

**УДК 547.918:543.422:582.5/.9**

**DOI 10.5281/ZENODO.19658934**

## **ТРИТЕРПЕНОВЫЕ ГЛИКОЗИДЫ ARALIACEAE.**

### **V. МЕТОДЫ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ В УСТАНОВЛЕНИИ СТРУКТУРЫ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ АРАЛИЕВЫХ: ОДНО- И ДВУМЕРНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ <sup>1</sup>H-ЯМР**

*Гришковец В. И.*

*Институт биохимических технологий, экологии и фармации (структурное подразделение)  
ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», Симферополь, Россия  
E-mail: vladgri56@yandex.ru*

Рассмотрено применение современных методов одно- и двумерной спектроскопии <sup>1</sup>H-ЯМР в установлении строения тритерпеновых гликозидов растений семейства Аралиевые а примере одного из новых, выделенных нами из *Kalopanax septemlobum*, гликозидов – 3-O-β-D-ксилопиранозил-(1→3)-O-α-L-рамнопиранозил-(1→2)-O-α-L-арабинопиранозил-28-O-α-L-рамнопиранозил-(1→4)-O-β-D-6-O-ацетилглюкопиранозил-(1→6)-O-β-D-глюкопиранозилового эфира хедерагенина. Рассмотрены принципы отнесения сигналов в одно-и двумерных спектрах <sup>1</sup>H-ЯМР применительно к тритерпеновым гликозидам. Детально рассмотрено использование двумерных методик COSY, COSY+1RCT, COSY+2RCT, TOCSY, а также методики по фиксации одномерного ЯЭО и его двумерные варианты ROESY и CAMELSPIN.

**Ключевые слова:** *Araliaceae*, тритерпеновые гликозиды, одно- и двумерная спектроскопия <sup>1</sup>H-ЯМР, методики COSY, COSY+1RCT, COSY+2RCT, TOCSY, ЯЭО, ROESY, CAMELSPIN.

## **ВВЕДЕНИЕ**

В предыдущих статьях [1, 2] рассматривалось применение химических (главным образом гидролитических) и ферментативных методов в установлении моносакхаридного состава и природы агликонной части гликозидов или методов частичного расщепления с идентификацией получаемых прогенинов. Однако полная и однозначная информация о структуре гликозидов в настоящее время получается исключительно с применением методов спектроскопии ЯМР, и в частности, рассматриваемой в данной статье одно- и двумерной спектроскопии <sup>1</sup>H-ЯМР.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

ЯМР-спектры получены на приборах "Bruker" WM-250, "Varian" VXR-300, "Bruker" AM-300, "Bruker" AM-400, "Bruker" DRX-500. Для двумерных экспериментов использовались стандартные методики COSY-DQF, COSY+RCT, COSY+2RCT, TOCSY, NOESY, ROESY, HSQC, HMBC (пакет стандартных

программ фирмы "Bruker"). Время смешивания (спин-локинга) в двумерных экспериментах ROESY составляло 200 мс. Для ЯМР-исследования гликозиды предварительно подвергали троекратной обработке дейтерометанолом или смесью дейтерометанола и тяжелой воды (4:1) каждый раз в течение суток с последующей отгонкой растворителей досуха. Использовали растворы гликозидов в пиридине- $d_5$  или их полных ацетатов в дейтерохлороформе с добавлением внутреннего эталона – тетраметилсилана.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительный анализ спектров ЯМР выполнялся на основе данных выше названных химических методов. Одномерные спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР позволяли прежде всего точно определить число моносахаридных остатков по количеству дублетных сигналов аномерных протонов в сравнительно низкопольной области (4,6–6,3 м.д.), а по величине КССВ  $J_{1,2}$  и химическому сдвигу с учетом литературных данных иногда однозначно отнести к тому или иному моносахаридному остатку. Последняя задача сравнительно легко решалась лишь для остатков арабинофуранозы, рамнопиранозы и арабинопиранозы, имеющих КССВ  $J_{1,2}$  соответственно в 1,0, 1,5 и 6–7 Гц, что явно отличает их от КССВ  $J_{1,2}$  для остатков глюкопиранозы, глюкуронопиранозы, галактопиранозы и ксилопиранозы, которые имеют практически одинаковые КССВ  $J_{1,2}$  около 8 Гц. Кроме того, в низкопольной области (выше 5 м.д.) обычно легко идентифицировались псевдотриплетные сигналы винильного протона H-12 агликонной части гликозидов  $\alpha$ - и  $\beta$ -амириновых рядов, протона H-16 $\beta$  (5,2–5,3 м.д.) в 16 $\alpha$ -гидроксипроизводных агликонов этих же рядов, синглетный сигнал альдегидного протона H-23 (около 9,8 м.д.) в гликозидах гипсогенина, а в высокопольной области (0,8–1,3 м.д.) – синглетные сигналы метильных групп у четвертичных C-атомов агликонной части. Достаточно легко также идентифицировались дублетные сигналы метильной группы (H-6) остатков рамноз в области -1,7 м.д. с КССВ  $J_{5,6}$  6,5 Гц. В спектрах гликозидов с ацетильными группами также легко удавалось идентифицировать их синглетные сигналы в области 1,9–2,2 м.д. и определить число этих групп в молекуле. В ряде случаев удавалось идентифицировать и специфически расщепленные дублет-дублетные сигналы протонов H-3 и H-18 агликонных частей гликозидов  $\alpha$ - и  $\beta$ -амиринового рядов в области 3,0–4,3 м.д., когда они не перекрывались с сигналами скелетных протонов углеводных частей гликозида. На рис. 1 в качестве примера представлены фрагменты обзорного  $^1\text{H}$ -ЯМР спектра одного из новых, выделенных нами из *Kalopanax septemlobum*, гликозидов – 3-O- $\beta$ -D-ксилопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)-O- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\alpha$ -L-арабинопиранозил-28-O- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-6-O-ацетилглюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 6)-O- $\beta$ -D-глюкопиранозилового эфира хедерагенина (**170**):

