C4$) $\sim 180^\circ$ (рис. 2). Эта структура не образует внутримолекулярных водородных связей, не является оптимальной по критерию экзо-аномерного эффекта, более того, значение угла ψ вблизи 180° не было обнаружено в рентгеноструктурных исследованиях олигосахаридов. Тем не менее в водном растворе дисахарида (I) она явно присутствует, и ее доля весьма ощутима, так как наблюдаемый ЯЭО на протоне $H5$ только в 2,5 раза меньше, чем на протоне $H4$ (табл. 3). Конформация *D* обнаружена также и в целлобиозе [1]. Этот факт говорит о том, что в водных растворах дисахаридов угол вращения ψ может изменяться в широких пределах и, что более важно, конформационное равновесие в водных растворах дисахаридов определяется преимущественно невалентными взаимодействиями.

Теоретический расчет средних значений ЯЭО ($\langle J_{\text{H1}'}^{\text{H3}} \rangle$, $\langle J_{\text{H1}'}^{\text{H1}} \rangle$, $\langle J_{\text{H1}'}^{\text{H5}} \rangle$) при условии, что вклады конформеров *B*, *C* и *D* составляют 66, 14 и 20% (расчет 1, табл. 5), приводит к равным величинам ЯЭО на протонах H3 и H5 и к соотношению величин $\langle J_{\text{H1}'}^{\text{H3}} \rangle / \langle J_{\text{H1}'}^{\text{H1}} \rangle$ или $\langle J_{\text{H1}'}^{\text{H5}} \rangle / \langle J_{\text{H1}'}^{\text{H1}} \rangle \sim 1 : 4$ (табл. 5), близкому к экспериментальному. Вместе с тем отметим, что реальное содержание конформера *D* в водном растворе дисахарида (I) на самом деле несколько больше, чем предсказываемое данным расчетом, поскольку наблюдаемое соотношение ЯЭО на атомах H5 и H4 равно $\sim 1 : 2,6$ (табл. 3).

На удовлетворительное в целом описание конформационного равновесия дисахарида (I) указывает расчет опорного ЯЭО на протоне H2' в самом остатке глюкозы и соотношения $\langle J_{\text{H1}'}^{\text{H4}} \rangle / \langle J_{\text{H1}'}^{\text{H2}'} \rangle$, которое, согласно экспериментальным и теоретическим данным, составляет 1 : 3 (табл. 3 и 5). Расчет также удовлетворительно воспроизводит константы ${}^3J_{\text{C,H}}$. Величины $\langle J^{\alpha} \rangle$ и $\langle J^{\beta} \rangle$ равны 3,6 и 5,0 Гц соответственно (табл. 5) и близки к опытным значениям 4,2 и 5,2 Гц (табл. 4).

Средняя величина связевого вращения Λ при учете только невалентных взаимодействий положительна ($+10^\circ$, табл. 5), тогда как опытная величина отрицательна (-10°). Однако этот результат вполне приемлем, так как правильно вскрывает тенденцию к значительному уменьшению связевого вращения при переходе от целлобиозы ($\Lambda = +64^\circ$) к дисахариду (I). То, что в расчете 1 значение Λ оказывается несколько завышенным, скорее всего связано с небольшим переучетом статистического веса состояния *C* с *транс*-ориентацией агликона по отношению к связи C4'—O5', для которого характерно очень большое вращение ($\Lambda = +187^\circ$). Разительное отличие значения Λ в этой форме от наблюдаемой величины, несомненно, указывает на малую реальность такой структуры в водном растворе.

