

Федеральное агентство по образованию

Московская государственная академия  
тонкой химической технологии  
им. М.В. Ломоносова

кафедра Химической  
Технологии Биологически  
Активных Соединений  
им. Н.А. Преображенского

**Ф.В. Тоукач**

**ПРИМЕНЕНИЕ ДВУМЕРНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР  
В ИССЛЕДОВАНИИ ПРИРОДНЫХ УГЛЕВОДОВ.  
Пример структурного исследования.**

учебное пособие по дисциплине  
«Спектроскопия ЯМР в органической химии»

Москва, 2009

УДК 543.42

Тоукач Ф.В., Применение двумерной спектроскопии ЯМР в исследовании природных углеводов. – М.: МИТХТ, 2009, 14 стр.

Рецензент: проф. Ю.А. Книрель



Издание предназначено для студентов 5-го курса, обучающихся по направлению 550800 «Химическая технология и биотехнология», в качестве учебного пособия по дисциплине «Спектроскопия ЯМР в органической химии» (магистерская программа 550828 «Химия и технология биологически активных веществ»).

Утверждено Библиотечно-издательской комиссией МИТХТ в качестве учебного пособия.

# Содержание

Выбор примера	3
Исходные данные и структурные задачи	4
Доступные методы ЯМР	5
Приблизительная схема исследования	6
Одномерные спектры	7
Гомоядерная корреляция (COSY)	8
Тотальная гомоядерная корреляция (TOCSY)	9
Прямая гетероядерная корреляция (HSQC)	10
Тотальная гетероядерная корреляция (HSQC-TOCSY)	11
Позиции замещения и аномерные конфигурации	12
Пространственная гомоядерная корреляция (ROESY)	13
Дальняя гетероядерная корреляция (HMBC)	14
Эффекты замещения и установленная структура	15

## Выбор примера

В геномике и протеомике установление первичной структуры уже автоматизировано с применением других методов.

Однако, в гликомике: 1) больше химическая вариативность 2) установление строения не алгоритмизировано 3) первичная структура в большей степени определяет третичную структуру и биологические свойства.

Полисахариды внешней мембраны бактерий являются антигенами, поэтому знание их строения открывает путь к иммунологической классификации микроорганизмов, пониманию механизма иммунного ответа на молекулярном уровне и созданию углеводных вакцин, диагностикумов и иммуностимуляторов.

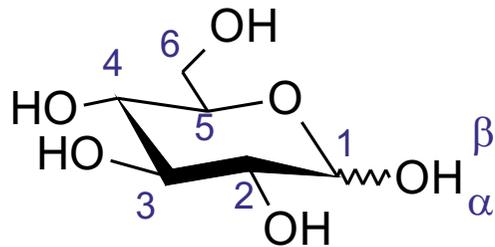
Для демонстрации потенциала ЯМР в установлении строения природных гликополимеров выбран О-антиген бактерии *Edwardsiella tarda* 1153 – гликополимер, повторяющееся звено которого содержит четыре остатка моносахаридов и остаток аминоклицерина.

# Исходные данные

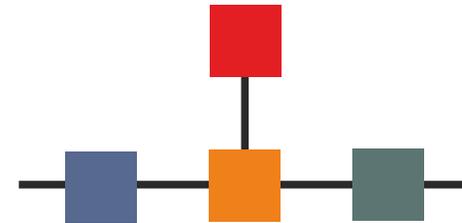
Из липополисахарида клеточной стенки бактерии *Edwardsiella tarda* 1153 выделен O-антигенный полисахарид неизвестной структуры. Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  имел сигналы некратной интегральной интенсивности, что свидетельствовало о нерегулярности повторяющегося звена полимера. Де-O-ацетилирование образца привело к получению 35мг соединения, спектры которого обладали признаками регулярности. Далее приводятся спектры этого соединения в  $\text{D}_2\text{O}$ , снятые на спектрометре Bruker DRX 500МГц.

Предварительное хроматографическое исследование с помощью Sugar Analyzer показало, что присутствуют как минимум остатки **GlcN**, **Gal**, **GalA** в неизвестных пропорциях.

## Структурные задачи



альдо-моносахарид в пиранозной форме



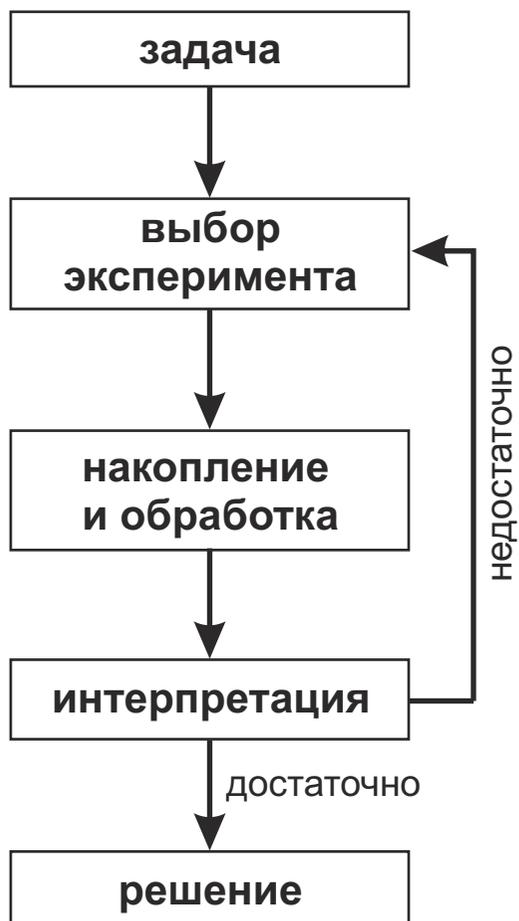
### СТРОЕНИЕ КАЖДОГО ОСТАТКА:

- размер углеродного скелета (5-9)
- положения всех -ОН (ax/eq)
- размер цикла (пираноза, фураноза, полиол)
- деоксигенирование
- аномерная конфигурация ( $\alpha/\beta$ )
- абсолютные конфигурации (D/L)
- $-\text{NH}_2$  вместо  $-\text{OH}$
- $-\text{COOH}$  вместо  $-\text{CH}_2\text{OH}$
- другие функциональные группы