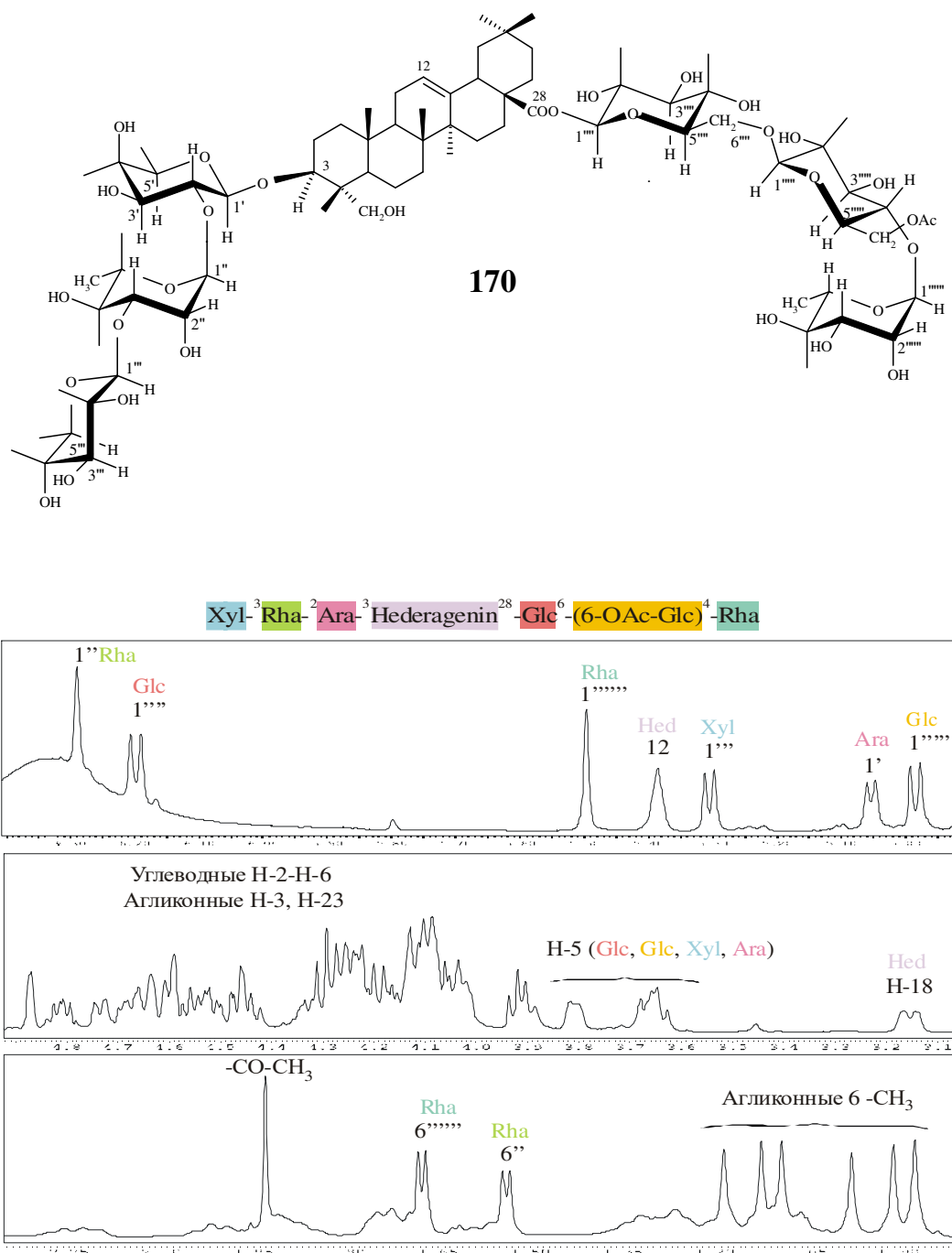


Рис. 1. Фрагменты <sup>1</sup>H-ЯМР спектра гликозида **170**.

