



УДК 577.114.012.7 : 543.422.25

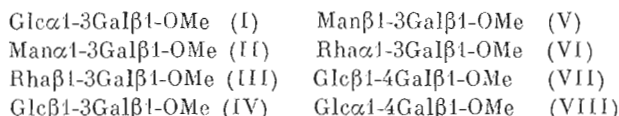
ЯДЕРНЫЙ ЭФФЕКТ ОВЕРХАУЗЕРА И КОНФОРМАЦИИ 1 → 3- И 1 → 4-СВЯЗАННЫХ ГЛИКОЗИЛГАЛАКТОЗИДОВ

Липкин Г. М., Мамян С. С., Шашков А. С.,
Нечаев О. А., Торгов В. И., Шибяев В. Н.,
Кочетков Н. К.

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва

Измерены ядерные эффекты Оверхаузера и константы спин-спинового взаимодействия между атомами водорода и углерода, разделенных межзвеньевой гликозидной связью, в 1 → 3- и 1 → 4-связанных гликозилгалактозидах с различной абсолютной конфигурацией остатков и конфигурацией гликозидных связей. На основе экспериментальных данных и теоретических конформационных расчетов обсуждается пространственное строение дисахаридов в водных растворах.

Настоящая работа посвящена конформационному анализу на основе экспериментальных данных и теоретических расчетов недавно синтезированных [1] β-метилгликозидов гликозил-(1 → 3)-галактозидов (I) — (VI) и двух глюкозил-(1 → 4)-галактозидов (VII), (VIII)*:



Своеобразие гликозил-(1 → 3)-галактозидов состоит в наличии экваториального протона H4 в β-положении к атому углерода C3, участвующему в образовании межзвеньевой гликозидной связи. С этим обстоятельством связаны конформационные особенности и характерные проявления в спектрах ¹³C-ЯМР дисахаридных звеньев, включающих гликозилированные по положению 3 остаток галактозы [2, 3]. Подобная ситуация (наличие экваториального протона H2 в β-положении к атому углерода C3) имеет место и в рассмотренных нами ранее гликозил-(1 → 3)-рамнозидах [4, 5] с манно-конфигурацией гликозилированного остатка. Поэтому представляет интерес сопоставить полученные данные для этих двух рядов соединений и выявить те структурные факторы, которые определяют конформацию такого рода дисахаридов.

Глюкозил-(1 → 4)-галактозиды (VII) и (VIII) относятся к другому стереохимическому классу дисахаридов из-за наличия объемной гидроксиметильной группы в β-положении к α-углеродному атому C4. Эта группа также в значительной степени определяет конформационные свойства ранее рассмотренных (1 → 4)-связанных дисахаридов: β-метилмальтозида и α-целлобиозилфосфата [6—8]. Очевидно, что сопоставление дисахаридов (VII) и (VIII) с указанными производными мальтозы и целлобиозы также позволяет проследить влияние структурных факторов дисахаридного звена на конформационные свойства межзвеньевой гликозидной связи.

В экспериментальной части настоящей работы измерены ¹H-ЯМР-спектры соединений (I)—(VIII) и ядерные эффекты Оверхаузера (ЯЭО) в условиях преобладания апомерных протонов межзвеньевых гликозидных связей. Подчеркнем, что в литературе нет данных ЯЭО для рассматриваемых и аналогичных дисахаридов, за исключением данных для родственных соединений DGalα1-3DGal и DGalNAcα1 → 3DGal в составе детерминантных

* Галактоза, глюкоза, манноза — D-конфигурации, рамноза — L.

олигосахаридов группоспецифических гликопротеинов А и В [9, 10]. Кроме того, в данной работе впервые по спектрам ^{13}C -ЯМР (см. [1]) определены вицинальные константы спин-спинового взаимодействия $^3J_{\text{C,H}}$ во фрагментах $\text{H1}'-\text{C1}'-\text{O}-\text{C3}$ и $\text{C1}'-\text{O}-\text{C3}-\text{H3}$ в случае гликозил-(1 \rightarrow 3)-галактозидов и $\text{H1}'-\text{C1}'-\text{O}-\text{C4}$ и $\text{C1}'-\text{O}-\text{C4}-\text{H4}$ в случае гликозил-(1 \rightarrow 4)-галактозидов. Конформации указанных фрагментов задаются углами вращения вокруг связей $\text{C1}'-\text{O}$ (φ) и $\text{O}-\text{C3}$ или $\text{O}-\text{C4}$ (ψ). Эти углы равны нулю при *цис*-ориентации соответствующих связей $\text{C}-\text{H}$ и $\text{C}-\text{O}$.

В теоретической части работы с целью анализа зависимости рассчитанных результатов от выбора атом-атомных потенциальных функций расчеты потенциальной энергии конформеров упомянутых дисахаридов были проведены с функциями Скотта и Шераги [11] (расчет 1) и с функциями Китайгородского [12] (расчет 2). Кроме того, учитывались торсионная энергия вращения вокруг связей $\text{C}-\text{O}$, электростатические взаимодействия и дополнительная дестабилизация (0,85 ккал/моль) конформеров с *транс*-ориентацией агликона по отношению к связи $\text{C1}'-\text{O5}'$. Обоснование параметризации силового поля в расчетах конформаций олигосахаридов в водной среде дано нами в работах [4–6]. Данные по пространственным структурам остатков β -D-галактозы, α - и β -глюкозы, α -D-маннозы и α -L-рамнозы взяты из нейтронографических исследований [13–16]. В рентгеноструктурной работе [17] приведены координаты остатка β -D-маннозы, на основе которых зеркальным отображением получены координаты β -L-рамнозы. Валентный угол гликозидной связи во всех случаях принят равным его среднему значению $116,7^\circ$ [18].

Расчет величины ЯЭО f_s^d в данной конформации дисахарида на протоне d в условиях насыщения протона s проведен по формуле Ширмера и соавт. [19]. Константы $^3J_{\text{C,H}}$ для данной пары углов φ и ψ , т. е. J^φ и J^ψ , рассчитывались по зависимости, найденной Перлиным и соавт. [20]. При учете всей потенциальной поверхности дисахаридов оценивались средние значения $\langle f_s^d \rangle$, $\langle J^\varphi \rangle$, $\langle J^\psi \rangle$.

