

Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского
Биология. Химия. Том 12 (78). 2026. № 2. С. 341–356.

УДК 547.918:543.422:582.5/.9

DOI 10.5281/ZENODO.20795953

ТРИТЕРПЕНОВЫЕ ГЛИКОЗИДЫ ARALIACEAE.

VI. МЕТОДЫ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ В УСТАНОВЛЕНИИ СТРУКТУРЫ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ АРАЛИЕВЫХ: ОДНО- И ДВУМЕРНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ ^{13}C -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 ^{13}C -ЯМР в установлении строения тритерпеновых гликозидов растений семейства Аралиевые (*Araliaceae* Juss.) а примере одного из новых, выделенных нами из *Kalopanax septemlobum*, гликозидов – 3-О-β-D-ксилопиранозил-(1→3)-О-α-L-рамнопиранозил-(1→2)-О-α-L-арабинопиранозил-28-О-α-L-рамнопиранозил-(1→4)-О-β-D-6-О-ацетилглюкопиранозил-(1→6)-О-β-D-глюкопиранозилового эфира хедерагенина. Рассмотрены принципы отнесения сигналов в одно-и двумерных спектрах ^{13}C -ЯМР применительно к тритерпеновым гликозидам. Детально рассмотрено использование двумерных методик HSQC и HMBC.

Ключевые слова: Araliaceae, тритерпеновые гликозиды, одно- и двумерная спектроскопия ^{13}C -ЯМР, методики ^{13}C -ЯМР-АПТ, HSQC, HMBC.

ВВЕДЕНИЕ

В предыдущей статье [1] рассматривалось применение одно- и двумерных вариантов спектроскопии ^1H -ЯМР в структурных исследования тритерпеновых гликозидов Аралиевых (*Araliaceae* Juss.). В настоящей статье рассматриваются возможности использования одно- и двумерных вариантов спектроскопии ^{13}C -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 ^{13}C -ЯМР, ^{13}C -ЯМР-АПТ, 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

Спектры ^{13}C -ЯМР с полным подавлением спин-спинового взаимодействия с протонами наиболее информативны для установления структур гликозидов. Это объясняется рядом хорошо известных причин – очень высокой воспроизводимостью значений химических сдвигов сигналов C-атомов ($\pm 0,1\text{--}0,2$ м.д.), слабой зависимостью химических сдвигов от внешних факторов (температура, концентрация, наличие примесей), узкой шириной линий и широким спектральным диапазоном, практически исключающим их перекрывание. Все это делает спектроскопию ^{13}C -ЯМР прежде всего очень ценной в идентификации известных соединений по величинам химических сдвигов сигналов. При этом степень надежности идентификации является исключительно высокой. Такой способ идентификации постоянно использовался нами при выделении гликозидов с уже установленными нами или другими авторами структурами после получения первичной информации путем идентификации гликозидов по хроматографической подвижности и идентификации продуктов полного кислотного и щелочного гидролизом. В ряде случаев такой подход позволял выявить изомерные соединения, например гликозиды урсоловой кислоты в смеси с гликозидами олеаноловой кислоты, которые хроматографически неразделимы, 23-О-гликозилированные производные хедерагенина вместо обычно встречающихся 3-О-гликозидов, гликозиды с различными положениями нативных ацетатных групп, изомерные гликозиды с остатком галактозы вместо остатка глюкозы и так далее. На рис. 1 приведены фрагменты обзорного спектра ^{13}C -ЯМР гликозида **170**.

Анализ обзорного спектра ^{13}C -ЯМР прежде всего позволял выявлять наличие сигналов карбонильных C-атомов в области выше 160 м.д. – а именно сигналов атомов углерода альдегидной группы в гликозидах гипсогенина (~210 м.д.), свободной карбоксильной группы агликона (~180 м.д.), гликозилированной карбоксильной группы агликона (~176 м.д.), карбоксильных остатков глюкуроновой кислоты (~170–174 м.д.), карбонильных C-атомов ацетильных групп (~171 м.д.). Анализ области 107–150 м.д. позволял выявить сигналы олефиновых и ароматических C-атомов и сделать предварительные заключения об их принадлежности. Так, наиболее часто встречающийся тип двойной связи у C-12 ($\Delta^{12,13}$) в тритерпеноидах β -амиринового ряда характеризуется значениями химических сдвигов ~123 и ~145 м.д. для атомов C-12 и C-13, соответственно. Тритерпеноиды α -амиринового ряда с таким же типом двойной связи – значениями соответственно ~126 и 139 м.д. Тритерпеноиды лупанового ряда с 20(29)-двойной связью характеризуются химическими сдвигами в ~151 и ~110 м.д. для атомов C-20

и С-29, соответственно. 30-Нортритерпеноиды имеют дополнительную 20(29)-двойную связь с химическими сдвигами С-атомов в ~148 и ~108 м.д.