Скелетные протоны углеводных фрагментов (кроме вышеотмеченных аномерных протонов и протонов Н-6 остатков рамноз) находятся в довольно узкой области 3,5–4,8 м.д. и в случае двух и более сахаров неизбежно перекрываются даже при использовании приборов на 500 МГц. Аналогичная ситуация наблюдается и для большинства скелетных протонов агликонной части, находящихся в области 0,8–2,3 м.д. Непосредственный анализ этих частей спектров невозможен. Поскольку химические сдвиги и прежде всего КССВ скелетных протонов моносахаридных остатков несут информацию об их природе, то отнесения сигналов в этой области очень важны. На современных приборах с частотами по протонам 300 МГц и выше наиболее эффективным методом отнесения сигналов является использование двумерной гомоядерной корреляционной спектроскопии COSY с двуквантовой фильтрацией [3]. Однако даже на спектрах, полученных на приборах с рабочей частотой 500 МГц, далеко не всегда удастся выполнить полные отнесения сигналов скелетных углеводных протонов в случае четырех-пяти и более моносахаридных остатков, особенно при наличии нескольких стереохимически подобных моносахаридов. Всегда легко относятся лишь сигналы протонов Н-2 по кросс-пикам с дублетными сигналами аномерных протонов. На рис. 2 представлен фрагмент углеводной части спектра COSY гликозида **170**.

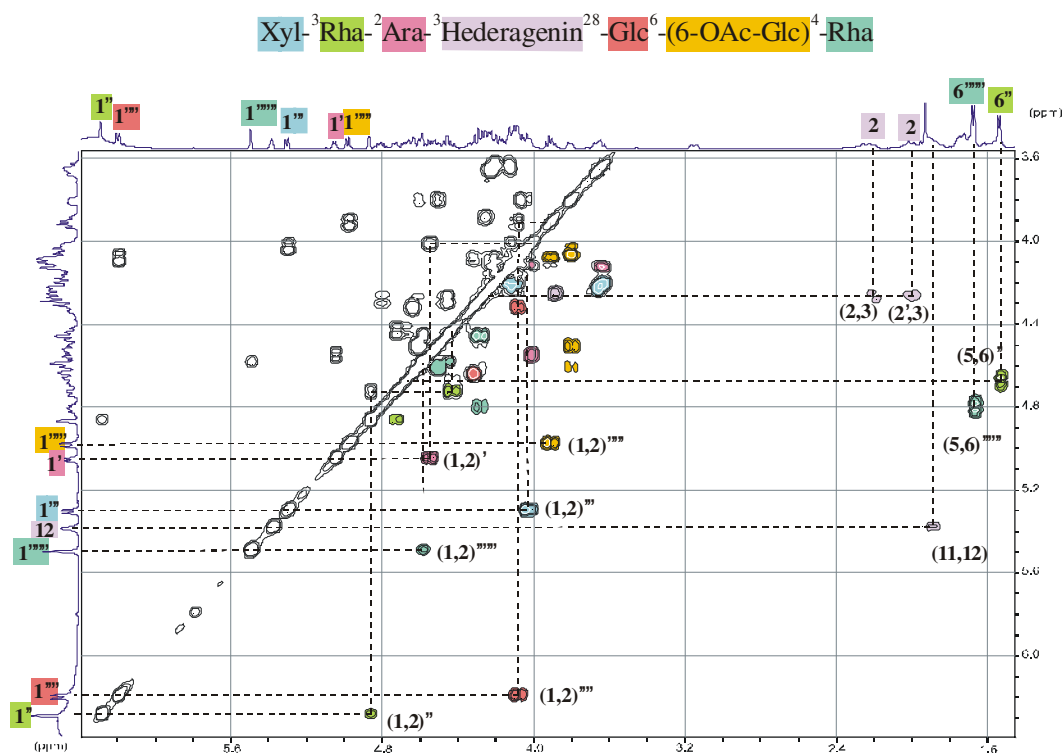


Рис. 2. Фрагмент COSY спектра гликозида **170**.

Частично проблемы отнесения с использованием методики COSY на приборах 250–400 мГц решались с применением COSY в сочетании с одной или двумя ступенями эстафетного переноса поляризации (COSY+1RCT и COSY+2RCT) [4], что позволяло дополнительно уверенно идентифицировать кроме протонов Н-2 и протоны Н-3 и Н-4. Нахождение же сигналов протонов Н-5 обычно не представляло значительных трудностей ввиду их самого высокопольного положения в области резонансов скелетных протонов (кроме остатков рамнозы и глюкуроновой кислоты).

Кардинальным решением в нахождении и отнесении сигналов протонов каждого моносахаридного остатка, представляющих собой изолированные спиновые системы, стало использование в сочетании с COSY двумерной методики по наблюдению полных корреляций TOCSY [5]. На рис. 3 приведен фрагмент спектра TOCSY гликозида **170**.