Ранее, при обсуждении конформационных состояний мальтозы и целлобиозы в водных растворах, нами было показано [1, 2, 4], что опытные данные по ЯЭО, ${}^3J_{\text{C,H}}$ и Λ хорошо воспроизводятся в расчетах, игнорирующих *экзо*-аномерный эффект. Поскольку в $\sim 95\%$ конформаций этих двух дисахаридов допустимые по невалентным взаимодействиям значения угла $\varphi > 0^\circ$ в случае целлобиозы ($0-70^\circ$) и $\varphi < 0^\circ$ в случае мальтозы ($-70-0^\circ$), то в β -связанных дисахаридах при углах $\varphi > 0^\circ$ и α -связанных дисахаридах при углах $\varphi < 0^\circ$ можно пренебречь *экзо*-аномерным эффектом. Однако для конформеров с *транс*-ориентацией агликона по отношению к связи O5'—C1', когда угол O5'—C1'—O—C4 близок к 180° (в этом случае углы $\varphi < 0^\circ$ и $\varphi > 0^\circ$ соответственно для α - и β -аномеров), *экзо*-аномерный эффект может играть определяющую роль в их энергетической стабилизации. Поэтому для *транс*-конформеров нами введен инкремент неустойчивости, связанный с *экзо*-аномерным эффектом. Этот инкремент для водных растворов дисахаридов следует приравнять экспериментальной величине аномерного эффекта (0,85 ккал/моль [8]), так как оба эффекта одинаковы по своей физической природе. В расчете 2 дисахарида (I) с учетом дополнительного фактора неустойчивости конформера *C* получено следующее соотношение форм *B*, *C* и *D*: 76, 6 и 21% (табл. 5). В этом случае величина $\langle \Lambda \rangle$ становится отрицательной (-6°).

Такое описание *экзо*-аномерного эффекта существенно отличается от того, которое принято в расчетной схеме HSEA [17, 18]. В отличие от авторов работ [17, 18] мы считаем, что *экзо*-аномерный эффект обуславливает только уменьшение содержания формы типа *C*, мало реальной и по невалентным взаимодействиям. Таким образом, *экзо*-аномерный эффект не меняет существенно положения конформационного равновесия в водных растворах олигосахаридов. Это отчетливо видно из того, что в случае дисахарида (I), как и целлобиозы [1], наблюдаемое значение константы J^{β} достаточно велико (4,2 Гц) по сравнению с константой в конформации с *гаш*-ориентацией агликона (~ 2 Гц).

Подводя итог конформационного анализа дисахарида (I), можно заключить, что в его водных растворах представлены три конформера, *B*, *C*

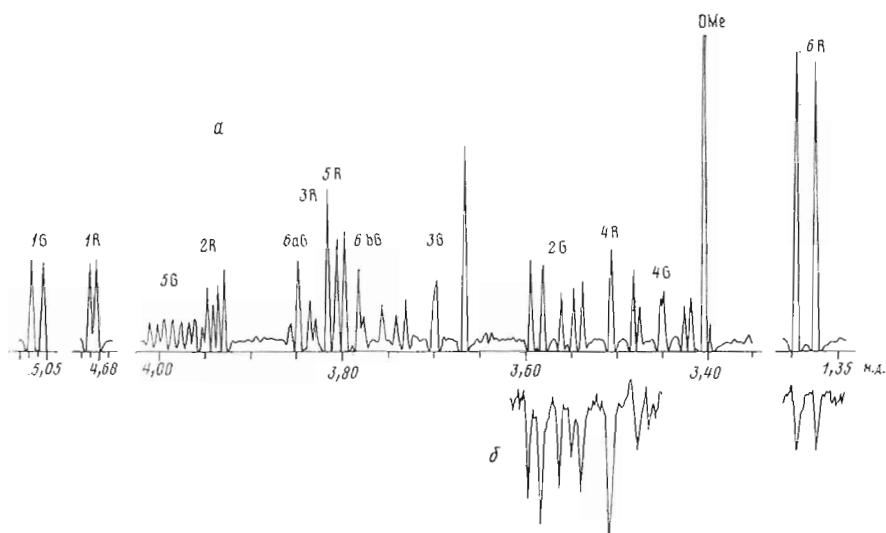


Рис. 3. Спектр ^1H -ЯМР дисахарида $D\text{Glc}\alpha 1-4\text{LRha}\alpha 1-\text{OMe}$ (а) и спектр ЯЭО при облучении протона $\text{H}1'$ (б) (G — Glc, R — Rha). Интенсивность сигнала 6R в спектре ^1H -ЯМР уменьшена вдвое