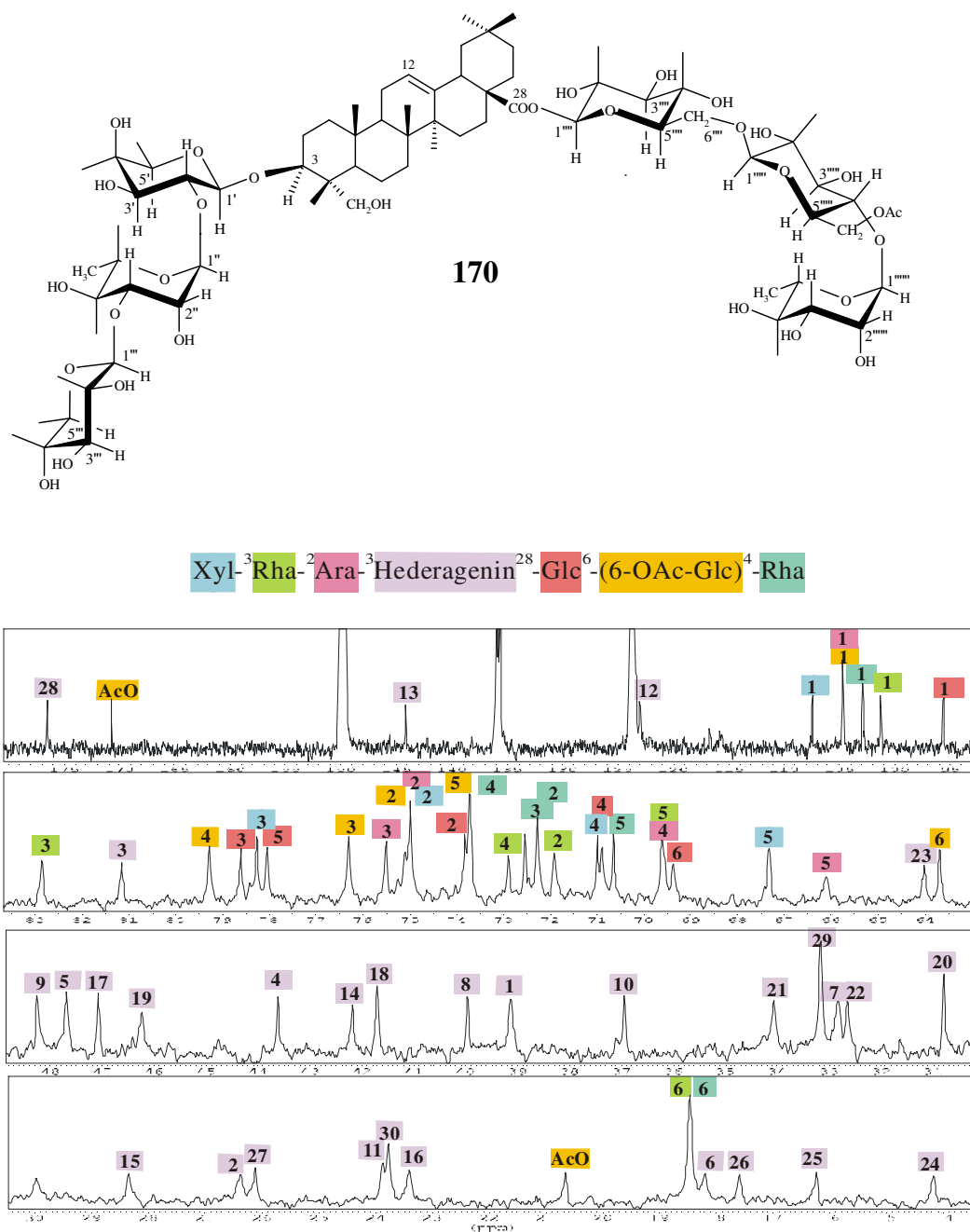


Рис. 1. Фрагменты обзорного спектра ¹³С-ЯМР гликозида **170**.

Следующая высокоинформативная область углеродного спектра 95–109 м.д., в которой в тритерпеновых гликозидах располагаются исключительно сигналы аномерных С-атомов углеводных остатков, так что простой анализ сигналов в этой области однозначно указывает на количество моносахаридных остатков в молекуле гликозида. Анализ величин химических сдвигов сигналов в этой области позволяет сделать предварительные заключения и о природе моносахаридных остатков. Так в самой низкочастотной части этой области (108–109 м.д.) располагается сигнал С-1 арабинофуранозы, в области 106–108 м.д. – сигнал С-1 ксилопиранозы, в области 104–107 м.д. – сигналы С-1 остатков глюкуронопиранозы, галактопиранозы, арабинопиранозы и глюкопиранозы, в области 101–103 м.д. – С-1 рамнопиранозы и в области 95–97 м.д. – С-1 глюкопиранозы, связанной ацилгликозидной связью с агликоном. Однако ситуация несколько усложняется в случае 2-О-ацетилированных или 2-О-гликозилированных сахаров, так как при этом сигнал С-1 испытывает высокочастотный сдвиг (β -эффект замещения) на 1,5–2 м.д.

В области 61–88 м.д. располагаются сигналы прочих скелетных протонов моносахаридных остатков. Однако в самой низкочастотной части этой области (87–88 м.д.) может находиться лишь сигнал атома С-4 арабинофуранозы, в области 78,5–85 м.д. – сигналы С-2 и С-3 арабинофуранозы и лишь сигналы гликозилированных С-атомов сахаров в пиранозной форме, в области 61–79 м.д. – сигналы как незамещенных, так и замещенных (гликозилированных, ацилированных) атомов С-2–С-5 сахаров, а в области 61–70 м.д. – сигналы атомов С-6 гексопираноз, С-5 пентопираноз, арабинофуранозы и рамнопиранозы и С-4 арабинопиранозы и галактопиранозы. К сожалению, в область 61–88 м.д. попадают и сигналы агликонных С-атомов, у которых имеется гидроксильная группа, что иногда существенно усложняет анализ этой части спектра. В оставшейся высокочастотной области спектра 12–57 м.д. располагаются сигналы остальных С-атомов агликонных частей гликозидов и сигналы С-6 остатков рамноз (~18–19 м.д.).

Следует отметить, что полные отнесения сигналов в спектрах ^{13}C -ЯМР без привлечения специальных методик, обсуждаемых ниже, удавалось выполнить лишь в случае идентификации известных гликозидов по литературным данным для химических сдвигов, или же при отсутствии полных данных – путем идентификации по химическим сдвигам С-атомов отдельных независимых фрагментов гликозида (углеводных цепей и соответственно замещенной агликонной части). Установление строения новых соединений путем лишь идентификации всех отдельных фрагментов по химическим сдвигам их атомов обычно выполнялось лишь в простых случаях (не более трех–четырех углеводных остатков), а, как правило, подтверждалось с использованием обсуждаемых ниже методик двумерной спектроскопии.