Гликозил-(1 \rightarrow 3)-галактозиды. Данные ЯЭО в спектрах ^1H -ЯМР и КССВ J^φ , J^ψ дисахаридов (I)–(VI) приведены в табл. 1, 2. Из табл. 1 видно, что для дисахаридов (I)–(III) наблюдаются значительные и сопоставимые по величине ЯЭО как на протоне H3 при α -углероде, так и на соседнем экваториальном протоне H4 остатка галактозы. Спектр ЯЭО для дисахарида (I) приведен на рис. 1. Для дисахаридов (IV)–(VI) ЯЭО на экваториальном протоне H4 примерно в 10 раз слабее, чем ЯЭО на протоне H3.

Таблица 1

Величины ЯЭО (%), измеренные при предоблучении протонов H1' дисахаридов
В скобках приведены относительные значения ЯЭО

Дисахариды	Наблюдаемые протоны				
	H3	H4	H2'	H3'	H5'
Glc α 1-3Gal β 1-OMe (I)	2,0 (1)	4,5 (2,2)	6,0		
Man α 1-3Gal β 1-OMe (II)	3,8 (1)	8,1 (2,1)	7,2		
Rha β 1-3Gal β 1-OMe (III)	4,8 (1)	4,5 (0,9)	5,8	7,0	10,5
Glc β 1-3Gal β 1-OMe (IV)	7,1 (1)	0,8 (0,1)		18,2*	
Man β 1-3Gal β 1-OMe (V)	5,9 (1)	0,7 (0,1)	5,0	5,4	6,6
Rha α 1-3Gal β 1-OMe (VI)	6,6 (1)	0,6 (0,1)	5,2		
	H4	H6, H6	H2'	H3'	H5'
Glc β 1-4Gal β 1-OMe (VII)	6,1 (2,2)		2,8 (1)		10,3**
Glc α 1-4Gal β 1-OMe (VIII)	8,4 (1)	3,7 (0,4)	8,0		

* Сумма ЯЭО на протонах H2', H3' и H5'.

** Сумма ЯЭО на протонах H3' и H5'.

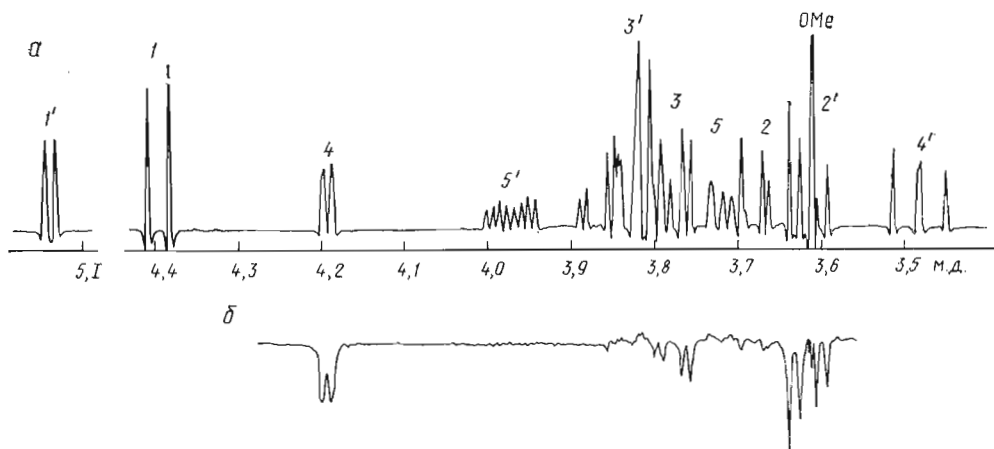


Рис. 1. ^1H -ЯМР-спектр (а) и спектр ЯЭО (б) дисахарида (I)

На конформационных картах φ — ψ дисахаридов (I)—(III) (рис. 2а, б) можно выделить практически один низкоэнергетический оптимальный конформер А с углами вращения φ и ψ -60 и -50° соответственно, поскольку энергия в других минимумах выше на 1,5—2 ккал/моль (табл. 3). Статистический вклад такой конформационной формы в общее конформационное равновесие дисахаридов (I)—(III) составляет 90% (табл. 3).

В найденном оптимальном конформере А оказываются сближенными протоны $\text{H1}'$, H3 и H4 . При этом расстояние между протонами $\text{H1}'$ и H4 (2,1 Å) оказывается меньше, чем расстояние между протонами $\text{H1}'$ и H3 (3Å). Более того, во всех конформерах, соответствующих низкоэнергетической эквипотенциали 1 ккал/моль на рис. 2а, расстояния между протонами $\text{H1}'$ и H4 составляют всего лишь 2,2—2,4 Å. Рассчитанные значения ЯЭО $f_{\text{H1}'}^{\text{H4}}$ и $f_{\text{H1}'}^{\text{H3}}$ в структуре А равны 19 и 2% соответственно (табл. 3). Именно поэтому наблюдается значительный ЯЭО на протоне H4 . Однако в пределах потенциальной ямы с минимумом $\varphi \sim -60$ и $\psi \sim -50^\circ$ имеются конформеры, которые обуславливают появление заметного ЯЭО на протоне H3 . Так, при значениях угла $\psi = -30^\circ$ расчетные величины $f_{\text{H1}'}^{\text{H4}}$ и $f_{\text{H1}'}^{\text{H3}}$ равны между собой.

При расчете средних значений ЯЭО с учетом всей потенциальной поверхности дисахаридов получены величины $\langle f_{\text{H1}'}^{\text{H4}} \rangle$ и $\langle f_{\text{H1}'}^{\text{H3}} \rangle$, отношение которых близко к наблюдаемому экспериментально. Так, для дисахаридов (I) и (II) величина ЯЭО на протоне H4 более чем в 2 раза превышает величину ЯЭО на протоне H3 (табл.1), а расчетное отношение этих величин составляет 2,4 (расчет 1 с функциями Скотта и Шераги) 1,5 (расчет 2 с функциями Китайгородского, табл. 4). Второй результат несколько хуже согласуется с экспериментальными данными, так как в этом случае более высокоэнергетическими оказываются конформеры со значениями угла $\psi = -70 \div -80^\circ$, которым соответствуют большие значения $f_{\text{H1}'}^{\text{H4}}$ (рис. 2). Полученный результат показывает, что преимущественная пространственная форма дисаха-