и *D* (табл. 5), из которых конформер *B* является преимущественным. Заметим, что существование преимущественного конформера еще не свидетельствует в пользу конформационной жесткости дисахарида. Так, область конформационной карты, соответствующая минимуму *B* (рис. 1), простирается в довольно широких границах угла φ ($20-80^\circ$) и угла ψ ($-10-50^\circ$).

Метил-4-О-(α-D-глюкопиранозил)-α-L-рамнопиранозид (II). Параметры спектров ^1H -ЯМР и ^{13}C -ЯМР для дисахарида (II) даны в табл. 1, 2 и 4. Спектры ^1H -ЯМР и ЯЭО при облучении протона $\text{H}1'$ приведены на рис. 3, экспериментальные данные по ЯЭО — в табл. 6. Облучение атома $\text{H}1'$ глюкозы вызывает ЯЭО на атоме $\text{H}2'$ этого же остатка, а также значительное увеличение интенсивности сигнала $\text{H}4$ и более слабое (~ 5 раз) — протонов С-метильной группы рамнозы. ЯЭО на протонах $\text{H}3$ и $\text{H}5$ не наблюдался. Заметный ЯЭО на протонах $\text{H}6$ стимулировал постановку эксперимента, в котором облучению подвергали С-метильную группу рамнозы. В этом случае ЯЭО помимо атомов $\text{H}4$ и $\text{H}5$ самого остатка рамнозы имеет место на протоне $\text{H}1'$, при этом величины ЯЭО на атомах $\text{H}4$ и $\text{H}1'$ оказались одинаковыми (1%). Таким образом, две группы данных по ЯЭО указывают на пространственное сближение протонов $\text{H}1'$ и $\text{H}6$ в дисахариде (II). КССВ J^g и J^r равны 4,4 и 5,2 Гц соответственно (табл. 4). Связевое вращение дисахарида ($\Lambda = -50^\circ$) найдено по его оптическому вращению $[\alpha]_D$ в водном растворе (см. «Экспериментальную часть»).

На конформационной карте $\varphi-\psi$ дисахарида (II) (рис. 4) выделяются четыре оптимальных конформера: *A*, *B*, *C* и *D* (табл. 7). В самой низкоэнергетической конформации (*A*) с приблизительно *гош-ориентацией* агликона атом $\text{H}1'$ располагается на расстояниях ван-дер-ваальсова касания от двух протонов С-метильной группы остатка рамнозы — $\text{H}6a$ и $\text{H}6b$ (рис. 5). Связи $\text{C}6-\text{H}6$ с указанными протонами занимают положения *гош-транс* и *гош-гош* по отношению к связям $\text{C}5-\text{O}5$ и $\text{C}5-\text{C}4$ остатка рамнозы. Наличие стабилизирующих дисперсионных взаимодействий между атомами водорода двух остатков обуславливает энергетическую предпочтительность конформера *A*.

Таблица 6
Ядерный эффект Оверхаузера (%) при облучении протона $\text{H}1'$ дисахарида $D\text{Glc}\alpha 1-4\text{LRha}\alpha 1-\text{OMe}$ (II)

Наблюдаемые протоны	ЯЭО
$\text{H}2'$	7,0
$\text{H}4$	9,5
$\text{H}6$	1,9

Расчитанные параметры оптимальных конформеров дисахарида
*D*Glcα1-4 *L*Rhaα1-OMe (II)