### ПОЛНАЯ СТРУКТУРА:

- строение всех остатков, включая неуглеводные (аминокислоты, алифатические кислоты и пр.)
- положения замещения
- последовательность соединения остатков
- стехиометрия остатков
- фосфатные и сульфатные группы

# Основные эксперименты ЯМР

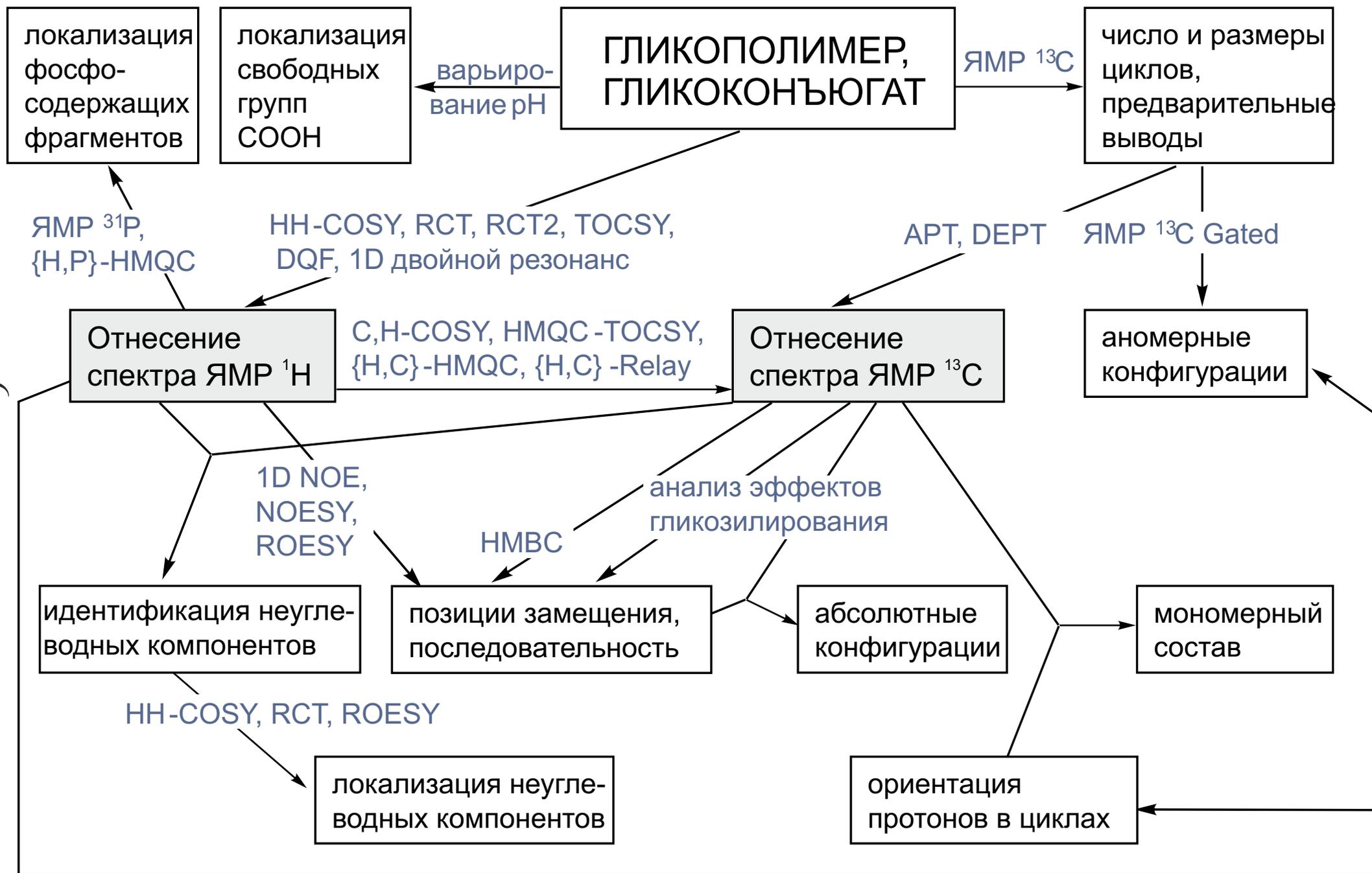


эксперимент		описание	\$, 30мг
1D	$^1\text{H}$	одномерный протонный спектр – общая информация	3
	$^1\text{H}$ Homo	протонный двойной резонанс – селективная блокировка спин-спинового взаимодействия	10
	$^{13}\text{C}$ , $^{14}\text{N}$ , $^{19}\text{F}$ , $^{31}\text{P}$	одномерные спектры по другим ядрам – дополнительная информация, “fingerprints”, позиции замещения	5-20
	APT, DEPT	выявление количества протонов при углеродных атомах	15
	$^{13}\text{C}$ Gated	одномерный спектр $^{13}\text{C}$ без широкополосной развязки от протонов – измерение гетероядерных КССВ	20
	$^1\text{H}$ NOE diff., $^1\text{H}$ HOE diff.	измерение ядерного эффекта Оверхаузера – пространственные контакты протонов с протонами и другими атомами	10 25
2D $^1\text{H}$	COSY, COSY-45	гомоядерная спиновая корреляция – отнесение протонного спектра	12
	COSY RCT, RCT2	гомоядерная спиновая корреляция с дальними протонами – отнесение протонного спектра	20
	DQF COSY	гомоядерная спиновая корреляция без диагональной линии – отнесение близлежащих сигналов	20
	TOCSY	гомоядерная корреляция со всеми протонами спиновой системы – разделение спиновых систем	15
	NOESY / ROESY	гомоядерная пространственная корреляция – выяснение последовательности остатков, конформации	20
	DOSY	разделение протонного спектра на подспектры компонентов смеси	40
2D $^1\text{H}$ - $^n\text{X}$	HMQC	гетероядерная спиновая корреляция – отнесение спектра $^{13}\text{C}$	20
	HMBC	гетероядерная спиновая корреляция с дальними атомами - выяснение последовательности остатков	35
	HMQC Relay	комбинация HMQC и HH COSY – контакты углеродов друг с другом (замена INADEQUATE для протонированных систем)	40
	HMQC-TOCSY	комбинация HMQC и TOCSY – поиск всех атомов другого типа в пределах спиновой системы	35
	HOESY	гетероядерная пространственная корреляция – выяснение конформации	50



интерпретация спектров  
HE является последова-  
тельным алгоритмом

# Приблизительная последовательность экспериментов



# Одномерные спектры

позволяют сделать предварительные выводы о строении и обнаружить фосфосодержащие фрагменты.