Отнесения сигналов путем идентификации фрагментов гликозида (особенно агликонной части) в обычном спектре ^{13}C -ЯМР существенно облегчались при дополнительном использовании одномерных спектров ^{13}C с "редактированием". Обычно использовалась стандартная методика АРТ-редактирования [2], то есть эксперимент по J -модулированному спиновому эху с переключаемым декаплером и задержкой $\tau = 1/J$, где J – среднее значение величины прямой КССВ $^1J_{\text{CH}} \sim 150$ Гц), в

которой фазы сигналов С-атомов с нечетным числом протонов (CH и CH₃) одинаковы, но противоположны фазам сигналов С-атомов с четным числом протонов (четвертичные С и CH₂), то есть имеют положительные и отрицательные амплитуды. На рис. 2 приведены фрагменты ¹³С-ЯМР спектра гликозида **170** с АРТ-редактированием. В большинстве случаев такого упрощенного редактирования было достаточно, поскольку сигналы метильных групп обычно расположены в высокочастотной области ниже 34 м.д. В более сложных случаях и при установлении строения новых соединений для получения подспектра только четвертичных С-атомов использовали аналогичную методику по *J*-модулированному спиновому эху с переключаемым декаплером и значением $\tau = 1/2J$, при котором амплитуды сигналов всех протонированных С-атомов оказываются близкими к нулевым [3].

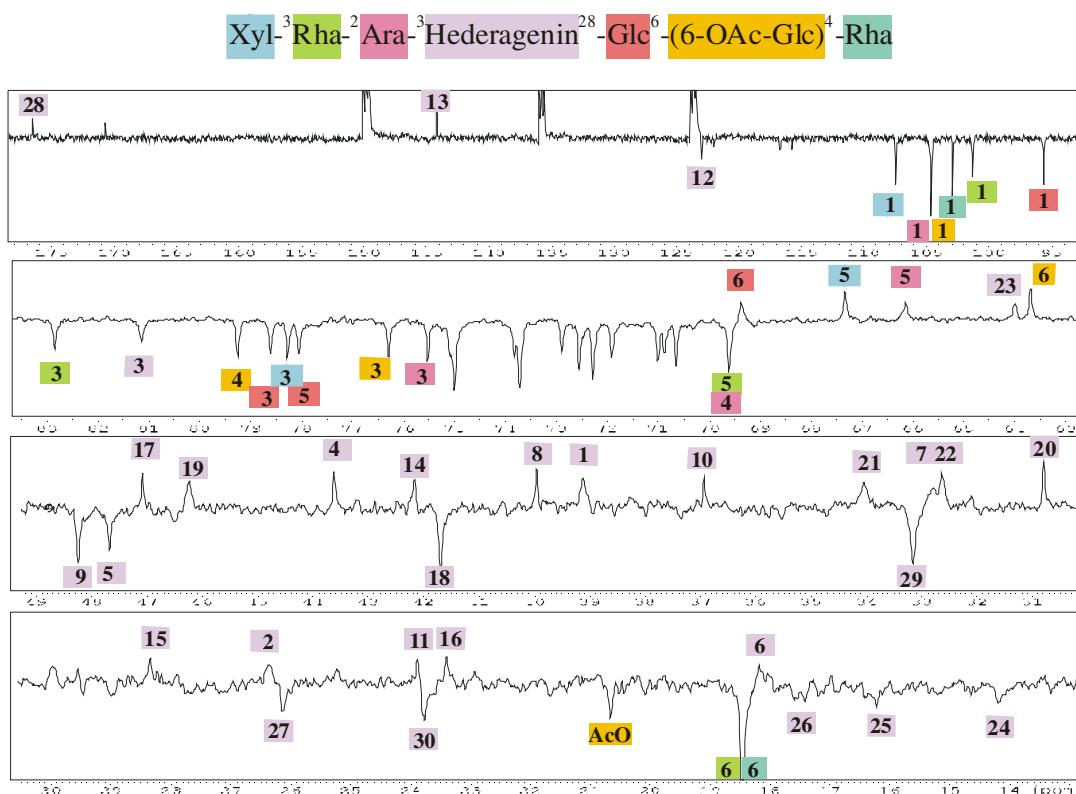


Рис. 2. Фрагменты спектра ¹³С-ЯМР гликозида **170** с АРТ-редактированием.

В ряде случаев для определения величин прямых КССВ ¹*J*_{CH} получали спектры ¹³С-ЯМР без подавления спин-спинового взаимодействия с протонами. Например, для наиболее часто встречающегося дисахаридного фрагмента Rha_p-(1→2)-Ara_p- для дублетных сигналов аномерных С-атомов при 101,7 и 104,3 м.д. определены прямые КССВ ¹*J*_{CH}, составляющие 160 и 171 Гц для С-1 рамнозы и С-1 арабинозы,

соответственно. Такие значения КССВ однозначно определяют аксиальное положение атома кислорода у С-1 рамнозы и экваториальное – у С-1 арабинозы [4] и, следовательно, α -конфигурацию гликозидной связи остатка рамнозы (конформация 1C_4 для L-ряда) и α -конфигурацию гликозидной связи остатка арабинозы (конформация 4C_1 для L-ряда) [4]. Такие типы конформаций моносахаридных остатков подтверждаются и величинами КССВ в спектре ПМР. Другим примером использования "неразвязанных" углеродных спектров является наблюдение сигналов С-атома метиленовой группы концевой двойной связи. Необходимость строгого доказательства ее присутствия в гликозидах 30-нортритерпеноидов и гликозидах лупанового ряда вытекала из того, что сигнал олефинового ($=CH_2$) С-атома находится как раз в низкочастотной границе области сигналов аномерных С-атомов (107–110 м.д.). В спектре ЯМР ^{13}C таких соединений без спиновой развязки от протонов интересующему С-атому соответствует триплет с КССВ J_{CH} 152 Гц, соответствующей sp^2 -гибридному атому углерода, который с учетом величины химического сдвига однозначно является олефиновым С-атомом в группе $=CH_2$.