Параметры	Конформеры				Средние значения *
	A	B	C	D	
φ, ψ, град	-40, -20	-30, 20	20, 30	-20, -170	-28, -5
U, ккал/моль	-4,1	-3,4	-3,2	-2,7	
$f_{H4}^{H4'}$, %	22	31	23	-1	24,0
$f_{H6a}^{H6a'}$	6	0	0	-1	
$f_{H6b}^{H6b'}$	5	0	0	0	4,1 **
$f_{H3}^{H3'}$	-1	0	1	24	0,0
$f_{H5}^{H5'}$	-2	-1	-1	28	0,5
$f_{H1}^{H2'}$					20,0
J ^φ	3,5	4,3	4,8	4,3	4,0
J ^ψ , Гц	4,8	4,8	4,3	5,8	5,0
Λ, град	+13	-90	-206	-43	-60
Статистические веса, %	54	34	10	2	

* Получены при учете невалентных взаимодействий.

** Сумма ЯЭО на протонах H6a и H6b.

В структуре *B* сближены только протоны H1' и H4 (до расстояния 2,1 Å). Структура *C* по расположению агликона относится к *транс*-конформерам. По невалентным взаимодействиям она проигрывает структуре *A* ~1 ккал/моль (табл. 7). Структура *D* со значением угла ψ ~180° в данном случае в отличие от дисахарида (I) должна быть представлена в пренебрежимо малых количествах из-за недопустимого сближения *C*-метильной группы рамнозы с атомами H5' и O5', которое делает невозможными колебания по углам вращения φ и ψ.

Расчет распределения по конформациям в дисахариде (II) приводит к следующим вкладам форм *A*, *B*, *C* и *D*: 54, 34, 10 и 3% соответственно (табл. 7). При дополнительном учете инкремента неустойчивости *транс*-конформера *C* (расчет 2) соотношение форм становится немного другим: 58, 35, 4 и 3% (табл. 7).

Отметим, что распределение по конформациям в этом дисахариде и в мальтозе [2] оказывается очень близким. Поэтому можно заключить, что конфигурация апомерного центра гликозидной связи в дисахаридах играет решающую роль в определении конформационного поведения. Тем не менее имеется одно серьезное различие между мальтозой и дисахаридом (II), которое касается только структуры *A*. Если в мальтозе при больших отрицательных значениях угла φ (-60 ÷ -80°) возможны дисперсионные взаимодействия между атомами двух остатков глюкозы, которые допускают образование конформации с углами φ = -70°, ψ = -40° [2, 4], то в дисахариде (II) указанный диапазон угла φ оказывается запрещенным из-за недопустимого сближения протона H1' и *C*-метильной группы рамнозы. Это приводит к смещению положения минимума, соответствующего структуре *A*, до углов вращения φ = -40°, ψ = -20° (табл. 7). Однако, если в оптимальном конформере *A* мальтозы связевое вращение Λ равно +85°, то в случае дисахарида (II) — только +13° (табл. 7). Поэтому следует ожидать, что наблюдаемое связевое вращение для соединения (II) будет существенно меньше. Действительно, если для мальтозы Λ = +39° [15], то в данном случае величина Λ равна -50°. Теоретический расчет средней величины ⟨Λ⟩ для дисахарида (II) приводит к величинам -60° (расчет 1, табл. 7) и -44° (расчет 2).

Обратимся к данным ЯЭО (табл. 6). Появление ЯЭО на протонах H4 и H6 остатка рамнозы при облучении H1' указывает на присутствие в