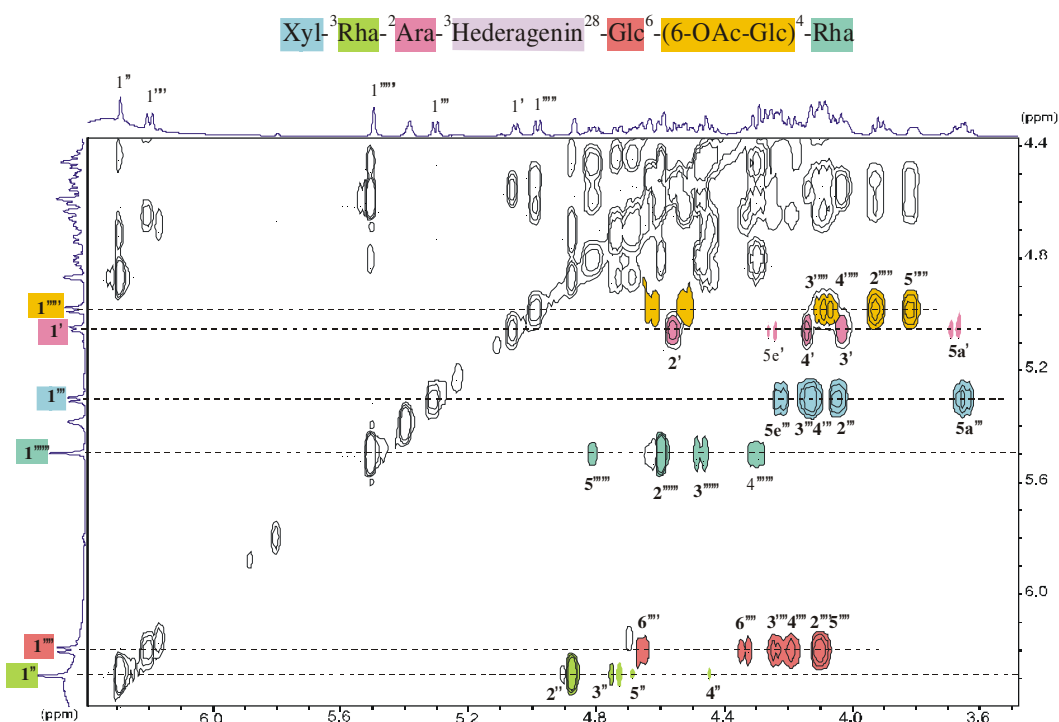


Рис. 3. Фрагмент TOCSY спектра гликозида **170**.

В спектре TOCSY, от аномерных протонов Н-1 (или от Н-6 для остатков рамноз) наблюдаются кросс-пики не только с собственными соседними протонами Н-2 (или Н-5), но и всеми прочими скелетными протонами собственных моносахаридных остатков. Определенные проблемы здесь возникают лишь в тех случаях, когда сигналы аномерных протонов либо перекрываются, либо расположены на расстоянии менее  $1,5-2J_{1,2}$ . Определение характера расщепления и

КССВ скелетных протонов моносахаридных остатков возможно на контурном представлении двумерного спектра TOCSY, однако значительно нагляднее и удобнее выполняется на одномерных сечениях по  $\nu_1$  на частотах аномерных протонов. Найденные на основании вышеперечисленных методов величины КССВ для моносахаридных остатков определяют прежде всего взаимное расположение вицинальных скелетных протонов (*aa*, *ae*, *ee*) на основании хорошо известных зависимостей вицинальных констант  $^3J$  от величин двугранных углов между НСС-плоскостями в жестких циклических системах (уравнения Карплуса) [6], а тем самым определяют ориентацию гидроксильных групп и соответственно стереохимическую конфигурацию асимметрических С-атомов в моносахаридных остатках, то есть их химическую природу, а величины  $^3J$  для аномерных протонов (то есть  $J_{1,2}$ ) определяют  $\alpha$ - или  $\beta$ -конфигурацию гликозидной связи.

В таблице 1 приведены усредненные величины КССВ скелетных протонов для встречавшихся в выделенных гликозидах моносахаридных остатков. Найденные величины КССВ хорошо согласуются с неоднократно описанными в литературе, например в [6].

**Таблица 1**

**Ориентации скелетных протонов моносахаридных остатков и средние наблюдаемые величины вицинальных констант спин-спинового взаимодействия КССВ  $^3J$**

| Угле-<br>водный<br>остаток | Ориентация скелетного протона |            |            |            |             | КССВ $^3J$ |           |           |           |            |
|----------------------------|-------------------------------|------------|------------|------------|-------------|------------|-----------|-----------|-----------|------------|
|                            | H-<br>1                       | H-2        | H-3        | H-4        | H-5         | $J_{1,2}$  | $J_{2,3}$ | $J_{3,4}$ | $J_{4,5}$ | $J_{4,5'}$ |
| $\alpha$ -Ara <sub>f</sub> | <i>p-e</i>                    | <i>p-e</i> | <i>p-e</i> | <i>p-e</i> |             | 0,5        | 3,0       | 3,5       | 10,5      | 0,5        |
| $\alpha$ -Ara              | <i>a</i>                      | <i>a</i>   | <i>a</i>   | <i>e</i>   | <i>a, e</i> | 6,5        | 9,0       | 3,5       | 2,0       | 3,5        |
| $\beta$ -Xyl               | <i>a</i>                      | <i>a</i>   | <i>a</i>   | <i>a</i>   | <i>a, e</i> | 8,0        | 9,0       | 9,0       | 10,0      | 5,5        |
| $\beta$ -Glc               | <i>a</i>                      | <i>a</i>   | <i>a</i>   | <i>a</i>   | <i>a</i>    | 8,0        | 8,5       | 9,0       | 9,0       | 9,5        |
| $\beta$ -Gal               | <i>a</i>                      | <i>a</i>   | <i>a</i>   | <i>e</i>   | <i>a</i>    | 8,0        | 9,5       | 3,5       | 1,5       | 1,0        |
| $\beta$ -GlcUA             | <i>a</i>                      | <i>a</i>   | <i>a</i>   | <i>a</i>   | <i>a</i>    | 8,0        | 9,5       | 9,0       | 9,5       | 9,5        |
| $\alpha$ -Rha              | <i>e</i>                      | <i>e</i>   | <i>a</i>   | <i>a</i>   | <i>a</i>    | 1,5        | 3,5       | 9,5       | 9,5       | 9,5        |