Как указывалось выше, для отнесения сигналов в одномерном углеродном спектре обязательно необходима какая-либо априорная информация о структуре фрагментов и данные по химическим сдвигам сигналов С-атомов в аналогичных фрагментах иных соединений, полученные тем или иным способом. Однако во многих случаях такие данные или отсутствуют или не являются надежными, поскольку отнесения обычно выполнены косвенными методами (расчетами, сопоставлением данных по различным производным, анализом ^{13}C -ЯМР-спектров с частичной релаксацией и тому подобное). На первых этапах нашей работы до появления двумерных корреляционных методик однозначные отнесения сигналов в ^{13}C -ЯМР-спектрах выполнялись с использованием методики селективного гетероядерного двойного резонанса $^{13}C_i\{-^1H_i\}$ путем последовательных экспериментов с облучением протонов, сигналы которых относились гомоядерным двойным резонансом $^1H_i\{-^1H_j\}$, как было описано выше. Однако такой подход крайне трудоемок и применялся только к не очень сложным углеводным цепям.

Использование двумерной гетероядерной корреляционной спектроскопии HETCOSY [5] практически полностью решило проблему однозначного отнесения сигналов в углеродном спектре (по крайней мере для углеводных частей) по кросс-пикам сигналов непосредственно связанных С- и Н-атомов, поскольку обычно имеются однозначные отнесения сигналов протонов в ПМР-спектре, выполненные с помощью корреляционных методик COSY, TOCSY и ROESY [1]. Существенным недостатком спектроскопии HETCOSY, ограничивающим ее применение, является очень низкая чувствительность, поскольку в реальном времени наблюдаются сигналы углеродных атомов, что всегда требует большого количества вещества и приборного времени.

В значительной степени вышеуказанные проблемы решились с появлением обращенной корреляционной методики HSQC (гетероядерная корреляция через одну связь) [6] в которой в периоды регистрации наблюдаются протоны, что значительно повысило чувствительность этого эксперимента в сравнении с HETCOSY. Большинство отнесений сигналов С-атомов в углеводных и агликонных

частях выделенных гликозидов были выполнены с использованием именно этой корреляционной методики. На рис. 3–5 приведены фрагменты HSQC-спектров гликозида **170**.

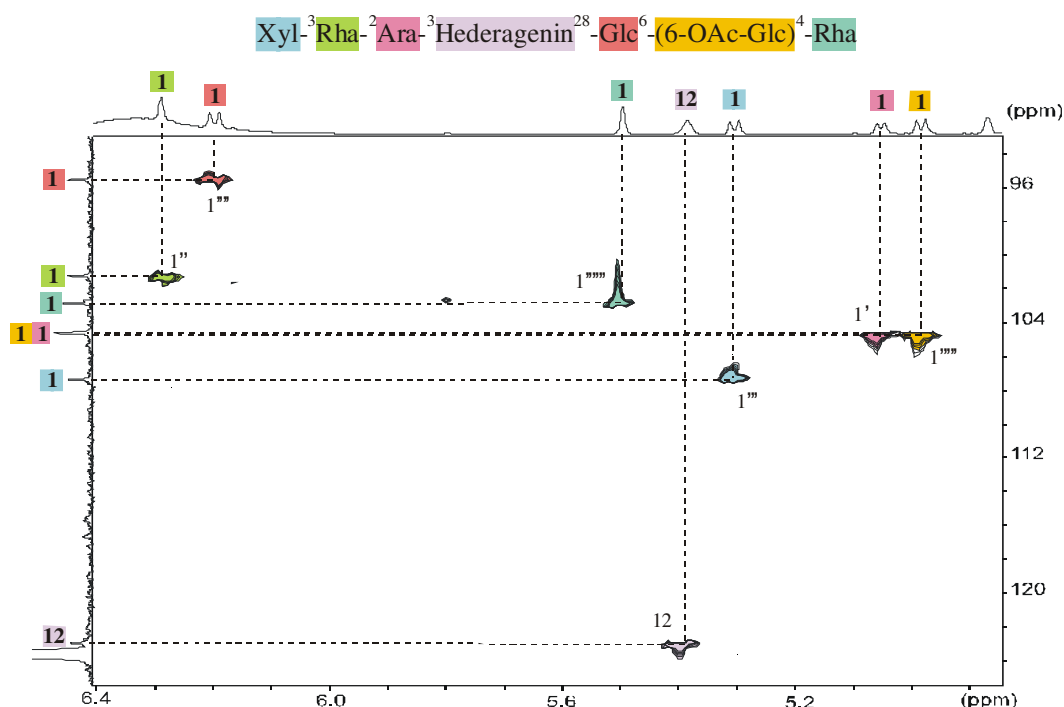


Рис. 3. Фрагмент спектра HSQC (область аномерных C-H корреляций) гликозида **170**.

Однозначное выполнение отнесений сигналов C-атомов с помощью методики HSQC было затруднено в тех случаях, когда протонные химические сдвиги разных атомов имеют одинаковые или очень близкие значения. В этих случаях приходилось использовать дополнительную информацию и приблизительно оценивать возможные химические сдвиги сигналов определяемых углеродных атомов. Наиболее ценными для отнесений сигналов C-атомов углеводных фрагментов изначально являлись высоконадежные данные по химическим сдвигам C-атомов в незамещенных метилгликозидах сахаров [7] и обобщенные данные по эффектам гликозилирования в углеводных и агликонных частях [8, 9] или же в гликозилирующих и гликозилируемых частях [10].