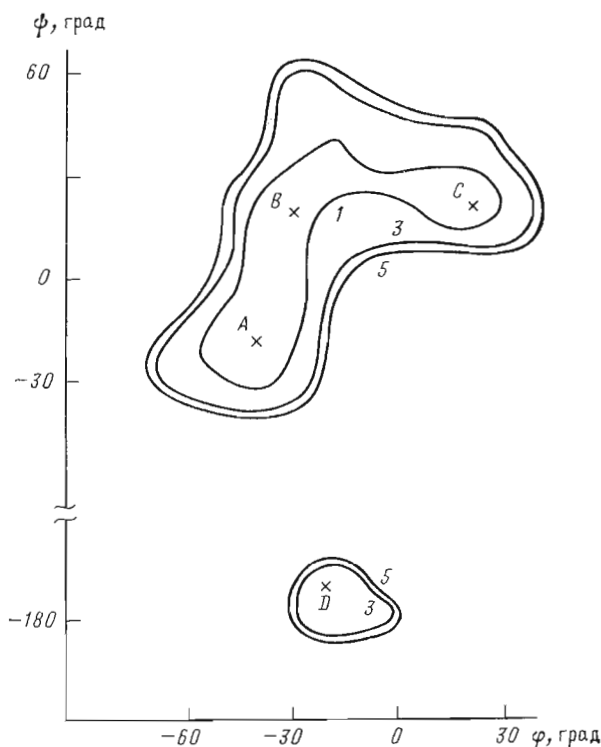


Рис. 4. Конформационная карта $\varphi(C1'-O) - \psi(O-C4)$ дисахарида $DGlca1-4LRhaa1-OMe$ (II). Эквипотенциальные кривые (в ккал/моль) даны относительно энергии оптимальной конформации *A* (табл. 7). Крестиком помечены положения минимумов *A*, *B*, *C* и *D*

водном растворе дисахарида (II) конформера *A*, так как только он может обусловить ЯЭО на этих протонах (табл. 7). Однако для конформера *A* рассчитанное соотношение $(J_{H1'}^{H6a} + J_{H1'}^{H6b})/J_{H1'}^{H1}$ равно 1 : 2, тогда как экспериментальное — 1 : 5. Поэтому очевидно, что в растворе наряду с формой *A* присутствуют формы, которые обуславливают значительный ЯЭО только на протоне H4. Такой же вывод следует из данных по связевому вращению, так как в конформере *A* величина Λ положительна (табл. 7), тогда как наблюдаемая величина отрицательна.

Другой реализующейся в растворе пространственной формой дисахарида (II) является конформер *B*. Это заключение вполне правомочно, если обратить внимание, что опытная величина Λ (-50°) приблизительно представляет собой среднее значение связевых вращений оптимальных конформеров *A* и *B* (табл. 7). Что касается форм *C* и *D*, то их вкладом можно пренебречь, так как величина Λ в случае конформера *C* (табл. 7) разительно отличается от экспериментального значения и ЯЭО на протонах H3 и H5, которые может обуславливать только *D* (табл. 7), экспериментально не наблюдаются.

В целом расчет средних значений ЯЭО на протонах H2', H4 и H6 дисахарида (II) (табл. 7) вполне удовлетворительно воспроизводит соотношение между наблюдаемыми ЯЭО (табл. 6). Как экспериментальное, так и теоретическое соотношение ЯЭО на протонах H6, H4 и H2' при облучении протона H1' составляет приблизительно 1 : 5 : 4 (ср. данные табл. 6 и 7). Такое же заключение можно сделать и в отношении расчета величины $\langle \Lambda \rangle$ (расчетная величина -60° , наблюдаемая величина -50°).

Наконец, обратим внимание на то, что в оптимальных конформерах *A* и *B* дисахарида (II) значения угла ψ невелики ($\pm 20^\circ$). Поэтому неудивительно, что наблюдаемая величина J^ψ (5,2 Гц) и ее расчетное значение (5 Гц) близки к предельному значению ${}^3J_{C,H}$ при $\psi=0^\circ$ (5,3 Гц [14]). Расчетная величина $\langle J^\psi \rangle$ равна 4 Гц и совпадает с экспериментальной в пределах ошибки определения (см. табл. 4 и 7).