Аналогично отнесению сигналов скелетных протонов моносахаридных остатков в ряде случаев с использованием двумерных методик COSY и TOCSY выполнялись отнесения и для скелетных протонов агликонных частей в области

0,8–2,5 м.д., начиная от однозначно опознаваемых и расположенных в относительно низкочастотной области сигналов Н-3, Н-5, Н-12, Н-16, Н-18 и ряда других, входящих в изолированные спиновые системы. А анализ величин КССВ позволял в случае необходимости устанавливать или подтверждать конфигурацию интересующих С-атомов в циклах агликоновой части гликозидов.

Спектроскопия протонного магнитного резонанса полных ацетатов тритерпеновых гликозидов позволяла, с одной стороны, достичь лучшего разрешения мультиплетов по сравнению со спектрами исходных гликозидов вследствие значительно большего диапазона химических сдвигов сигналов скелетных протонов (от 3,5 до 6,0 м.д.) из-за того, что при ацетилировании свободных гидроксильных групп соответствующие скелетные протоны испытывают значительные низкочастотные сдвиги от 1 до 1,5 м.д. С другой стороны, это позволяло получить ценную и однозначную информацию о типах гликозидных связей, поскольку скелетные протоны у С-атомов, образующих гликозидные связи, не испытывают эффектов ацетилирования, и их сигналы находятся в области 3,5–4,7 м.д. В этой же области находятся еще лишь легко опознаваемые вследствие специфического характера расщепления сигналы скелетных протонов Н-5 сахаров в пиранозной форме. Сигналы же остальных скелетных протонов оказываются в отдельной, более низкочастотной области 4,9–6,0 м.д.

Анализ эффектов ацилирования использовался и при определении положения нативных сложноэфирных (обычно ацетильных) групп в углеводных частях ряда гликозидов. Как правило, для этого изучался двумерный спектр COSY (в сочетании с TOCSY), и необычное низкочастотное положение (по одной из частотных осей) кросс-пика сигнала определенного скелетного протона однозначно свидетельствовало о наличии О-ацильной группы у соответствующего С-атома.

С точки зрения структурных исследований гликозидов ценная информация получалась регистрацией ЯЭО при преднасыщении аномерных протонов. При этом в случае моносахаридных остатков с аксиальным аномерным протоном ( $\beta$ -глюкопираноза,  $\beta$ -галактопираноза,  $\beta$ -глюкуронопираноза,  $\beta$ -ксилопираноза,  $\alpha$ -арабинопираноза) иногда наблюдался небольшой ЯЭО на аксиальном протоне Н-2 (в *s-транс*-положении к Н-1) этого же моносахаридного остатка, однако более значительные ЯЭО наблюдались на аксиальных протонах Н-3 и Н-5, которые пространственно сближены с Н-1. В случае остатка  $\alpha$ -рамнопиранозы с экваториальным аномерным протоном при облучении Н-1 ЯЭО наблюдался лишь на пространственно сближенном экваториальном протоне Н-2. Эта информация была полезна в дополнение к экспериментам COSY и TOCSY для отнесения сигналов скелетных протонов, особенно в тех случаях, когда мультиплетность и величины КССВ практически одинаковы (сигналы Н-2, Н-3 и Н-4 остатков  $\beta$ -глюкопиранозы,  $\beta$ -глюкуронопиранозы, сигналы Н-2 и Н-3  $\beta$ -ксилопиранозы) или же для доказательства  $\alpha$ -конфигурации гликозидной связи остатка рамнозы, поскольку в случае  $\beta$ -конфигурации ЯЭО наблюдались бы и на протонах Н-3 и Н-5, а величина КССВ  $J_{1,2}$  для остатка рамнозы не позволяет судить о конфигурации гликозидной связи (практически одинакова для  $\alpha$ - и  $\beta$ -конфигураций вследствие экваториальной ориентации протона Н-2). Значительно больший структурный

интерес представляло обнаружение ЯЭО на сигналах скелетных протонов агликона или другого моносахаридного остатка, связанного с аномерным центром облучаемого Н-1 гликозидной связью. Так, проявление ЯЭО например на протоне Н-3 агликонной части гликозида свидетельствует о присоединении данного моносахаридного остатка по гидроксильной группе у С-3 агликона. Аналогично проявление ЯЭО при преднасыщении аномерного Н-1 на определенном скелетном протоне другого моносахаридного остатка однозначно указывает на последовательность их соединения и тип гликозидной связи.

Использовавшийся нами иногда двумерный эксперимент по наблюдению ЯЭО – NOESY [7] дает качественно ту же информацию (корреляции за счет диполь-дипольных взаимодействий при пространственной сближенности протонов), что и одномерный вариант с преднасыщением аномерных протонов. Исключение составляет лишь то, что в данном случае мы имеем неравновесный ЯЭО в отличие от равновесного в одномерном варианте и как следствие – различия в относительных величинах ЯЭО или интенсивностях кросс-пиков.