Возможности полного и однозначного отнесения углеродных сигналов углеводных частей гликозида с помощью методики HSQC позволяют и однозначно решить целый ряд структурных задач. Прежде всего по легко отмечаемым значительным α -эффектам гликозилирования (до +10–11 м.д. на C-атомах гликозилируемых спиртовых групп и до –4 м.д. на карбонильном C-атоме

гликозилируемой карбоксильной группы) на С-атомах агликонной части гликозида в сравнении с литературными или собственными данными для свободных (негликозилированных) агликонов однозначно определяются места присоединения углеводных фрагментов. Обычно это гидроксильная группа у атома С-3 или значительно реже у С-23 или С-28 в монодесмозидных гликозидах и гидроксильные группы у С-3 и С-28 или значительно реже у С-23 и С-28 в бисдесмозидных гликозидах. Несмотря на наличие в ряде случаев иных гидроксильных групп в агликонной части гликозида (у С-16, С-27), присоединения углеводных частей по ним обнаружено не было.

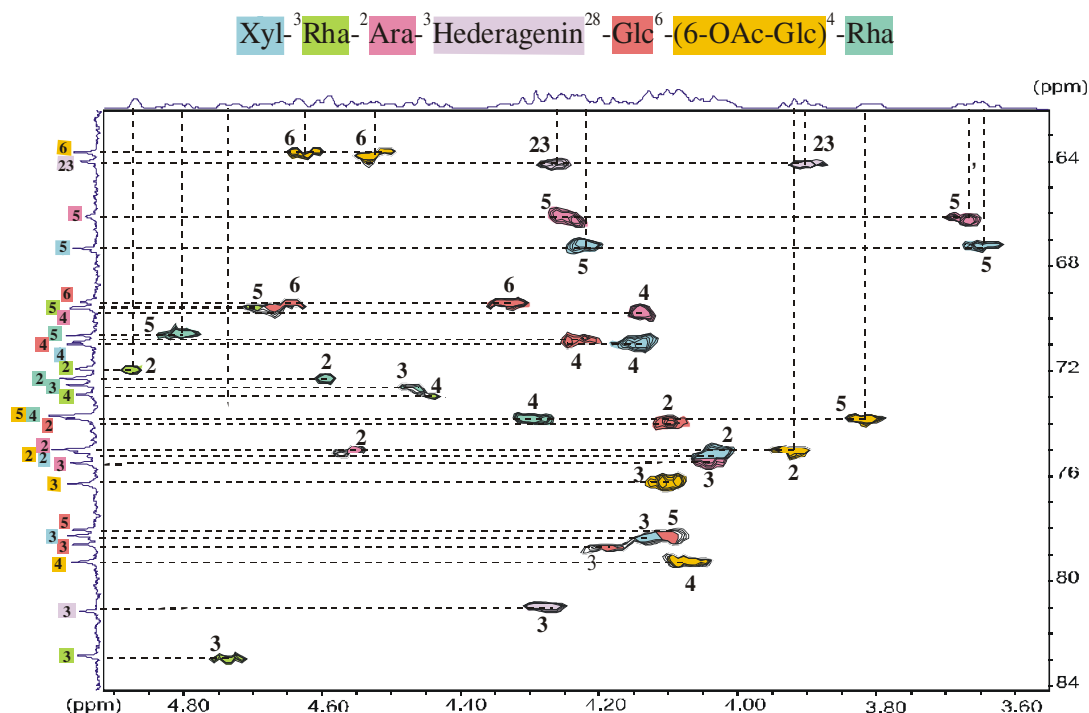


Рис. 4. Фрагмент спектра HSQC (область углеводных С-Н корреляций) гликозида **170**.

В случае присоединения углеводного фрагмента по гидроксильной группе у асимметрического С-3(*S*) атома агликона анализ величин β -эффектов гликозилирования (на атомах С-2 и С-4 агликона) позволяет однозначно определить абсолютную (*R/S*) конфигурацию аномерного С-атома непосредственно связанного углеводного остатка. Так, авторы серии работ, в которых исследовались α - и β -эффекты гликозилирования различными D- и L-сахарами первичных, вторичных и циклических вторичных спиртов (циклогексанол, D- и L-ментолы) [11–13], а также эффекты гликозилирования в синтетических 3-O- α -D- и α -L-арабинопиранозидах олеаноловой кислоты [14] установили, что при *R*-конфигурации аномерного С-атома

и *S*-конфигурации гликозилируемого атома положительный α -эффект составляет около 10 м.д., а отрицательные β -эффекты как на С-2, так и на С-4 находятся в пределах 1–2,9 м.д., а при *S*-конфигурации аномерного С-атома и *S*-конфигурации гликозилируемого атома (или *R*- и *R*-конфигурациях соответственно) положительный α -эффект составляет около 4–6 м.д., а отрицательные β -эффекты на С-2 значительно больше, чем в первом случае, и составляют 5–7 м.д., а на С-4 – около 2 м.д. При этом закономерно отличаются и химические сдвиги аномерных С-атомов гликозилирующих остатков. Во всех выделенных нами гликозидах наблюдаемые эффекты гликозирования на атомах С-2–С-4 агликонных частей и химические сдвиги аномерных С-атомов соответствуют *R*-конфигурации аномерных центров. С учетом α - или β -конфигураций гликозидных связей, определяемых на основе КССВ $J_{1,2}$ или данных спектра ROESY (обсуждается выше), *R*-конфигурация аномерного центра соответствует остаткам β -D-ксило-, β -D-глюко-, β -D-глюкуронопираноз и α -L-арабинопиранозы.