## NMR <sup>31</sup>P

нет сигналов

## NMR <sup>13</sup>C ВВ

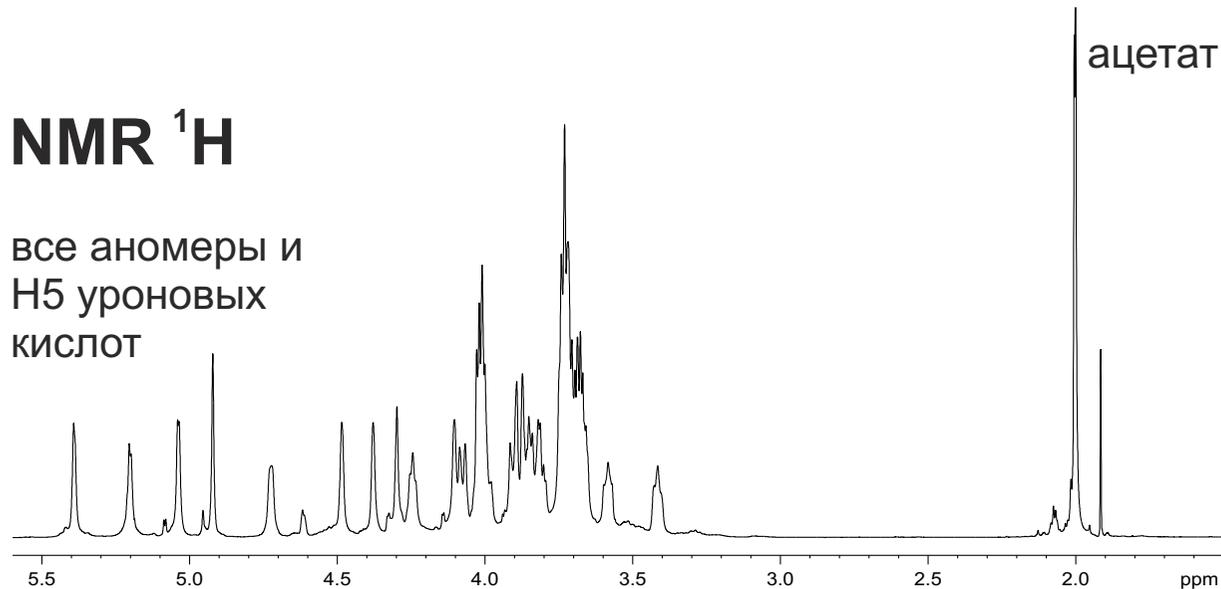
176.1  
175.0  
172.8

103.2  
102.0  
101.3

97.0

## NMR <sup>1</sup>H

все аномеры и  
H5 уроновых  
кислот



83.5

79.0

78.6

76.3

75.7

73.0

72.9

72.5

70.5

70.0

69.5

68.0

67.7

62.7

62.0

61.6

56.0

54.2

24.7

23.8

22.7

4-CH<sub>2</sub>OH

15-CH(OH)-

2 >C-NH-

-COCH<sub>3</sub>

3 >C=O

C1 пираноз

нет фураноз

175 ppm

105

100

95

90

85

80

75

70

65

60

55

ppm