Определенные трудности возникали при наблюдении равновесных ЯЭО на остатке глюкозы, связанной ацилгликозидной связью с агликонами. Данный структурный фрагмент находится внутри молекулы и имеет достаточно большое время корреляции  $\tau_c$ . Это приводит к почти нулевым ЯЭО на приборах с рабочими частотами около 300 МГц. Подобные проблемы решились с появлением двумерной методики по наблюдению ЯЭО "во вращающейся системе координат" ROESY [8], где все ЯЭО всегда отрицательны и нет проблем с нулевыми ЯЭО при сбалансированности процессов релаксации через дву- и ноль-квантовые переходы  $W_2$  и  $W_0$ . На рис. 4 представлен фрагмент спектра ROESY гликозида **170**, а на рис. 5 – схема прослеженных структурно информативных корреляций для углеводных частей этого гликозида.

Одномерным аналогом этой методики "во вращающейся системе координат" является часто использовавшийся в работе эксперимент CAMELSPIN [8] по наблюдению ЯЭО от аномерных протонов. Хотя одномерный вариант CAMELSPIN существенно экономнее во времени при постановке лишь нескольких экспериментов по числу моносахаридных остатков, однако двумерный вариант ROESY обладает значительно большей общностью и позволяет проследить ЯЭО и на агликонной части молекулы гликозида от любых протонов, отнесение которых заранее известно (Н-3, Н-12, Н-18, синглетные сигналы протонов метильных групп) или же предполагается. Поскольку агликонная часть гликозида состоит главным образом из практически таких же как и моносахариды жестких шестичленных колец, то описанные выше стереохимические требования для проявления ЯЭО аналогичны.

Обычно анализ ROESY спектра агликонной части начинали с кросс-пиков от протона Н-3, который в агликонах всех выделенных нами гликозидов аксиален и дает кросс-пики с аксиальными скелетными протонами Н-1 и Н-5 и протонами Н-23 метильной группы у С-4. От протона Н-5 обычно прослеживаются кросс-пики с аксиальными протонами Н-7 и Н-9, причем последний имеет кросс-пик и от аксиального протона Н-1. От Н-9 прослеживаются кросс-пики с протонами



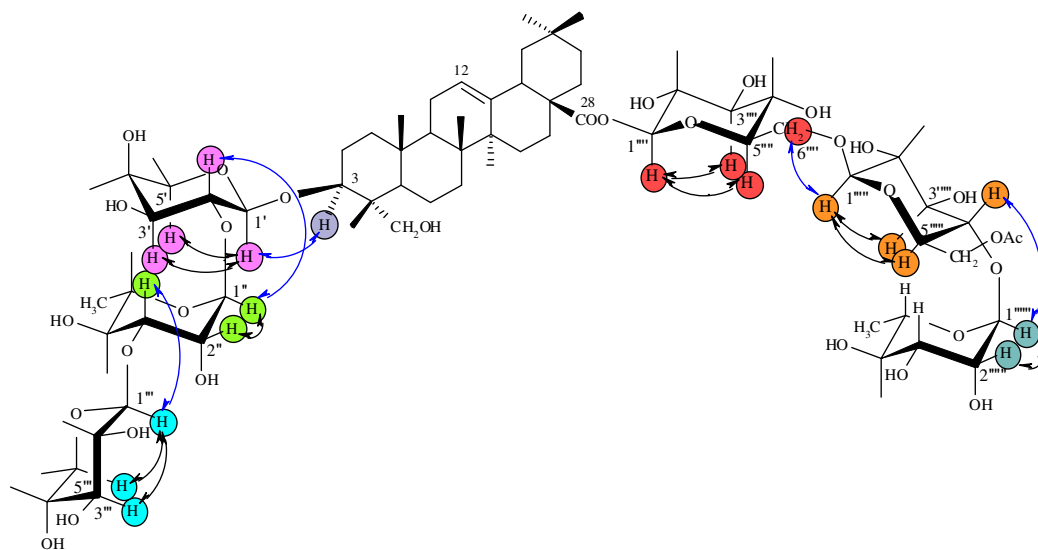


Рис. 5. Схема прослеженных корреляций для углеводных частей в спектре ROESY гликозида **170**.

На рис. 6 и 7 представлены схемы прослеженных корреляций в спектрах ROESY агликонных частей гликозидов 30-норолеаноловой кислоты и гликозида 23,27-дигидроксибетулиновой кислоты