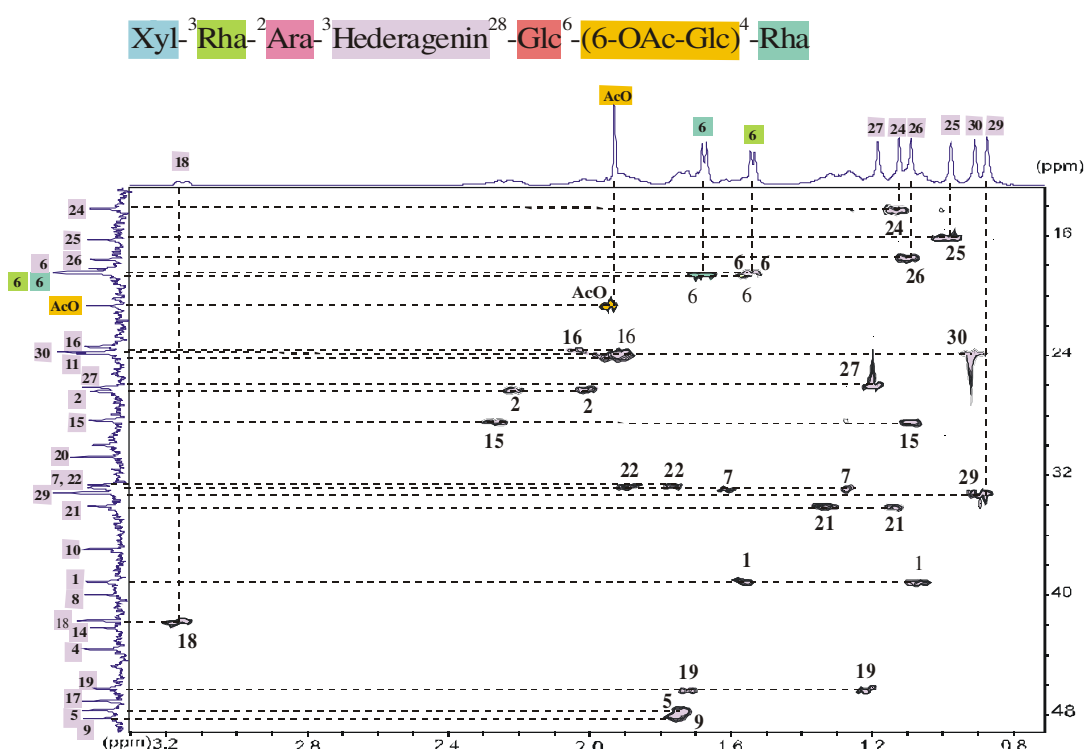


Рис. 5. Фрагмент спектра HSQC (область агликонных С-Н корреляций) гликозида **170**.

Анализ установленных с помощью HSQC химических сдвигов сигналов углеводных С-атомов проводился путем сравнения с химическими сдвигами незамещенных гликозидов сахаров для выявления эффектов гликозирования.

Эффекты гликозилирования при образовании дисахаридов к настоящему времени всесторонне и тщательно изучены и теоретически объяснены на основе конформационного анализа и учета как индуктивных эффектов (определяющих главным образом α -эффекты), так и эффектов пространственного протон-протонного взаимодействия аномерного Н-атома гликозилирующего остатка и экваториальных $C_{\beta,\beta}$ -Н атомов гликозилируемого остатка (определяющих β -эффекты) с учетом соотношения абсолютных стереохимических конфигураций гликозилирующего и гликозилируемого атомов и ряда других факторов. Так, α -эффекты гликозилирования (на гликозилируемых С-атомах) положительны и обычно составляют от 5 до 11 м.д., напротив, β -эффекты на соседних С-атомах отрицательны и обычно не превышают 3 м.д. Эти закономерности при анализе найденных химических сдвигов сигналов С-атомов углеводных частей позволяли однозначно определять типы гликозидных связей (по обнаруживаемым α - и β -эффектам в сравнении с незамещенными гликозидами) или же определять концевые моносахаридные остатки, на которых эффекты гликозилирования отсутствуют.

Данный способ определения типов гликозидных связей является прямым и наиболее надежным. Однако следует отметить, что в случае линейных трисахаридных и более длинных углеводных фрагментов или в случае разветвленных трисахаридных фрагментов анализ эффектов гликозилирования естественно не может дать информации о том, какой именно углеводный фрагмент гликозилирует в определенное положение, поскольку эффекты гликозилирования от различных углеводных фрагментов обычно одинаковы. Однако такая информация обычно легко получается при анализе двумерных спектров ROESY [1] или двумерных спектров НМБС (обсуждается ниже) или же с использованием данных химических и биохимических методов (частичного гидролиза) расщепления. Как и в случае гликозилирования агликона, анализ абсолютных величин α - и β -эффектов на последующих моносахаридных остатках позволяет в большинстве случаев подтвердить и их абсолютные конфигурации (принадлежности к D- или L-рядам) как это предложено и экспериментально подтверждено в вышеупомянутой работе [10].

Кроме установления типов гликозидных связей анализ наблюдаемых величин химических сдвигов и эффектов замещения позволяет установить и места присоединения ацильных групп в углеводных частях гликозидов. Наблюдаемые при этом α -эффекты ацилирования в любые положения положительны и обычно составляют от 1,5 до 3,5 м.д., что заметно меньше α -эффектов гликозилирования, тогда как β -эффекты, как и в случае гликозилирования всегда отрицательны и составляют от -2,2 до -3,5 м.д., что обычно даже несколько больше, чем в случае гликозилирования.

Следует также отметить, что кроме очень больших возможностей методики HSQC в отнесении химических сдвигов сигналов С-атомов эти двумерные спектры следует признать и в качестве наиболее надежного способа идентификации сложных природных соединений, поскольку в них представлены одновременно как углеродные, так и протонные химические сдвиги всех CH_n группировок.