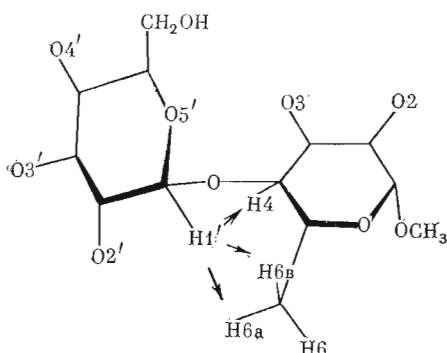


Рис. 5. Молекулярная модель конформатора *A* с углами вращения $\varphi, \psi = -40, -20^\circ$ дисахарида *D*Glc α 1-4LRha α 1-OMe

Хорошее соответствие экспериментальных и расчетных данных позволяет признать реалистическим распределение по конформациям в водном растворе дисахарида (II), предложенное в данной работе: 60% формы *A*, 35% формы *B* и 5% форм *C* и *D* (табл. 7).

Приведенный эксперимент по ЯЭО как с облучением $H1'$, так и облучением *C*-метильной группы рамнозы вполне определенно свидетельствует о том, что в водном растворе дисахарида (II) внутримолекулярные водородные связи не стабилизируют его пространственную форму. Внутримолекулярные водородные связи в приведенных выше расчетах игнорировались. Однако если учесть этот энергетический фактор (его описание см. в работе [4]), то самой низкоэнергетической вместо *A* становится конформация *B*, в которой возможно образование внутримолекулярной водородной связи $O5 \dots O3$. В этом случае вклад формы *B* составляет 80%. В таком расчете мы получаем величину $\langle J_{H1'}^{H4} \rangle$, которая намного больше приведенной в табл. 7, и величину $\langle J_{H1'}^{H6} \rangle$, практически равную нулю, т. е. экспериментальное соотношение ЯЭО на протонах $H6$ и $H4$ в этом случае не воспроизводится. Таким образом, данный пример, как и описанные ранее [1–4], показывает, что при рассмотрении конформационного равновесия дисахаридов в водной среде внутримолекулярные водородные связи можно не принимать во внимание.

Метил-4-O-(α -D-маннопиранозил)- α -L-рамнопиранозид (III). В эксперименте по облучению апомерного протона $H1'$ в дисахариде (III), отличающегося от дисахарида (II) только *манно*-конфигурацией невосстанавливающего остатка, обнаружены ЯЭО на протонах $H4$ и $H6$ (табл. 8), соотношение между которыми такое же, как и в случае дисахарида (II). В дисахариде (III) ЯЭО на протонах $H3$ и $H5$ также отсутствуют. Отсюда следует, что распределение по конформациям в водных растворах этих дисахаридов с *манно*- и *глюко*-конфигурацией невосстанавливающих остатков одинаково. Этот вывод подтверждается результатами ЯЭО при облучении протонов *C*-метильной группы остатков рамнозы, поскольку соотношение наблюдаемых ЯЭО на протонах $H4$ и $H1'$ в двух случаях составляет 1 : 1 (табл. 8).

Теоретические средние значения ЯЭО для дисахарида (III) (табл. 9) найдены в расчетном приближении 2 с учетом инкремента неустойчивости *транс*-конформеров. Для дисахаридов с *манно*-конфигурацией невосстанавливающего остатка такое приближение оказывается более приемлемым, чем приближение расчета 1 (см. [6, 7]). Из табл. 9 видно, что отношение величин $\langle J_{H1'}^{H6} \rangle$ и $\langle J_{H1'}^{H4} \rangle$ близко экспериментальному (1 : 6 и 1 : 5 соответственно). Расчет правильно передает также соотношение ЯЭО на протонах $H4$, $H1'$ и $H2'$ при облучении $H6$ (~1 : 1 : 1). Здесь следует отметить, что при расчете ЯЭО мы не учитывали возможные различия во временах корреляции τ_c протонов *C*-метильной группы рамнозы и протонов $H1'$, $H2'$ и $H4$, поскольку это не существенно при обсуждении соотношения ЯЭО на указанных протонах.