Таблица 2

Экспериментальные значения КССВ $^3J_{\text{C1}', \text{H3}}$ и $^3J_{\text{C3}, \text{H1}'}$ (Гц)

Дисахариды	J^φ	J^ψ	Дисахариды	J^φ	J^ψ
(I)	3,1	2,7	(V)	4,0	4,2
(II)	3,3	2,7	(VI)	3,7	4,2
(III)	3,7	4,1	(VII)	4,1	5,2
(IV)	4,0	4,2	(VIII)	4,2	5,2

Расчетные значения углов вращения φ , ψ , энергий U и ЯЭО в оптимальных конформациях A , B , C гликозил-(1 → 3)-галактозидов

Параметры	Glc α 1 → 3Gal β 1-OMe (I)			Man α 1 → 3Gal β 1-OMe (II)			Rha β 1 → 3Gal β 1-OMe (III)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
φ , ψ , град	-60, -50	-30, 30	30, 10	-60, -50	-20, 40	40,0	-60, -60	-20, 40	50,0
U , ккал/моль									
Расчет 1	-4,3	-2,5	-1,5	-4,3	-2,5	-1,7	-2,8	-1,5	-0,8
Расчет 2	-1,4	0,5	2,0	-1,4	0,5	2,1	-0,4	1,6	1,6
$f_{H1'}^{H3}$	2	25	15	1	22	15	1	22	21
$f_{H1'}^{H4}$	18	-4	-1	19	-4	-1	19	-3	0
Статистические веса, % *									
Расчет 1	92	6	2	90	6	4	88	8	4
Расчет 2	95	5		95	5		91	7	2

Параметры	Glc β 1 → 3Gal β 1-OMe (IV)			Man β 1 → 3Gal β 1-OMe (V)			Rha α 1 → 3Gal β 1-OMe (VI)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
φ , ψ , град	40, -50	50, 20	-20, -40	40, -50	50, 20	-40, -30	40, -50	50, 20	-30, -30
U , ккал/моль									
Расчет 1	-3,0	-2,4	-1,0	-3,0	-2,3	-1,0	-3,5	-2,5	-1,0
Расчет 2	-0,2	0,2	2,1	-0,2	0,2	1,6	-0,5	0,0	1,5
$f_{H1'}^{H3}$	20	15	13	20	14	11	20	13	14
$f_{H1'}^{H4}$	3	-2	12	3	-2	9	3	-1	8
Статистические веса, % *									
Расчет 1	61	37	2	62	36	2	67	31	2
Расчет 2	59	40	1	57	39	4	60	39	1

* Статистические веса вычислены на основе статистических сумм конформеров.

Таблица 4

Отношения средних значений ЯЭО, а также средние значения КССВ (Гц) в гликозил-(1 → 3)-галактозидах

Дисахариды	Расчет	$\langle f_{H1'}^{H4} \rangle / \langle f_{H1'}^{H3} \rangle$	$\langle f_{H1'}^{H3} \rangle / \langle f_{H1'}^{H2'} \rangle$	$\langle J^{\varphi} \rangle$	$\langle J^{\psi} \rangle$
(I)	1	2,4	0,3	2,7	3,0
	2	1,5	0,4	2,9	3,4
(II)	1	2,4	0,3	2,7	2,9
	2	1,6	0,5	3,0	3,4
(III)	1	1,0	0,7	3,3	3,6
	2	0,9	0,7	3,3	3,8
(IV)	1	0,2	2,0	3,6	3,6
	2	0,1	2,2	3,4	3,9
(V)	1	0,2	1,0	3,5	3,7
	2	0,1	1,0	3,5	4,1
(VI)	1	0,15	1,1	3,5	3,6
	2	0,15	1,2	3,7	4,0

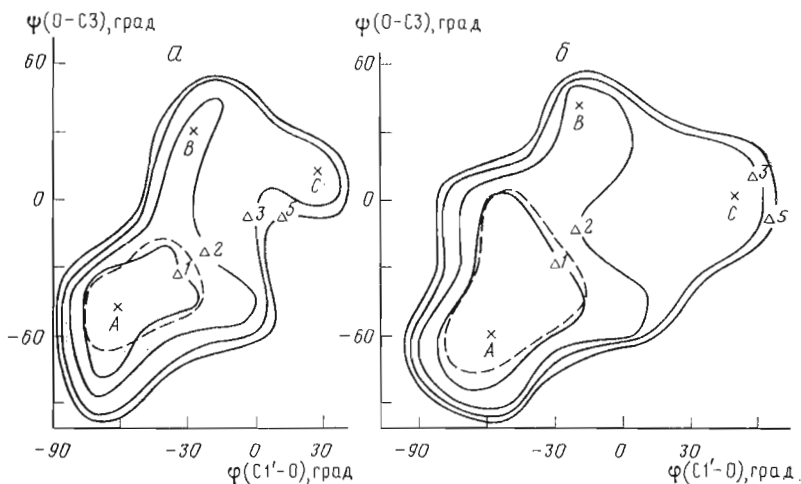


Рис. 2. Конформационные карты $\varphi - \psi$ дисахаридов (I) (а) и (III) (б).² Приведены эквипотенциали относительных величин энергии Δ , соответствующие 1, 2, 3 и 5 ккал/моль согласно расчету 1 с функциями Скотта и Шераги. Пунктиром показана эквипотенциаль 1 ккал/моль в расчете 2 с функциями Китайгородского. Крестиком отмечены положения локальных минимумов

ридов (I) и (II) характеризуется *gosh*-ориентацией агликона к связи $C1' - O5'$ ($\varphi \sim -50^\circ$) и большими (по модулю) отрицательными значениями угла ψ ($\sim -60^\circ$). Близость относительных величин ЯЭО в дисахаридах (I) и (II) позволяет сделать вывод, что замена *глюко*-конфигурации невосстанавливающего остатка на *манно*-конфигурацию не сказывается на конформационных свойствах дисахаридов.