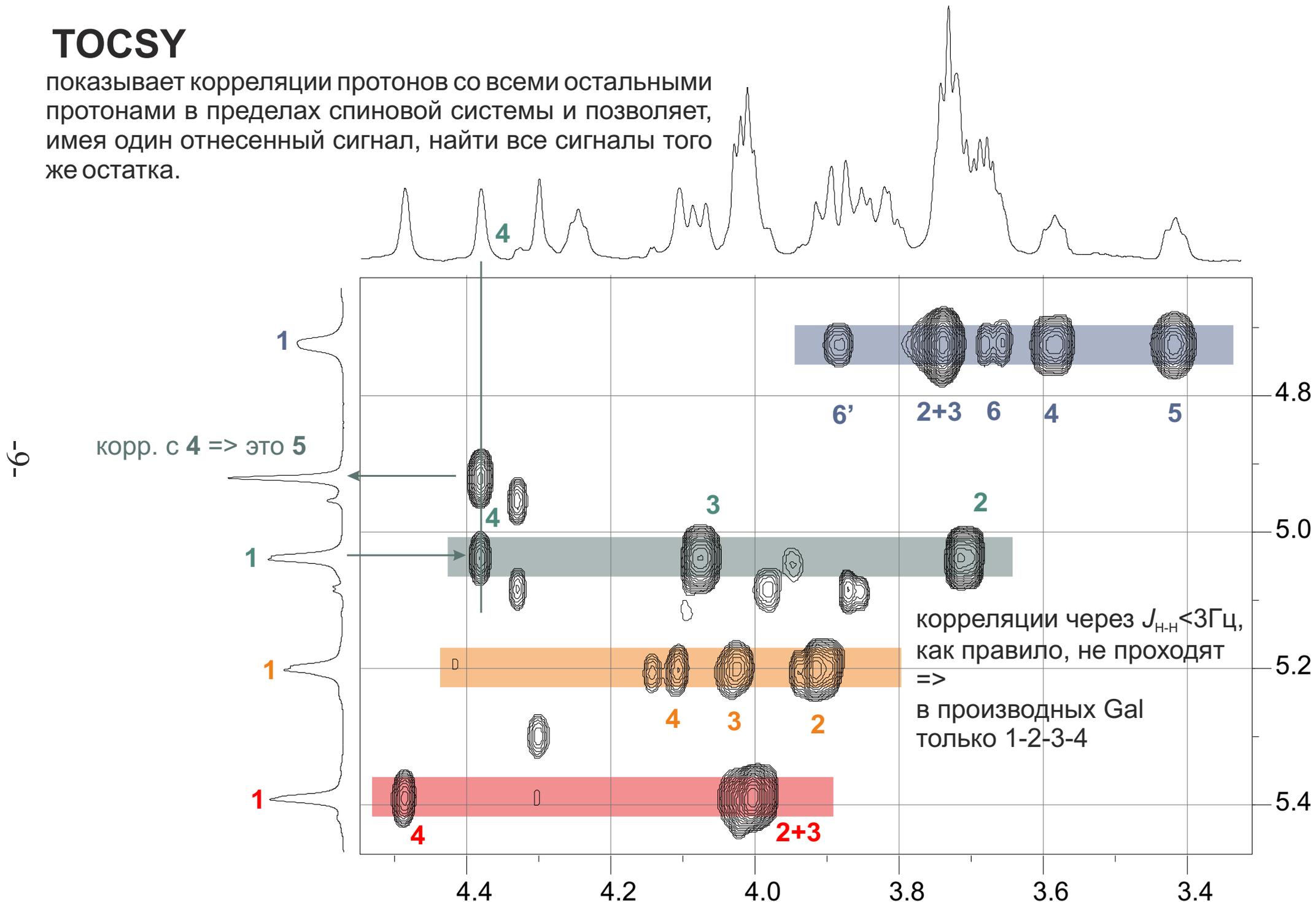
25

ppm



# TOCSY

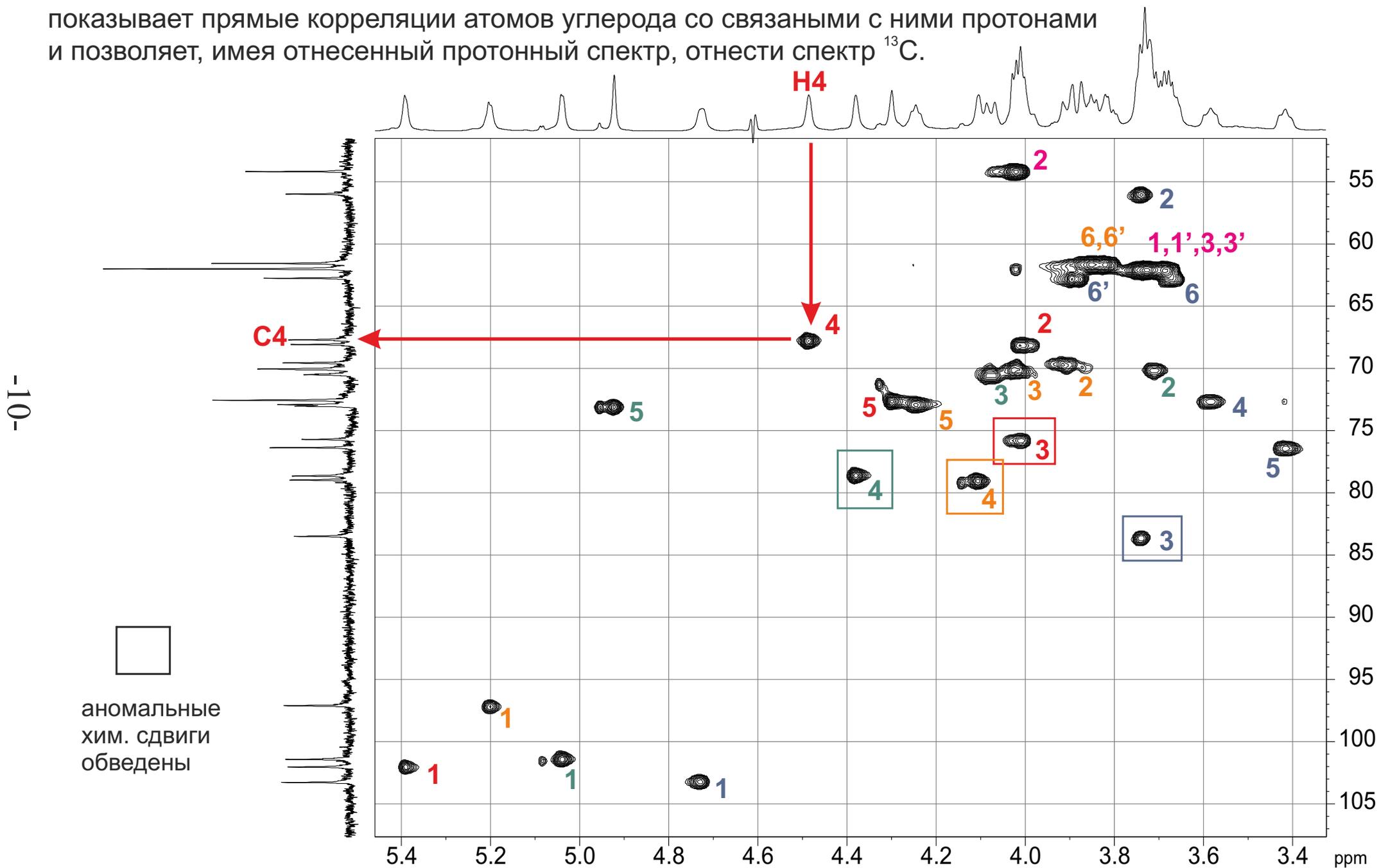
показывает корреляции протонов со всеми остальными протонами в пределах спиновой системы и позволяет, имея один отнесенный сигнал, найти все сигналы того же остатка.



-6-

# {<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C} HSQC

показывает прямые корреляции атомов углерода со связанными с ними протонами и позволяет, имея отнесенный протонный спектр, отнести спектр <sup>13</sup>C.