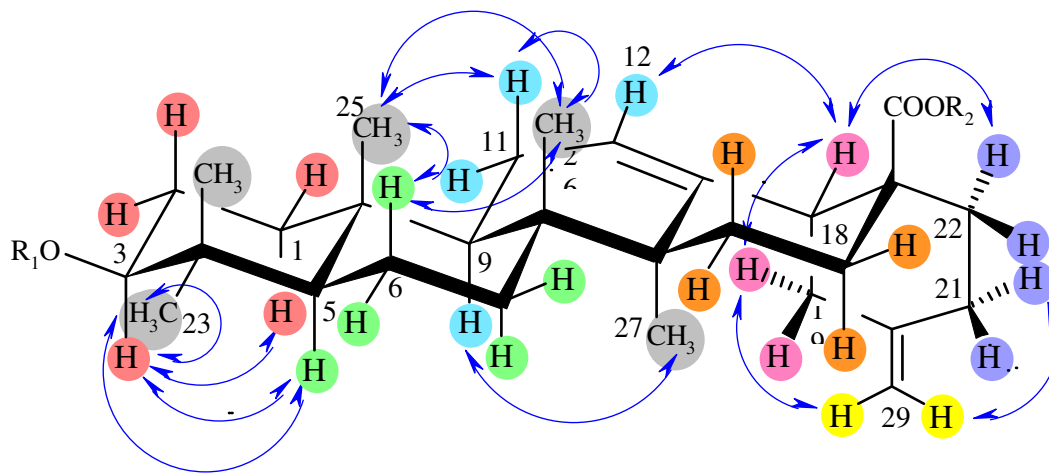


Рис. 6. Пространственная структура и схема прослеженных корреляций в спектре ROESY для агликонной части гликозидов 30-норолеаноловой кислоты.

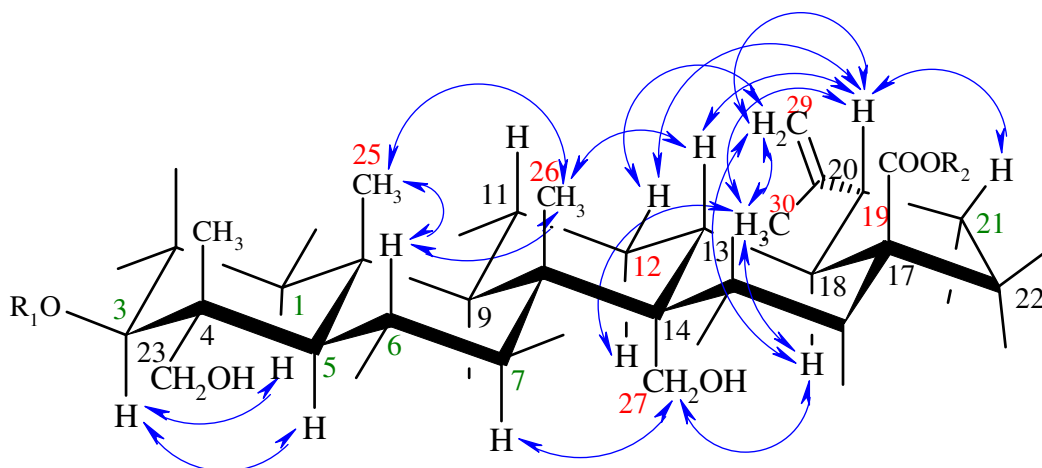


Рис. 7. Пространственная структура и схема прослеженных корреляций в спектре ROESY для агликонной части гликозида 23,27-дигидроксимулиновой кислоты.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Рассмотрено применение современных методов одно- и двумерной спектроскопии  $^1\text{H}$ -ЯМР в установлении строения тритерпеновых гликозидов растений семейства Аралиевые на примере одного из новых, выделенных нами из *Kalopanax septemlobum*, гликозидов – 3-O- $\beta$ -D-ксилопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)-O- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\alpha$ -L-арабинопиранозил-28-O- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-6-O-ацетилглюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 6)-O- $\beta$ -D-глюкопиранозилового эфира хедерагенина.
2. Рассмотрены принципы отнесения сигналов в одно-и двумерных спектрах  $^1\text{H}$ -ЯМР применительно к тритерпеновым гликозидам.
3. Детально рассмотрено использование двумерных методик COSY, COSY+1RCT, COSY+2RCT, TOCSY, а также методики по фиксации одномерного ЯЭО и его двумерные варианты ROESY и CAMELSPIN.

### Список литературы

1. Гришковец В. И. Тритерпеновые гликозиды Araliaceae. III. Химические методы в установлении частичной структуры гликозидов растений семейства Аралиевые / В. И. Гришковец // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2025. – Т. 11 (77), № 4. – С. 273–279.
2. Гришковец В. И. Тритерпеновые гликозиды Araliaceae. IV. Ферментативные методы в установлении частичной структуры гликозидов растений семейства Аралиевые / В. И. Гришковец // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2026. – Т. 12 (78), № 1. – С. 285–291.
3. Improved spectral resolution COSY  $^1\text{H}$  NMR spectra of proteins via double-quantum filtering / M. Rance, O.W. Sorensen, G. Bodenhausen [и др.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1983. – Vol. 17. – P. 479–483.

4. Wagner G. Two-dimensional relayed coherence transfer spectroscopy / G. Wagner // J. Magn. Reson. – 1983. – Vol. 55. – P. 151–154.
5. Multi-step relayed correlation spectroscopy: sequential resonance assignments in oligosaccharides / S. W. Homans, R. A. Dwek, D. L. Fernandes, T. W. Rademacher // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1984. – Vol. 81. – P. 6286–6290.
6. Стоддарт Дж. Стереохимия углеводов / Дж. Стоддарт – М.: Мир, 1975. – С. 177–187.
7. Kumar A. A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the evolution of complete proton-proton cross relaxation networks in biological molecules / A. Kumar, R. R. Ernst, K. Wuthrich // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1980. – Vol. 95. – P. 1–12.
8. Structure determination of tetrasaccharide by transient nuclear Overhauser effects in the rotating frame / A. A. Bothner-By, R. L. Stephens, J. T. Lee [и др.] // J. Amer. Chem. Soc. – 1984. – Vol. 106, № 3. – P. 811–815.