В случае дисахарида (III) наблюдаемые ЯЭО на протонах H3 и H4 остатка галактозы практически равны (табл. 1). Также почти равны и расчетные средние значения $\langle f_{H1}^{H4} \rangle$ и $\langle f_{H1}^{H3} \rangle$ (табл. 4). Для рассмотрения причин перераспределения ЯЭО в этой структуре по сравнению с дисахаридами (I) и (II) обратимся к конформационным картам. В дисахаридах (I) и (II) контур относительной энергии 1 ккал/моль заключен в границах углов $\varphi = -25 \div -75^\circ$ и $\psi = -20 \div -80^\circ$. В дисахариде (III) он занимает заметно большую площадь, так как значения угла ψ достигают 0° (рис. 2б). Это увеличение происходит за счет конформеров, которым соответствуют большие значения f_{H1}^{H3} , что приводит к выравниванию ЯЭО на протонах H3 и H4 остатка галактозы. Несколько большая конформационная свобода дисахарида (III) обусловлена β -конфигурацией межзвепьевой гликозидной связи.

Следует отметить, что во всех рассмотренных нами ранее примерах ЯЭО на протоне агликона, связанном с α -углеродом, образующим гликозидную связь, всегда был наибольшим [4—8]. Поэтому ситуация, которая имеет место в дисахаридах (I) и (II), когда ЯЭО на соседнем протоне H4 примерно в 2 раза больше, чем на протоне H3, — скорее всего исключение, отражающее особенности конформации этих соединений.

Эти особенности проявляются и в величинах КССВ J^φ и J^ψ . Дисахариды (I) и (II) интересны тем, что для них константы J^ψ меньше J^φ и равны всего лишь 2,7 Гц (табл. 2). Отсюда следует, что в этих структурах значения угла ψ близки -60° (КССВ J^ψ при значении угла -60° равна 2 Гц [20]). В дисахариде (III) константа J^ψ значительно больше соответствующего значения для дисахаридов (I) и (II) (4,1 Гц, табл. 2). Это отражает вклад конформеров со значениями ψ , близкими к 0° (при $0^\circ J^\psi = 5,3$ Гц [20]), вероятность которых в этом случае заметно больше, чем для дисахаридов (I) и (II). Данные по КССВ, таким образом, оказались симпатичными данным ЯЭО. Расчетные средние значения $\langle J^\varphi \rangle$ и $\langle J^\psi \rangle$ (табл. 4) находятся в пределах ошибки их экспериментального определения.

В серии гликозил-(1 \rightarrow 3)-галактозидов (IV)—(VI) значительный ЯЭО наблюдается только на протоне H3 остатка галактозы (табл. 1). Эти диса-

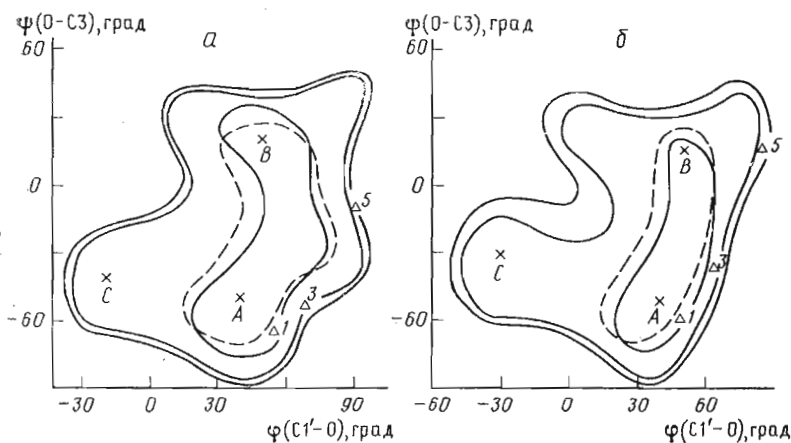


Рис. 3. Конформационные карты $\varphi - \psi$ дисахаридов (IV) (а) и (VI) (б). См. подпись к рис. 2

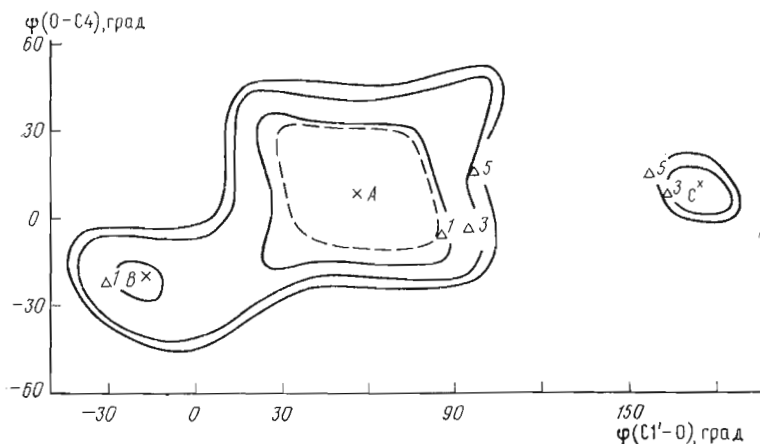


Рис. 4. Конформационная карта $\varphi - \psi$ дисахарид (VII). См. подпись к рис. 2

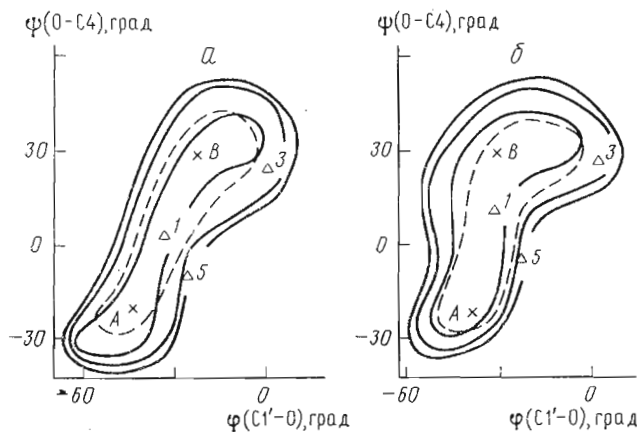


Рис. 5. Конформационные карты $\varphi - \psi$ дисахарид (VIII) при *gt*-(а) и *tg*-ориентации (б) гидроксиметильной группы остатка галактозы. См. подпись к рис. 2

хариды образуют одну стереохимическую группу, что следует из соответствующих конформационных карт $\varphi - \psi$ (рис. 3). Эти карты показывают присутствие значительных количеств двух предпочтительных конформеров А (φ и ψ равны 40° и 50° соответственно) и В (50° и 20°), энергетические различия между которыми невелики и существенно меньше, чем в случае

Эффекты гликозилирования (м. д.) в спектрах ^{13}C -ЯМР гликозил-(1 → 3)-галактозидов

Дисаха- риды	Эффекты замещения на атомах			Дисаха- риды	Эффекты замещения на атомах		
	C1'	C3	C4		C1'	C3	C4
(I)	3,2	4,6	-3,8	(IV)	7,5	9,6	-0,5
(II)	2,9	3,5	-4,1	(V)	7,5	8,6	-0,3
(III)	3,4	6,2	-3,2	(VI)	7,1	7,5	-0,4

дисахаридов (I)—(III) (табл. 3). В этой группе структур статистические вклады форм *A* и *B* сопоставимы (~ 60 и 40% , табл. 3), а диапазон изменения угла ψ оказывается больше и составляет -70° до $+40^\circ$ (рис. 3).