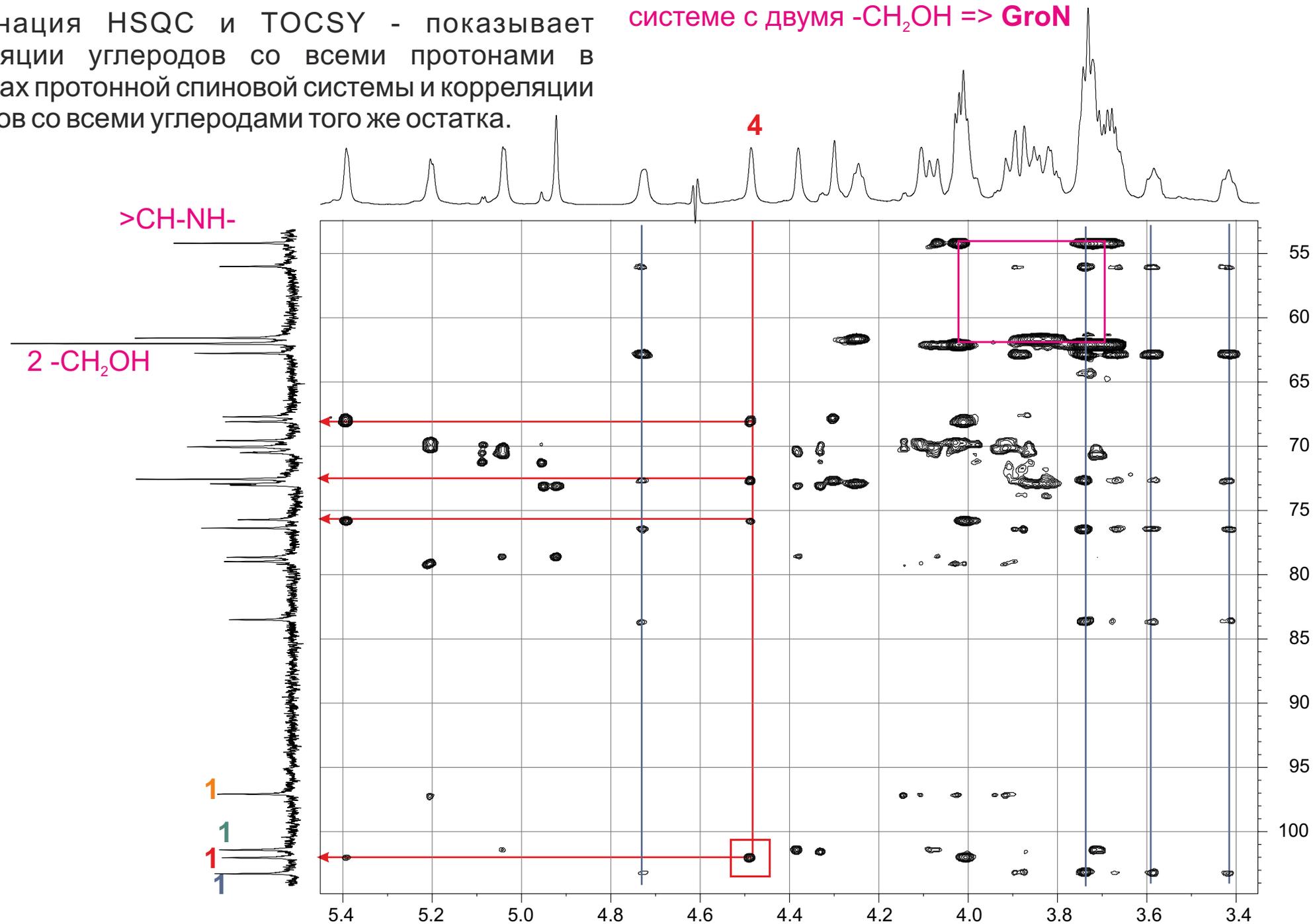


# {<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C} HSQC-TOCSY

комбинация HSQC и TOCSY - показывает корреляции углеродов со всеми протонами в пределах протонной спиновой системы и корреляции протонов со всеми углеродами того же остатка.

3 оставшихся сигнала:  
>CH-NH- находится в одной спиновой системе с двумя -CH<sub>2</sub>OH => **GroN**

-11-



# Позиции замещения и аномерные конфигурации

	C1	C2	C3	C4	C5	C6
→3)-α-D-GalpA <sup>I</sup> -(1→	102.0 +7.2	68.1	<b>75.8</b> +5.4	67.7 -4.0	72.6	175.0
→3)-β-D-GlcpN-(1→	103.3 +7.1	56.0 -2.0	<b>83.5</b> +8.4	72.6 +1.4	76.4	62.8
Ac-(1→2)	176.1	23.8				
→4)-α-D-GalpA <sup>II</sup> -(1→	101.4 +6.6	70.1	70.5	<b>78.7</b> +7.0	73.0 +0.8	172.8 -2.2
GroN-(2→6)	62.0	54.2	62.0			
→4)-α-D-Galp-(1→	97.1 +3.6	69.6	70.1	<b>79.0</b> +8.4	72.9 +1.2	61.6