Несмотря на значительные возможности методики HSQC в отнесении сигналов С-атомов углеводных частей гликозидов, при отнесении сигналов С-атомов

агликонных частей часто возникают определенные трудности. Обычно не возникает проблем лишь в тех случаях, когда химические сдвиги сигналов С-атомов приблизительно известны и требуется лишь их дополнительное подтверждение (или однозначные отнесения близкорасположенных сигналов). Кроме того, обычно не возникает проблем при отнесении сигналов в низкопольной области спектра или же в тех случаях, когда сигналы соответствующих протонов надежно установлены с помощью методик COSY, TOCSY и ROESY. Однако даже сочетание трех вышеперечисленных методик далеко не всегда дает положительные результаты для высокопольной области спектра (ниже 57 м.д.), где находится большинство сигналов агликонных С-атомов. В таких случаях, в частности при установлении структуры новых агликонов, особенно эффективной оказалась двумерная гетероядерная корреляционная методика HMBC [15], основанная на наблюдении корреляций протонов с углеродами через несколько химических связей. В данной методике наиболее эффективно проявляются корреляции через 3 связи (особенно в случае *s-транс*-расположения Н- и С-атомов), но в ряде случаев наблюдаются корреляции через две или четыре связи.

Обычно анализ спектра HMBC агликонной части начинают с однозначно идентифицируемого в относительно низкопольной области сигнала протона Н-3, у которого наблюдаются кросс-пики с атомами и группами кольца А: С-1, С-5, С-23 и С-24. Иногда наблюдается и кросс-пик через 2 связи с атомом С-4. Аналогично от С-3 прослеживаются корреляции с протонами у вышеперечисленных С-атомов. Далее от Н-5 или Н-1 прослеживаются кросс-пики с С-25, С-9 и с С-7 от Н-5, то есть атомами и группами кольца В. Аналогично проводятся отнесения для кросс-пиков между С- и Н-атомами других колец. Для проверки найденных решений делают "обратные" ходы и находят корреляции от протонов (или атомов углерода) метильных групп С-23-С-27, С-29 и С-30 или от низкопольных сигналов атомов С(Н)-12, С(Н)-13, С-28 и от С(Н)-атомов агликона с оксигруппами или от других групп, сигналы которых расположены в низкопольных областях.

Для углеводных частей гликозидов методика HMBC позволяет в большинстве случаев определить или подтвердить типы гликозидных связей, поскольку обычно легко обнаруживаются кросс-пики через три связи между аномерным протоном Н-1 гликозилирующего моносахаридного остатка и соответствующим гликозилируемым С-атомом (и наоборот между аномерным С-атомом и соответствующим скелетным протоном у гликозилируемого С-атома). Однако, естественно, прослеживаются кросс-пики и с атомами одного и того же (собственного) моносахаридного остатка, например от Н-1 с С-2, С-3 и иногда даже С-4. На рис. 6 приведен фрагмент HMBC-спектра гликозида **170**, а на рис. 7 – схема структурно информативных корреляций, прослеженных в спектре HMBC для углеводных частей гликозида **170**.

По получаемой информации в отношении типов гликозидных связей применение методики HMBC к углеводной части в определенном смысле подобно методике ROESY и иногда может удачно дополнять ее при неоднозначностях интерпретации в том или ином случае. Однако сложности в отнесении кросс-пиков в большинстве случаев заставляет отдавать предпочтение методике ROESY.

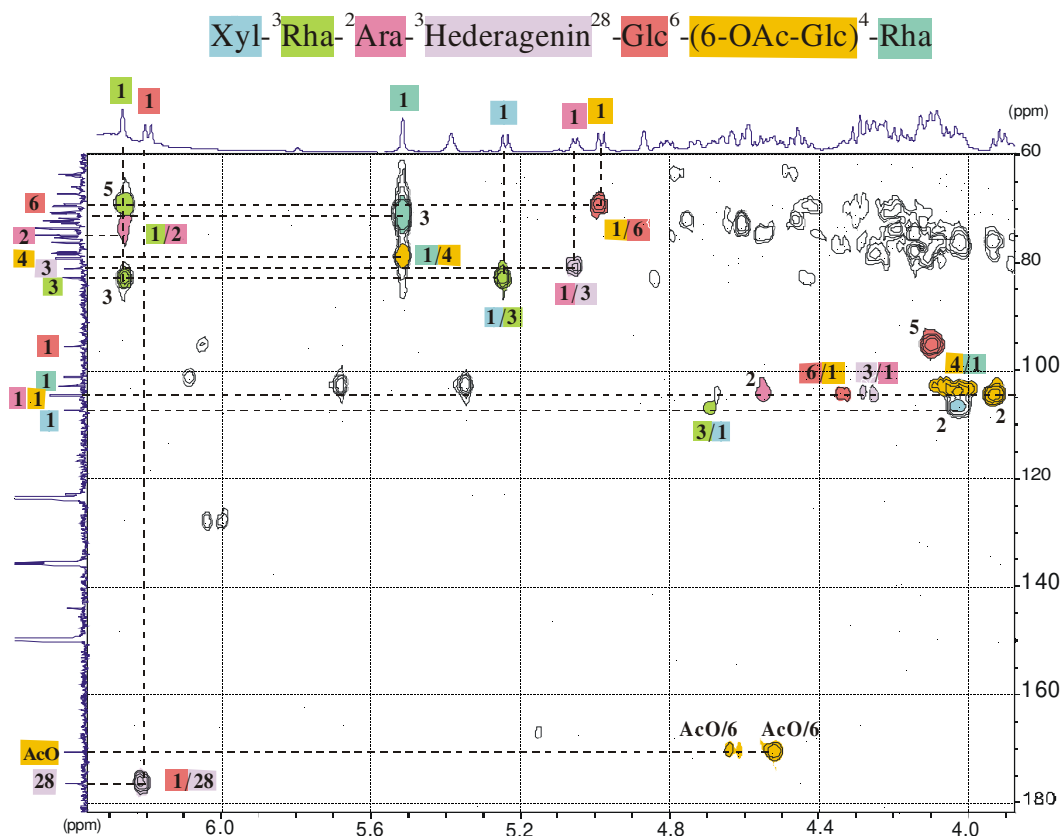


Рис. 6. Фрагмент НМВС-спектра гликозида 170.