Тем не менее изменение углов вращения φ и ψ в этих пределах практически не сказывается на расстояниях между протонами $\text{H1}'$ и H3 , равных $2,2$ — $2,4$ Å. Это обстоятельство приводит к большому ЯЭО на протоне H3 при преобладании протона $\text{H1}'$. В то же время расстояния между протонами $\text{H1}'$ и H4 заметно больше: $2,5$ — 4 Å. Средние расстояния между протонами $\text{H1}'$, H3 и $\text{H1}'$, H4 равны $2,3$ и $3,2$ Å соответственно. Отсюда очевидно, что ЯЭО на протоне H4 должен быть во много раз меньше, чем ЯЭО на протоне H3 , а в некоторых случаях может не наблюдаться. Для дисахаридов (IV)—(VI) экспериментальное отношение указанных ЯЭО равно $0,1$ (табл. 1).

Согласно расчетным данным, небольшой положительный ЯЭО на протоне H4 возможен в конформере *A* ($f_{\text{H1}'^{\text{H4}}} = 3\%$, табл. 3), тогда как в конформере *B* он отсутствует. Расчет средних значений также приводит к значительно большему ЯЭО на протоне H3 (табл. 4). Отношение величин $\langle f_{\text{H1}'^{\text{H4}}} \rangle / \langle f_{\text{H1}'^{\text{H3}}} \rangle$ составляет $0,2$ (расчет 1) и $0,1$ (расчет 2). Таким образом, конформационные карты на рис. 3 дают реальное представление о пространственных формах дисахаридов (IV)—(VI).

Наблюдаемые значения ЯЭО в соединениях (IV)—(VI) не удается удовлетворительно объяснить, исходя из представлений о сильном преобладании в растворе только одного конформера. Так, проведенный нами расчет по методу HSEA [9] указывает на существование одного конформера с углами вращения φ и ψ , равными 50 и 10° соответственно. Однако в этой структуре величина $f_{\text{H1}'^{\text{H4}}}$ равна нулю, что не соответствует экспериментальным данным. Наблюдение ЯЭО на протоне H4 определенно указывает на реальность конформеров типа *A* с отрицательными значениями угла $\psi \sim -60^\circ$. Вместе с тем преобладание конформера *A*, для которого при значениях угла $\psi = -50$ до -70° по стереохимическим критериям возможно образование внутримолекулярной водородной связи $\text{O5}' \cdots \text{N}-\text{O4}$, не может быть значительным, так как, согласно соответствующему расчету, в этом случае следует ожидать большего ЯЭО на протоне H4 , чем на протоне H3 .

Если ЯЭО оказываются весьма чувствительными к параметрам структуры дисахаридов, то изменение КССВ J^φ и J^ψ происходит в существенно меньшей степени. Так, в дисахаридов (III) и (VI) константы J^φ равны $3,7$, а $J^\psi = 4,1$ — $4,2$ Гц (табл. 2).

Таким образом, разделение производных рассматриваемых дисахаридов на две стереохимические группы по величинам ЯЭО находит убедительное обоснование в результатах конформационных расчетов. Необходимо подчеркнуть, что заметное различие между соединениями (I)—(III), с одной стороны, и (IV)—(VI) — с другой, проявляется и в их спектрах ^{13}C -ЯМР, приведенных в работе [1]. В соответствии с ранее сформулированными закономерностями о величинах эффектов гликозилирования [3] для соединений первой группы наблюдаются малые положительные α -эффекты на атомах $\text{C1}'$ и C3 и большие отрицательные β -эффекты на атомах C4 . Для соединений второй группы наблюдается

Расчетные значения углов вращения φ , ψ , энергий U и ЯЭО в оптимальных конформациях A , B и C глюкозил-(1 → 4)-галактозидов при gt -, tg - и gg -ориентациях гидроксиметильной группы остатков галактозы

Параметры	Glcβ1 → 4Galβ1-OMe (VII)			Glcα1 → 4Galβ1-OMe (VIII)				
	gt			gt		tg		gg
	A	B	C	A	B	A	B	B
φ , ψ , град	50, 10	-20, -20	170, 10	-40, -20	-20, 30	-40, -20	-30, 30	-20, 30
U , ккал/моль								
Расчет 1	-3,5	-2,2	-2,1	-4,4	-3,7	-4,1	-3,8	-2,5
Расчет 2	-1,0	-	-	-0,7	-0,7	-0,6	-0,8	-0,5
$J_{H1'}^{H4}$	15	16	1	15	23	17	26	23
$J_{H1'}^{H6a}$	0	0	0	8	0	1	0	0
$J_{H1'}^{H6b}$	0	5	0	7	0	8	0	0
Статистические веса, %								
Расчет 1	94	3	3	33	27	21	19	
Расчет 2	100	0	0	28	32	18	22	

противоположная картина: большие положительные α -эффекты на C1 и C3 и малые отрицательные β -эффекты на C4 (табл. 5). Симбатность величин β -эффектов гликозилирования величинам ЯЭО на протоне H4 остатка галактозы подтверждает высказанную ранее гипотезу [2, 3], что они обусловлены « γ -*гош*»-взаимодействием протонов, в данном случае H1' и H4.