GlcN

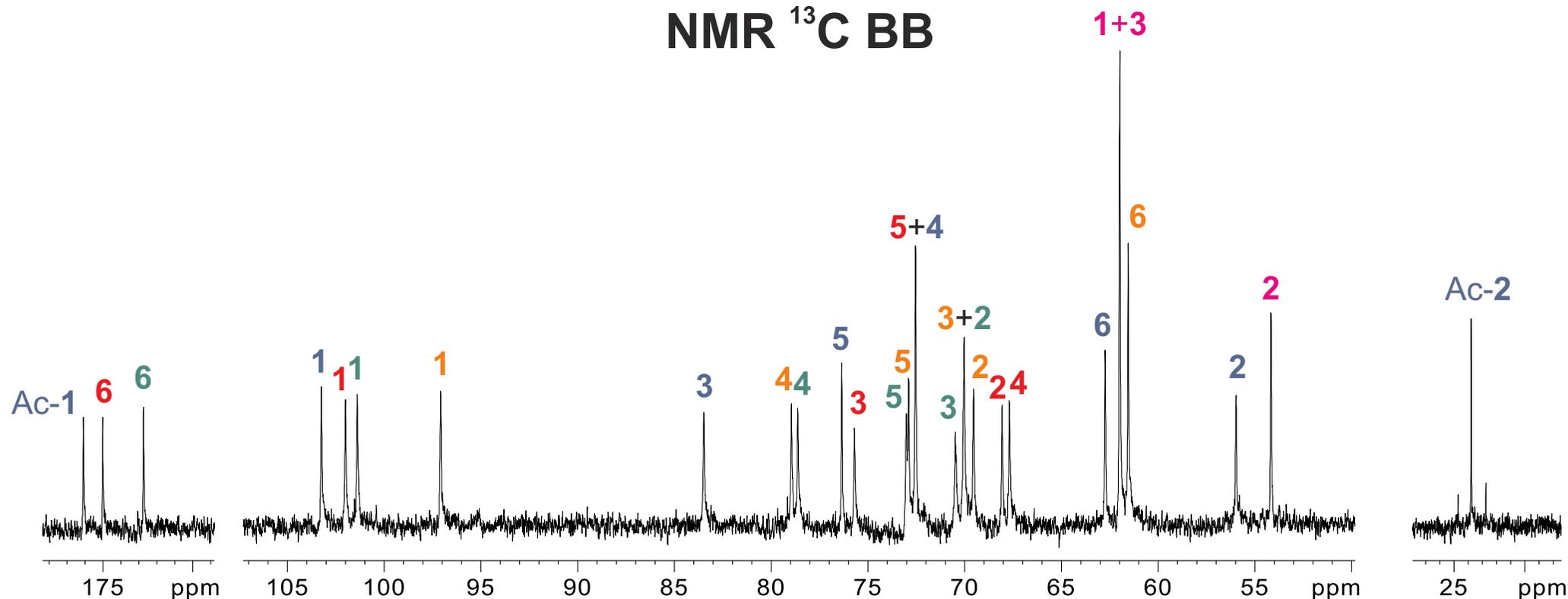
δC5 >76 => β-аномер  
(подтверждение: форма H1)

остальные:

δC5 <73 => α-аномеры  
(подтверждения: форма H1)

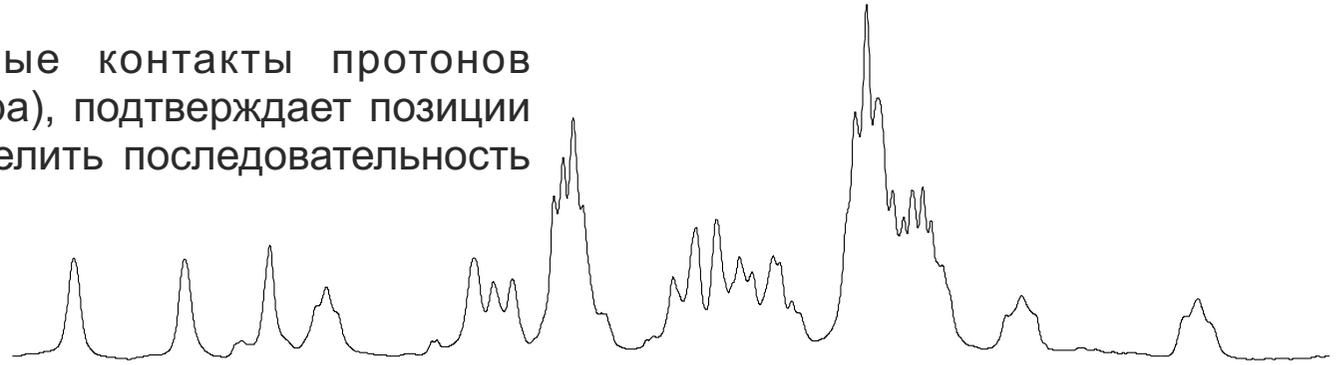
-12-

## NMR <sup>13</sup>C BB



# ROESY

показывает пространственные контакты протонов (ядерные эффекты Оверхаузера), подтверждает позиции замещения и позволяет определить последовательность остатков.