Анализ данных по ЯЭО позволяет принять для дисахарида (III) распределение по конформациям, найденное выше для дисахарида (II): ~60% формы *A* ($\varphi = -50, \psi = -20^\circ$), ~35% формы *B* ($-40, 20^\circ$), ~5% форм *C* ($30, 20^\circ$) и *D* ($-20, -170^\circ$). То, что в растворе дисахарида (III)

Ядерный эффект Оверхаузера (%) при облучении протонов Н1' и Н6 дисахарида *D* Манα1-4 *L* Раα1-ОМе (III)

Облучение Н1'		Облучение Н6	
наблюдаемые протоны	ЯЭО	наблюдаемые протоны	ЯЭО
Н2'	4,6	Н4	1,0
Н4	9,3	Н5	1,6
Н6	1,9	Н1'	1,0
		Н2'	0,7

Таблица 9

Рассчитанные средние значения * ЯЭО (%) при облучении протонов Н1' и Н6 дисахарида *D* Манα1-4 *L* Раα1-ОМе (III)

Облучение Н1'		Облучение Н6	
$\langle f_{\text{Н1}'}^{\text{Н4}} \rangle$	24,0	$\langle f_{\text{Н6}}^{\text{Н1}'} \rangle$	10,2
$\langle f_{\text{Н1}'}^{\text{Н6}} \rangle$	4,1	$\langle f_{\text{Н6}}^{\text{Н2}'} \rangle$	8,1
$\langle f_{\text{Н1}'}^{\text{Н2}'} \rangle$	14,3	$\langle f_{\text{Н6}}^{\text{Н4}} \rangle$	11,0

* Получены с учетом инкремента неустойчивости транс-конформеров (расчет 2).

действительно имеется равновесие нескольких пространственных форм, следует из тех же результатов ЯЭО. Так, для самого низкоэнергетического конформера *A* теоретически ожидаемая величина $f_{\text{Н6}}^{\text{Н2}'}$ равна нулю, тогда как экспериментально наблюдается ЯЭО на протоне Н2' (табл. 8). Такой ЯЭО может быть обусловлен как конформацией *B*, так и конформацией *D*.

Таким образом, сопоставление экспериментальных и расчетных данных по ЯЭО, КССВ, J^{ψ} и J^{ϕ} , связевому вращению (Δ) позволило найти реалистическое описание конформационного равновесия в водных растворах дисахаридов (I)–(III).

Экспериментальная часть

Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР сняты на приборе AM-300 (Bruker) при 50°С с рабочей частотой по протонам 300 МГц, а по углероду – 72 МГц для 3% растворов дисахаридов в D_2O . Химические сдвиги даны относительно 4,4-диметил-4-силантансульфоната (Na-соль) (в протонном спектре, табл. 1) и метанола (в углеродном спектре, табл. 4). Величины ЯЭО измерены по методике ТОЕ [19] при следующих временных константах: D_1 0,5 с (время облучения) и D_2 0,8 с (время релаксационной задержки). ЯЭО (в %) были выражены в виде отношения интегральных интенсивностей наблюдаемого и облучаемого протонов в разностном спектре ЯЭО. Если в спектре ^1H -ЯМР дисахарида (II) (рис. 3) четко выделяется сигнал протона Н1', то в спектре дисахарида (I) сигнал Н1' перекрывается с сигналом Н1 (табл. 1), однако только одной половиной дублета. Поэтому интегральную интенсивность сигнала Н1', необходимую для определения ЯЭО, удалось определить и в этом случае путем удвоения интенсивности левой компоненты дублета сигнала Н1'. Точность измерения ЯЭО 10%. Визуальные КССВ J^{ψ} и J^{ϕ} определяли с помощью двумерной спектроскопии по методикам, описанным в работах [20, 21]. Точность определения констант $\pm 0,2$ Гц.