# TRITERPENE GLYCOSIDES OF ARALIACEAE. V. NMR SPECTROSCOPIC METHODS IN THE STRUCTURAL ELUCIDATION OF ARALIACEAE TRITERPENE GLYCOSIDES: ONE- AND TWO-DIMENSIONAL <sup>1</sup>H-NMR SPECTROSCOPY

*Grishkovets V. I.*

*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russian Federation  
E-mail: vladgri56@yandex.ru*

The application of modern one- and two-dimensional <sup>1</sup>H NMR spectroscopic methods to the structural elucidation of triterpene glycosides from plants of the *Araliaceae* family has been examined, using as an example a newly isolated glycoside from *Kalopanax septemlobum*: 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→3)-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-O-α-L-arabinopyranosyl-28-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-O-β-D-6-O-acetylglucopyranosyl-(1→6)-O-β-D-glucopyranosyl ester of hederagenin. The principles of resonance assignment in one- and two-dimensional <sup>1</sup>H NMR spectra of triterpene glycosides are discussed. Particular attention is given to the use of two-dimensional techniques – COSY, COSY+1RCT, COSY+2RCT, and TOCSY – as well as to the application of one-dimensional NOE measurements and their two-dimensional variants, including NOESY, ROESY, and CAMELSPIN.

Preliminary NMR spectral analysis was performed on the basis of the aforementioned chemical methods. The one-dimensional <sup>1</sup>H NMR spectra primarily enabled an accurate determination of the number of monosaccharide residues by counting the doublet signals of anomeric protons in the relatively downfield region (4.6–6.3 ppm). Furthermore, the magnitude of the *J*<sub>1,2</sub> coupling constant together with the chemical shift values, interpreted in the context of published data, in some cases allowed an unambiguous assignment to a specific monosaccharide residue.

For the assignment of resonances in the <sup>1</sup>H NMR spectra of glycosides, the most effective approach was two-dimensional homonuclear correlation spectroscopy (COSY) with double-quantum filtering. In practice, assignment difficulties encountered with

COSY on 250–400 MHz spectrometers were resolved by employing COSY in combination with one or two steps of relayed polarization transfer (COSY+1RCT and COSY+2RCT). A decisive advance in identifying and assigning the proton resonances of each monosaccharide residue, which represent isolated spin systems, was achieved through the application of total correlation spectroscopy (TOCSY) in combination with COSY.

From the perspective of structural elucidation of glycosides, valuable information on spatially proximate protons was obtained through NOE (nuclear Overhauser effect) experiments. Both one-dimensional NOE measurements – applied from anomeric protons to establish the type of glycosidic linkages – and two-dimensional variants (NOESY, ROESY, and CAMELSPIN) were utilized. The two-dimensional NOE techniques proved particularly effective for the structural characterization of novel aglycone moieties in Araliaceae glycosides.

**Keywords:** *Araliaceae*, triterpene glycosides, one- and two-dimensional  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy, COSY, COSY+1RCT, COSY+2RCT, TOCSY, NOE, ROESY, CAMELSPIN methods.

### References

1. Grishkovets V. I. Triterpene glycosides of Araliaceae. III. Chemical methods in establishing the partial structure of glycosides from plants of the Araliaceae family, *Scientific notes of the Crimean Federal University named after V. I. Vernadsky. Biology. Chemistry*, **11** (4), 273 (2025). (in Russ.).
2. Grishkovets V. I. Triterpene glycosides of Araliaceae. IV. Enzymatic methods in determining the partial structure of Araliaceae family plants glycosides, *Scientific notes of the Crimean Federal University named after V. I. Vernadsky. Biology. Chemistry*, **12** (1), 285 (2026). (in Russ.).
3. Rance M., Sorensen O. W., Bodenhausen G., Wagner G., Ernst R. R., Wuthrich K., Improved spectral resolution COSY  $^1\text{H}$  NMR spectra of proteins via double-quantum filtering, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **17**, 479 (1983).
4. Wagner G., Two-dimensional relayed coherence transfer spectroscopy, *J. Magn. Reson.*, **55**, 151 (1983).
5. Homans S. W., Dwek R. A., Fernandes D. L., Rademacher T. W., Multi-step relayed correlation spectroscopy: sequential resonance assignments in oligosaccharides, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 6286 (1984).
6. Stoddart J., *Stereochemistry of carbohydrates*, 304 p. (Mir, Moscow, 1975). (in Russ.).
7. Kumar A., Ernst R. R., Wuthrich K., A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the evolution of complete proton-proton cross relaxation networks in biological molecules, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 1 (1980).
8. Bothner-By A. A., Stephens R. L., Lee J. T., Warren C. D., Jeanloz R. W., Structure determination of tetrasaccharide by transient nuclear Overhauser effects in the rotating frame, *J. Amer. Chem. Soc.* **106** (3), 811 (1984).