GlcN(1→4)GalA

GalA(1→3)GlcN

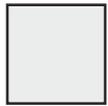
Gal(1→3 или 4)GalA

GalA(1→4 или 6)Gal

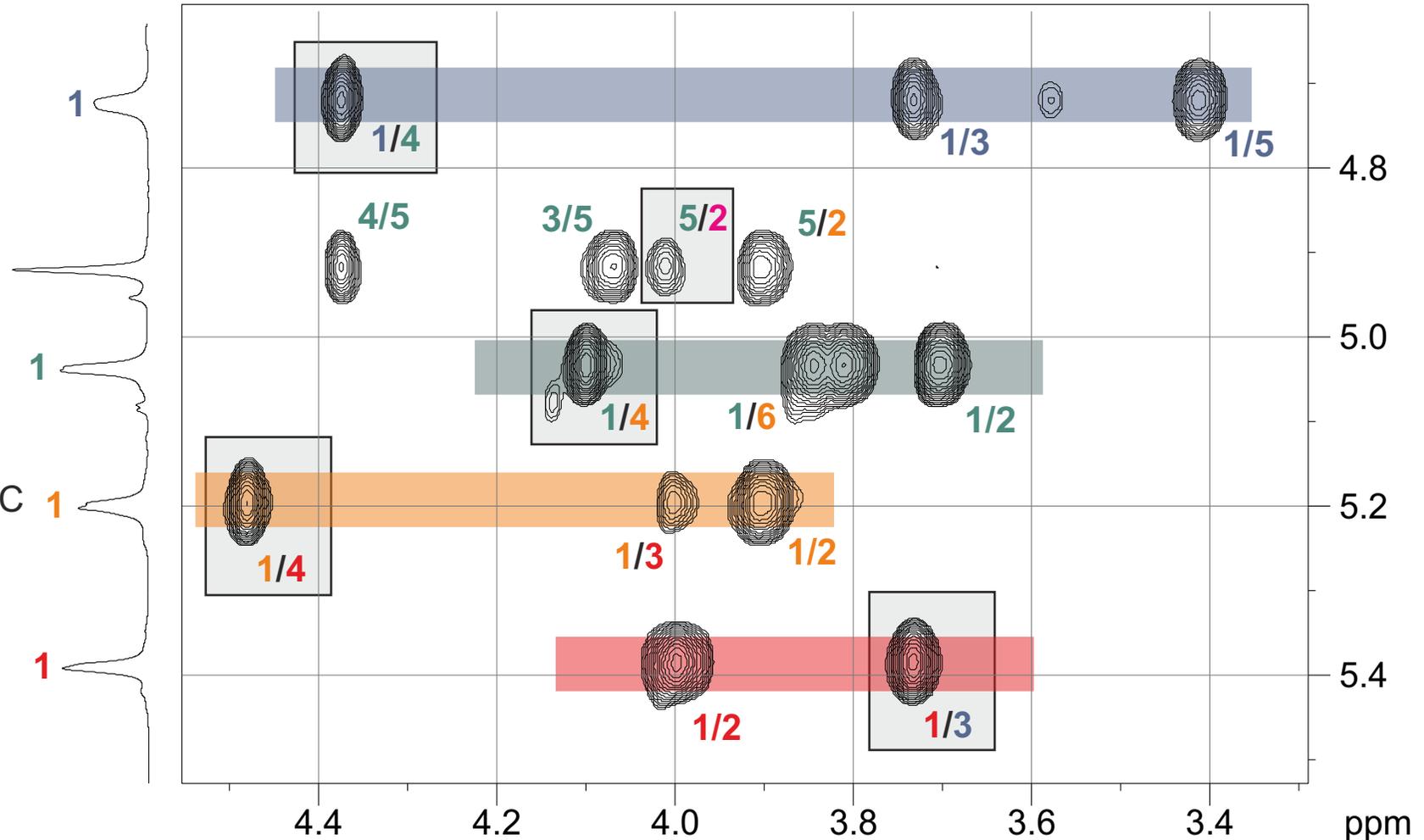
-13-

выбор на основании позиций замещения (HSQC);

подтверждение: HMBC



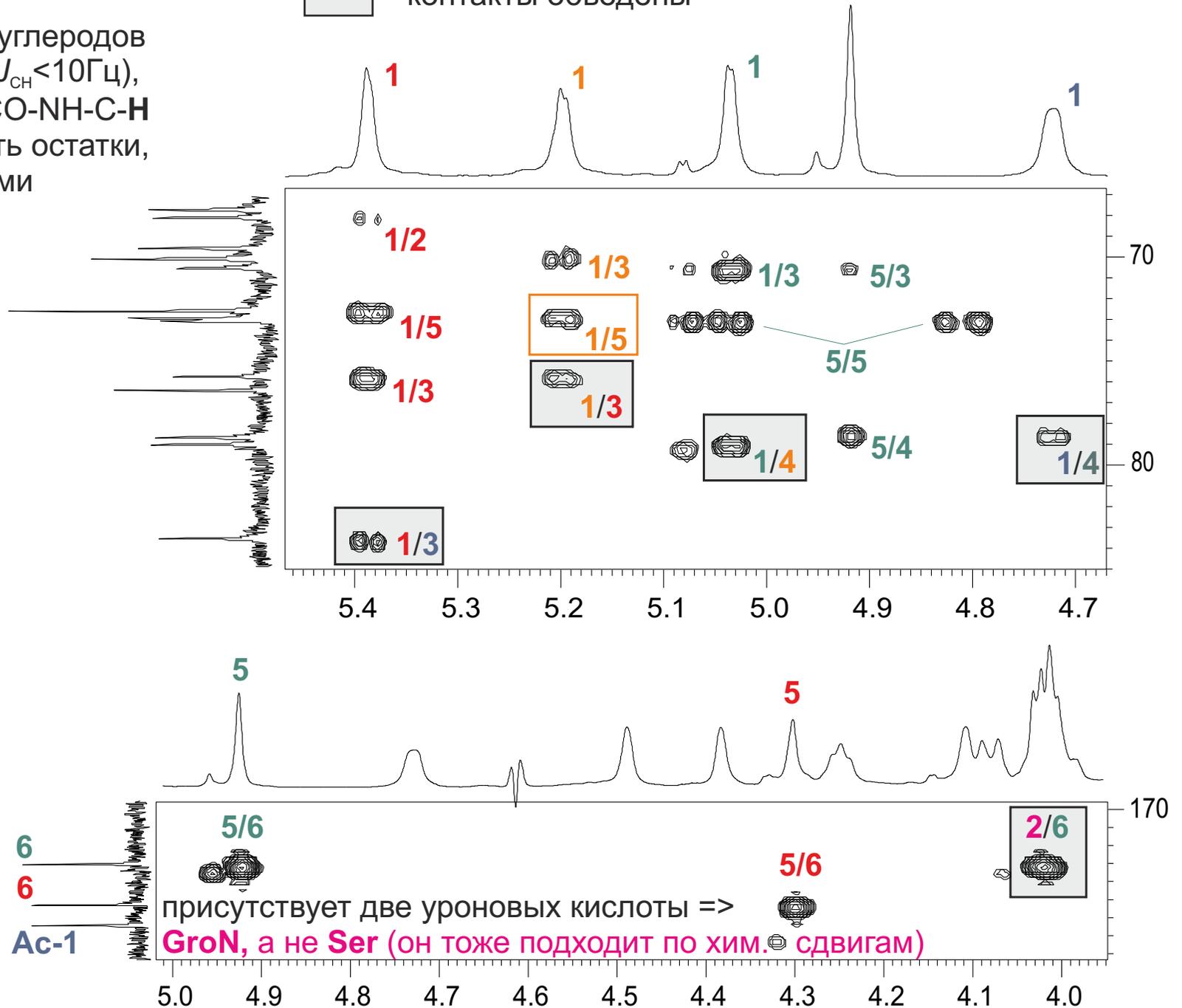
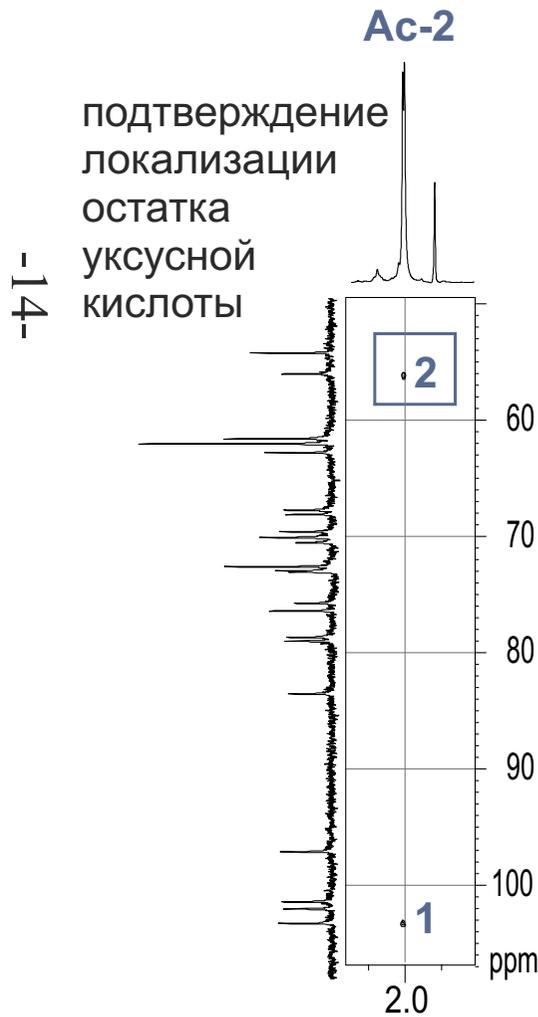
трансгликозидные контакты обведены