Дисахарид (I) синтезировали по методике [16]. Дисахарид (II) получали гидрированием метил-2,3-ди-*O*-бензил-4-*O*-(2,3,4,6-тетра-*O*-бензил- α -*D*-глюкопиранозил)- α -*L*-рамнопиранозид [22] над 10% Pd/C в этаноле с 1,4-диоксаном (3:1) при 40°С в течение 6 ч, $[\alpha]_D +42^\circ$ (с 1, вода), $[\alpha]_D +38^\circ$ (с 1, метанол), по литературным данным $[\alpha]_D +43^\circ$ (с 1, метанол) [23].

Авторы выражают благодарность В. И. Торгову за предоставление образца дисахарида метил-4-*O*-(α -*D*-маннопиранозил)- α -*L*-рамнопиранозид.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1985. V. 141. № 2. P. 191–197.
2. Shashkov A. S., Lipkind G. M., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1986. V. 147. № 2. P. 175–182.

3. Мамян С. С., Липкинд Г. М., Шашков А. С., Нифантьев Н. Э., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 8. С. 1101–1110.
4. Lipkind G. M., Verovsky V. E., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1984. V. 133. P. 1–13.
5. Липкинд Г. М., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 9. С. 1229–1241.
6. Scott R. A., Scheraga H. A. // J. Chem. Phys. 1966. V. 44. № 8. P. 3054–3068.
7. Tvaroška I., Bleha T. // Tetrahedron Lett. 1975. № 4. P. 249–252.
8. Стоддарт Дж. Стереохимия углеводов. М.: Мир, 1975.
9. Jeffrey G. A., McMullan R. K., Takagi S. // Acta crystallogr. 1977. V. B33. № 3. P. 728–737.
10. Jeffrey G. A., Takagi S. // Acta crystallogr. 1977. V. B33. № 3. P. 738–742.
11. Takagi S., Jeffrey G. A. // Acta crystallogr. 1978. V. B34. № 6. P. 2551–2555.
12. Arnott S., Scott W. E. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1972. № 2. P. 324–335.
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. Rees D. A. // J. Chem. Soc. B. 1970. № 5. P. 877–884.
16. Bebault G. M., Dutton G. G. S. // Carbohydr. Res. 1974. V. 37. № 2. P. 309–319.
17. Lemieux R. U. // Chem. Soc. Rev. 1978. V. 7. № 4. P. 423–452.
18. Thøgersen H., Lemieux R. U., Bock K., Meyer B. // Can. J. Chem. 1982. V. 60. № 1. P. 44–57.
19. Wagner G., Würlrich K. // J. Magn. Reson. 1979. V. 33. № 3. P. 675–680.
20. Gidley M. J., Bociek S. M. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1985. № 4. P. 220–222.
21. Vax A., Freeman R. // J. Amer. Chem. Soc. 1982. V. 104. № 4. P. 1099–1100.
22. Николаев А. В., Кочетков Н. К. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1986. № 11. С. 2556–2565.
23. Berry J. M., Dutton G. G. S. // Can. J. Chem. 1974. V. 52. № 4. P. 681–683.

Поступила в редакцию
10.IX.1986

NUCLEAR OVERHAUSER EFFECT AND CONFORMATIONAL STATES OF (1→4)-LINKED GLUCOSYL-RHAMNOSIDES IN AQUEOUS SOLUTIONS

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

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

Nuclear Overhauser effects (with preirradiation of the anomeric proton of the nonreducing sugar residue) and $^3J_{C,H}$ coupling constants for H1', C4 and C1', H4 were determined for disaccharides *D*-Glc(β1-4)-*L*-Rhaα1-OMe, *D*-Glc(α1-4)-*L*-Rhaα1-OMe, and *D*-Man(α1-4)-*L*-Rhaα1-OMe in aqueous solutions. These parameters and linkage optical rotation values were calculated on the basis of the theoretical conformational analysis. Conformational equilibrium in aqueous solutions was determined from comparison of the experimental and theoretical values.