Своеобразие откликов в спектрах ЯЭО глюкозил-(1 → 3)-галактозидов связано с наличием экваториального протона у атома углерода в β -положении к α -углероду. С подобной ситуацией мы сталкивались в 1 → 3-связанных дисахаридах с *манно*-конфигурацией гликозилируемого остатка, например в глюкозил-(1 → 3)-рамнозидах [4, 5]. Действительно, для глюкозил-(1 → 3)-галактозидов и глюкозил-(1 → 3)-рамнозидов с одним и тем же невосстанавливающим остатком и одинаковой конфигурацией гликозидной связи спектры ЯЭО близки, если сравнивать между собой ЯЭО на протоне H3 и H4 в одном случае и на протонах H3 и H2 в другом. Так, в соединениях Rhaβ1-3Galβ1-OMe и Rhaβ1-3Rhaα1-OMe ЯЭО на протоне H3 и экваториальном протоне H4 (или H2) равны между собой (табл. 1, [4]). Отсюда следует, что одновременное обращение абсолютной конфигурации одного из моносахаридных остатков и изменение положения атома β -углерода, связанного с экваториальным протоном, относительно гликозилированного атома углерода приводит к сохранению конформационных свойств дисахаридов.

Глюкозил-(1 → 4)-галактозиды. В условиях преобладания протона H1' остатка глюкозы в дисахариде (VII) с β 1 → 4-связью ЯЭО наблюдается только на протоне H4, тогда как в дисахариде (VIII) с α 1 → 4-связью — также и на двух протонах H6 гидроксиметильной группы в положении 5 остатка галактозы (табл. 1). КССВ J^{ψ} в двух исследуемых дисахаридах оказались равными между собой, так же как и значения J^{ψ} (табл. 2).

В глюкозил-(1 → 4)-галактозидах указанная гидроксиметильная группа оказывается пространственно сближенной с остатком глюкозы, поэтому конформационные свойства дисахаридов могут зависеть от ее положения. В остатках галактозы эта группа занимает преимущественно две ориентации относительно связи C5 — C6: gt и tg [21].

В случае дисахариды (VII) форма потенциальной поверхности практически не зависит от ориентации гидроксиметильной группы остатка галактозы. Вместе с тем ее присутствие здесь существенно ограничивает

Отношение средних значений ЯЭО, а также средние значения КССВ (Гц) в глюкозил-(1 → 4)-галактозидах

Дисахариды	Расчет	$\langle J_{H1'}^{F6a-H6b} \rangle / \langle J_{H1'}^{H4} \rangle$	$\langle J_{H1'}^{H4} \rangle / \langle J_{H1'}^{H2'} \rangle$	$\langle J^{\varphi} \rangle$	$\langle J^{\psi} \rangle$
(VII)	1		2,0	3,5	4,9
	2		2,0	3,3	4,9
(VIII)	1	0,3	0,9	4,2	4,8
	2	0,2	1,0	4,2	4,8

свободу вращения по углу ψ , который находится в пределах $10 \pm 20^\circ$ (рис. 4). Большая величина константы J^ψ (5,2 Гц, табл. 2) указывает на существенный вклад конформаций с $\psi \sim 0^\circ$ (этому значению соответствует $J^\psi = 5,3$ Гц [20]). В данном дисахариде более лабильным параметром оказывается угол φ , который в пределах основного минимума может изменяться от 20 до 80° , а также принимать значения, равные -20° и 170° (рис. 4). При этом вклад конформеров с $\varphi \sim 0$ значителен, что находит свое отражение в относительно большой величине константы J^φ (4,1 Гц, табл. 2). Рассчитанные средние значения $\langle J^\varphi \rangle$ и $\langle J^\psi \rangle$ (3,5 и 4,9 Гц соответственно) близки к наблюдаемым экспериментально.

На потенциальной поверхности дисахарид (VII) имеется минимум C со значениями углов φ и ψ , равными 170 и 10° соответственно (рис. 4). Однако, согласно расчету, он не вносит заметного вклада в конформационное равновесие. Это подтверждается отсутствием ЯЭО на протоне $H2'$ при предоблучении протона $H4$ (в этой конформации расстояния $H4-H2'$ равно 2,2 А). Можно пренебречь и конформером B , в котором расчетное значение $J_{H1'}^{H6a, H6b}$ составляет 5% (табл. 6), поскольку ЯЭО на протонах $H6$ также не наблюдается. В пределах области на рис. 4, соответствующей преимущественному конформеру A (φ и ψ равны 50 и 10° соответственно) протон $H1'$ может быть сближен только с протоном $H4$. В соответствии с этим ЯЭО был зафиксирован только на этом атоме остатка галактозы (табл. 1).

Дополнительным подтверждением правильности распределения вероятности конформеров дисахарид (VII), задаваемого потенциальной поверхностью на рис. 4 ($\sim 95\%$ формы A), может служить отношение ЯЭО на протонах $H4$ остатка галактозы и $H2'$ остатка глюкозы, которое, согласно расчету, составляет 2,0 (табл. 7), а экспериментально найдено равным 2,2 (табл. 1).

Конформационные карты дисахарид (VIII) при условии gt - и tg -ориентации гидроксиметильной группы остатка галактозы приведены на рис. 5. В этом дисахариде значения углов φ и ψ оказываются взаимозависимыми: увеличение угла φ приводит к увеличению угла ψ . Из сопоставления с конформационными картами других дисахаридов [4—8] следует, что дисахарид (VIII) с аксиальной межзвеньевой гликозидной связью ($-\alpha$) и аксиальным расположением заместителя в остатке агликона ($O4$) является в конформационном отношении наиболее жесткой структурой среди дисахаридов, включающих обычные моносахаридные остатки.

Как при gt -, так и при tg -ориентации гидроксиметильной группы возможны два оптимальных конформера (A и B) с близкими значениями энергий, а также углов вращения φ , ψ (-40 , -20 и -20 , 30° , табл. 6). Оба конформера содержатся в равновесной смеси примерно в равных количествах. Пами также проведен расчет для gg -ориентации гидроксиметильной группы остатка галактозы. Однако в этом случае допустимым оказывается только конформер B (-20 , 30°), который заметно более высокоэнергетичен, чем соответствующие конформеры при других ориентациях указанной группы (табл. 6).