# {<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C} HMBSC

показывает корреляции углеродов с дальними протонами ( $J_{CH} < 10$  Гц), в том числе **C-O-C-H** и **CO-NH-C-H** и позволяет локализовать остатки, не дающие NOE с другими

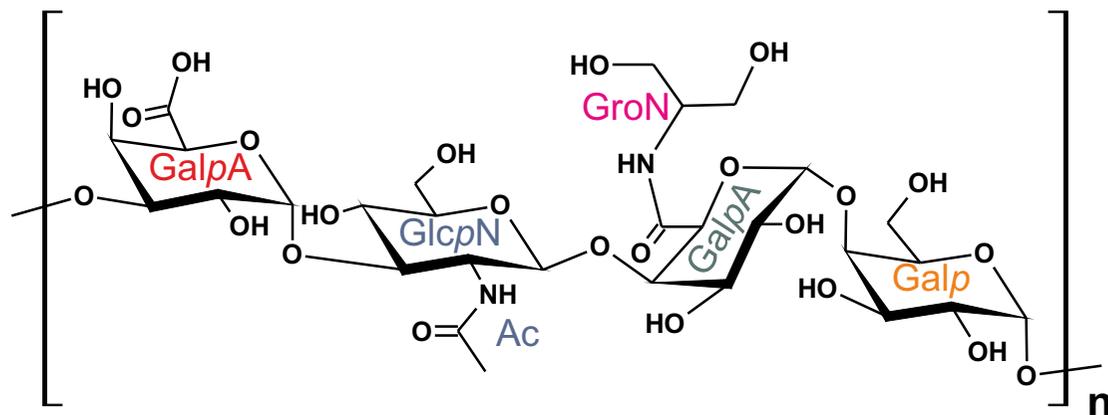
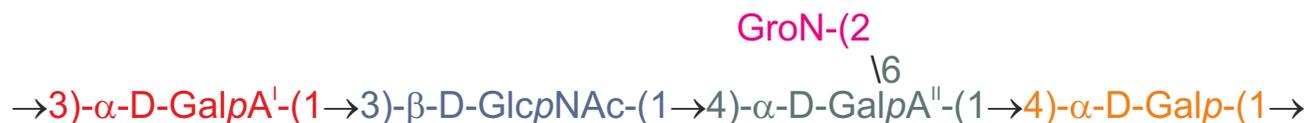
■ трансликозидные контакты обведены



# Абсолютные конфигурации

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	обе GalA - D (из величины оптического вращения их S-бутилгликозидов)				
→3)-α-D-GalpA <sup>I</sup> -(1→	102.0 +7.2	68.1	<b>75.8</b> +5.4	67.7 -4.0	72.6	175.0	пара остатков	атом	теория		эксперимент
→3)-β-D-GlcpN-(1→ Ac-(1→2)	103.3 +7.1	56.0 -2.0	<b>83.5</b> +8.4	72.6 +1.4	76.4	62.8			Gal <sup>α</sup> 1→3GalA <sup>I</sup>	C-1	
→4)-α-D-GalpA <sup>II</sup> -(1→	101.4 +6.6	70.1	70.5	<b>78.7</b> +7.0	73.0 +0.8	172.8	↓	C-4	теория		эксперимент
GroN-(2→6)	62.0	54.2	62.0						GalA <sup>I</sup> β1→3GlcN	C-4	
→4)-α-D-Galp-(1→	97.1 +3.6	69.6	70.1	<b>79.0</b> +8.4	72.9 +1.2	61.6	все оптически-активные остатки имеют D-конфигурацию				

## Строение повторяющегося звена *Edwardsiella tarda* 1153



затраты времени:

выделение и очистка	4
деацетилирование	2
анализ мономерного состава	1
оптические методы	1
накопление ЯМР спектров	8
интерпретация	6
оформление	3
локализация O-ацетатов	4+1

HSQC => в нативном полисахариде остаток Gal O-ацетилирован в положения 2 (45% звеньев) либо 3 (другие 45% звеньев)

Ф.В. Тоукач

ПРИМЕНЕНИЕ ДВУМЕРНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР  
В ИССЛЕДОВАНИИ ПРИРОДНЫХ УГЛЕВОДОВ.

Учебное издание

Гл. редактор

Компьютерная верстка Ф.В. Тоукач

ЛР N 020816 от 20.09.93

Подписано в печать 20.11.2009. Формат А5

Бумага офсетная. Гарнитура Arial. Печать

офсетная. Уч.-изд.л. \_\_\_\_\_ Тираж 50

Заказ N \_\_\_\_\_

Издательско-полиграфический центр МИТХТ.

119571 Москва, пр. Вернадского 86