В конформере A в случае gt -ориентации связи $C6-O6$ атом водорода $H1'$ сближен с атомами $H6a$ и $H6b$. Поэтому рассчитанные величины

$f_{H1'}^{Ha}$ и $f_{H1'}^{H6b}$ велики, и их сумма равна величине $f_{H1'}^{H4}$ (табл. 6), тогда как в конформере *B* рассчитанные величины ЯЭО на протонах H6 равны нулю. Поскольку наблюдаемый ЯЭО на протонах H6 приблизительно в 2 раза меньше, чем на протоне H4, то очевидно, что в водном растворе присутствуют приблизительно равные количества этих конформеров. Действительно, конформер *B* вполне реален, что следует из рентгеноструктурного анализа дисахарида $Gal\alpha 1 \rightarrow 4Gal$, в котором углы φ и ψ равны -18 и 35° соответственно [22].

Оценка статистической суммы для конформеров *gt*, *tg* и *gg* дисахарида (VIII) приводит к следующему соотношению их вкладов: 60, 40 и 0% (табл. 6). Анализ экспериментальных данных как рентгеноструктурных исследований [22, 23], так и исследований дисахаридов в водных растворах [24] показывает, что реальный вклад *gt*-, *tg*- и *gg*-ротамеров в остатках галактозы составляет 60, 30 и 10%, что близко к теоретической оценке. В данном случае оказалось возможным использовать результаты работы [24], полученные на дейтеропроизводных гликозилгалактозидов в растворах D_2O , поскольку для одной из рассмотренных структур $Gal\alpha 1 \rightarrow 6Gal$ и для дисахарида (VIII) константы $^3J_{H5,Ha}$ и $^3J_{H5,H6b}$ в восстанавливающих остатках галактозы совпали.

Средние значения ЯЭО в дисахаридах (VIII) были рассчитаны, исходя из вклада *gt*-, *tg*- и *gg*-ротамеров 60, 30 и 10%. В расчете 1 отношение средних величин $(\langle f_{H1'}^{H6a} \rangle + \langle f_{H1'}^{H6b} \rangle) / \langle f_{H1'}^{H4} \rangle$ составляет 0,3 (табл. 7). Поскольку экспериментально найденное отношение ЯЭО равно 0,4 (табл. 1), очевидно, что в данном расчете вклад формы *A* немного недооценивается. В целом для дисахарида (VIII) расчет с функциями Скотта и Шераги приводит к более удовлетворительным результатам, чем расчет с функциями Китайгородского. Полученные средние значения КССВ $\langle J^{\varphi} \rangle$ и $\langle J^{\psi} \rangle$, равные 4,2 и 4,8 Гц соответственно (расчет 1, табл. 7), находятся в хорошем согласии с экспериментально найденными значениями 4,2 и 5,2 Гц (табл. 2).

Преимущественная конформация *A* дисахарида (VIII), возможно, дополнительно стабилизируется в водной среде не только за счет дисперсионных взаимодействий сближенных между собой атомов водорода H1', H6a и H6b, но и за счет гидрофобных взаимодействий этих же атомов, которые специально нами не рассматривались. Более того, в этой конформации на близком расстоянии также находятся атомы водорода H3', H5' и H2, взаимодействие которых может служить дополнительным фактором стабилизации.

Таким образом, анализ данных ЯЭО и КССВ $^3J_{C,H}$ на основе конформационных расчетов в приближении атом-атомных потенциалов позволил найти приемлемое описание конформационного равновесия в водных растворах гликозил-(1 \rightarrow 3)-галактозидов и глюкозил-(1 \rightarrow 4)-галактозидов и проследить изменение равновесия при изменении структуры олигосахарида.

Экспериментальная часть

Спектры 1H , ^{13}C -ЯМР сняты на приборе AM-300 (Bruker) при $60^\circ C$ с рабочей частотой 75 МГц по углероду ^{13}C , 300 МГц — по протонам. В протонном спектре химические сдвиги даны относительно натрий-4,4-диметил-4-силанттан-1-сульфоната (табл. 8,9), а в углеродном — относительно метанола [1]. Отнесение ключевых сигналов в спектрах 1H -ЯМР выполнено при помощи селективного гомоядерного резонанса, в спектрах ^{13}C -ЯМР — методом селективного гетероядерного резонанса. Величины ЯЭО измерены по методике ТОЕ [25] при следующих временных константах: $D_1 = 0,5$ с (время предоблучения), $D_2 = 0,8$ с (время релаксационной задержки). Величины ЯЭО (%) были выражены в виде отношения интегральных интенсивностей наблюдаемого и предоблучаемого протонов в разностном спектре. Винциальные константы J^{φ} и J^{ψ} определялись при помощи двумерной спектроскопии по методикам, описанным в работах [26, 27].

Синтез дисахаридов (I)–(VIII) описан в работе [1].

Химические сдвиги (м. д.) и мультиплетность в спектрах ¹³C-ЯМР дисахаридов

Дисахариды	H1	H2	H3	H4	H5	H6a	H6b	H1'	H2'	H3'	H4'	H5'	H5'a	H6'b	H6'	OME
(I)	4,40д	3,66дд	3,78дд	4,19дд	3,72ддд			5,14д	3,61дд	3,82т	3,48дд	3,97ддд				3,61с
(II)	4,38д	3,61дд	3,78дд	4,20дд	3,70ддд			5,06д	4,02дд	3,93дд	3,71т	3,39--			1,34**	3,60с
(III)	4,39д	3,64дд	3,91дд	4,16дд	3,70ддд	3,82дд	3,77дд	4,82д	4,07дд	3,64*	3,47м	3,47м				3,60с
(IV)	4,40д	3,71дд	3,82дд	4,20дд	3,74ддд			4,70д	3,41дд	3,52**	3,43--	3,43--	3,92**	3,76**		3,61с
(V)	4,40д	3,67дд	3,85дд	4,21дд	3,74ддд			4,90д	4,14дд	3,69дд	3,63т	3,40ддд				3,61с
(VI)	4,36д	3,60дд	3,69дд	3,99дд	3,67ддд			5,02д	4,06дд	3,89дд	3,45т	3,81дд			1,28д	3,57с
(VII)	4,38д	3,62дд	3,80дд	4,20дд	3,76ддд			4,70д	3,40дд	3,52**	3,46--	3,46--				3,61с
(VIII)	4,43д	3,58дд	3,77дд	4,08дд	3,82ддд	3,96дд	3,88дд	4,99д	3,59дд	3,80т	3,56м	3,56м				3,63с

* X-часть АВХУ-спектра (A — H4', B — H5', X — H3', Y — H6').

** X-часть АВХУ-спектра (A — H4', B — H5', X — H6', Y — H3').

** X-часть АВХУZ-спектра (A — H4', B — H5', X — H3', Y — H6'a, Z — H6'b).

** X-часть АВХУZ-спектра (A — H4', B — H5', X — H6'a, Y — H6'b, Z — H3').

Константы спин-спинового взаимодействия (Гц) в спектрах ¹H-ЯМР дисахаридов

Дисахариды	J _{1,2}	J _{2,3}	J _{3,4}	J _{4,5}	J _{5,ca}	J _{ca,cb}	J _{1',1'}	J _{2',2'}	J _{3',3'}	J _{4',4'}	J _{5',5'}	J _{5',ca'}	J _{5',cb'}	J _{6'a,6'b}	J _{5',6'}	
(I)	7,8	10,0	3,1	1,0	3,0		3,8	10,0	10,0	10,0	9,8	2,8	4,8	12,5		
(II)	7,9	10,0	3,1	1,0	2,9	4,0	1,9	3,5	9,8	9,8	9,8					6,2
(III)	7,9	10,0	3,2	1,0	3,0	4,1	1,2	3,4	9,8	9,8	9,8					
(IV)	7,9	10,0	3,1	1,0	3,0		7,8	9,8	9,8	9,8	9,8					
(V)	7,8	10,0	3,2	0,9	3,0		1,1	3,2	9,9	9,9	9,9		6,0	12,4		6,2
(VI)	7,9	10,0	3,2	1,0	3,0		1,9	3,4	9,8	9,8	9,8					
(VII)	7,8	10,0	3,2	1,0	7,4	5,0	7,8	9,8	9,8	9,8	9,8					
(VIII)	7,8	10,0	3,2	1,0	7,4	11,4	3,8	10,0	10,0	10,0	9,8	3,0	3,2	—		—

1. *Нечаев О. А., Торгов В. И., Шибает В. И., Мамян С. С.* // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 3, С. 359—370.
2. *Липкинд Г. М., Кочетков Н. К.* // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 3. С. 407—418.
3. *Kochetkov N. K., Chizhov O. S., Shashkov A. S.* // Carbohydr. Res. 1984. V. 133. P. 173—185.
4. *Липкинд Г. М., Шашков А. С., Книрель Ю. А., Кочетков Н. К.* // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 6. С. 771—779.
5. *Мамян С. С., Липкинд Г. М., Шашков А. С., Байрамова Н. Э., Николаев А. В., Кочетков Н. К.* // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 2, С. 205—215.
6. *Lipkind G. M., Verovsky V. E., Kochetkov N. K.* // Carbohydr. Res. 1984. V. 133. P. 1—13.
7. *Lipkind G. M., Shashkov A. S., Kochetkov N. K.* // Carbohydr. Res. 1985. V. 141. P. 191—197.
8. *Shashkov A. S., Lipkind G. M., Kochetkov N. K.* // Carbohydr. Res. 1986. V. 147. P. 175—182.
9. *Lemieux R. U., Bock K., Delbaere L. T. J., Koto S., Rao V. S. R.* // Can. J. Chem. 1980. V. 58. № 6. P. 631—653.
10. *Bush C. A., Yan Z., Rao B. N. N.* // J. Amer. Chem. Soc. 1986. V. 108. № 20. P. 6168—6173.
11. *Scott R. A., Scheraga H. A.* // J. Chem. Phys. 1966. V. 44. № 8. P. 3054—3068.
12. *Kitaigorodsky A. I.* // Tetrahedron. 1961. V. 14. № 3/4. P. 230—236.
13. *Takagi Sh., Jeffrey G. A.* // Acta crystallogr. 1979. V. B35. № 4. P. 902—906.
14. *Jeffrey G. A., McMullan R. K., Takagi Sh.* // Acta crystallogr. 1977. V. B33. № 3. P. 728—737.
15. *Jeffrey G. A., Takagi Sh.* // Acta crystallogr. 1977. V. B33. № 3. P. 738—742.
16. *Takagi Sh., Jeffrey G. A.* // Acta crystallogr. 1978. V. B34. № 6. P. 2551—2555.
17. *Warin V., Baert F., Fouret R., Strecker G., Spik G., Fournet B., Montreuil J.* // Carbohydr. Res. 1979. V. 76. P. 11—22.
18. *Arnott S., Scott W. E.* // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1972. № 3. P. 324—335.
19. *Schirmer R. E., Noggle J. H., Davis J. P., Hart P. A.* // J. Amer. Chem. Soc. 1970. V. 92. № 11. P. 3266—3273.
20. *Hamer G. K., Balza F., Cyr N., Perlin A. S.* // Can. J. Chem. 1978. V. 56. № 24. P. 3109—3116.
21. *De Bruyn A., Anteunis M.* // Carbohydr. Res. 1976. V. 47. P. 311—314.
22. *Svensson G., Albertsson J., Svensson C., Magnusson G., Dahmen J.* // Carbohydr. Res. 1986. V. 146. P. 29—38.
23. *Marchessault R. H., Peter S.* // Biopolymers. 1979. V. 18. № 8. P. 2369—2372.
24. *Ohrui H., Nishida Y., Watanabe M.* // Tetrahedron Lett. 1985. V. 26. № 27. P. 3251—3254.
25. *Wagner G., Wütrich K.* // J. Magn. Resonance. 1979. V. 33. № 3. P. 675—680.
26. *Gidley M. J., Bociek S. M.* // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1985. № 4. P. 220—222.
27. *Bax A., Freeman R.* // J. Amer. Chem. Soc. 1982. V. 104. № 4. P. 1099—1100.

Поступила в редакцию
6.VIII.1987

NUCLEAR OVERHAUSER EFFECT AND CONFORMATIONAL STATES OF GLYCOSYL-(1-3)- AND -(1-4)-GALACTOSIDES

LIPKIND G. M., MAMYAN S. S., SHASHKOV A. S., NECHAEV O. A.,
TORGOV V. I., SHIBAEV V. N., KOCHETKOV N. K.

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

Nuclear Overhauser effects and spin-spin coupling constants for C- and H-atoms, separated with an interunit glycosidic bond, have been determined for glycosyl-(1-3)- and -(1-4)-galactosides with various absolute configurations of residues and configurations of glycosidic bonds. On the basis of the experimental data and conformational calculations, the spatial structure of disaccharides in aqueous solution is discussed.