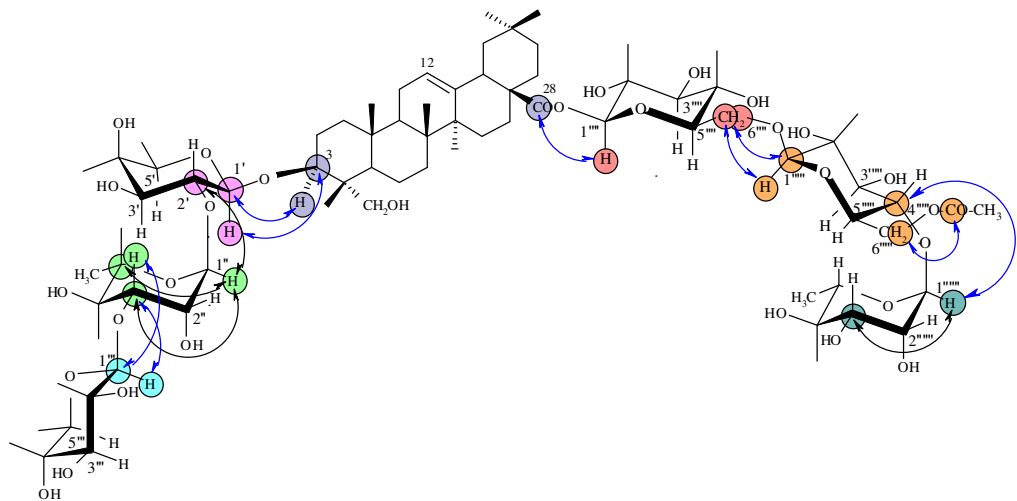


Рис. 7. Схема прослеженных корреляций для углеводных частей в спектре НМВС гликозида 170.

Следует отметить, что методика НМВС является чрезвычайно эффективной в установлении строения гликозидов и особенно их агликонных частей, поскольку позволяет получить информацию, не даваемую иными вышеописанными корреляционными методами. Однако данную методику отличает довольно низкая чувствительность и в большинстве случаев значительная сложность, а иногда и неоднозначность в интерпретации кросс-пиков, что обусловлено с одной стороны не строго фиксированным числом связей между коррелирующими атомами, а с другой стороны химической природой изучаемых объектов, включающих главным образом конденсированные циклические системы, что естественным образом создает множество путей передачи поляризации.

В качестве иллюстрации методики НМВС на Рис. 8 приведена схема прослеженных корреляций в агликонной части гликозидов 30-нортритерпеноидов, а на рис. 9 – в агликонной части гликозида 23,27-дигидроксибетулиновой кислоты.

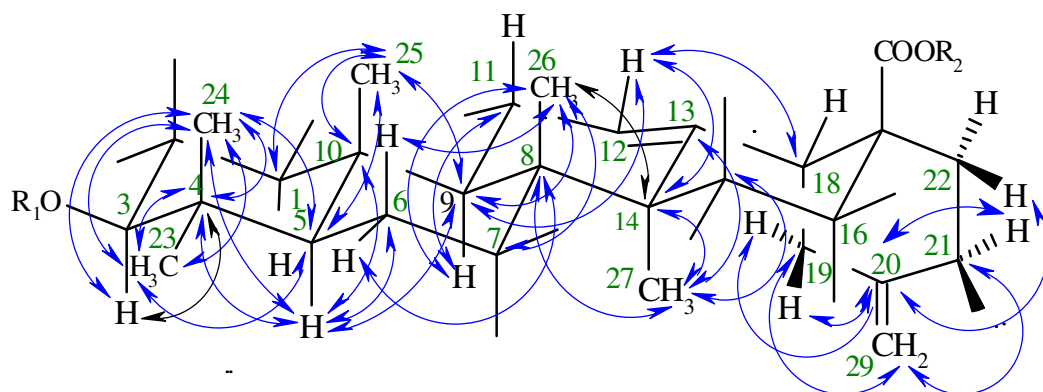


Рис. 8. Схема прослеженных корреляций в спектрах НМВС гликозидов 30-нортритерпеноидов.

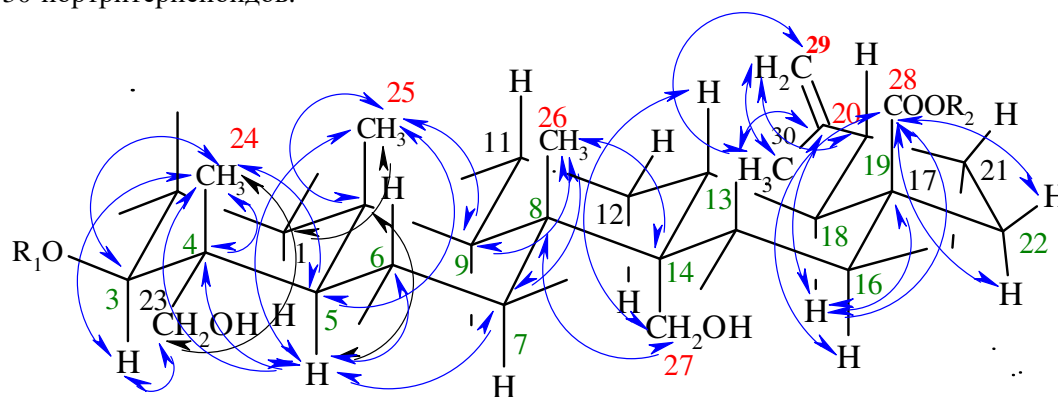


Рис. 9. Схема прослеженных корреляций в спектре НМВС гликозида 23,27-дигидроксибетулиновой кислоты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Рассмотрено применение современных методов одно- и двумерной спектроскопии ^{13}C -ЯМР в установлении строения тритерпеновых гликозидов растений семейства Аралиевые на примере одного из новых, выделенных нами из *Kalopanax septemlobum*, гликозидов – 3-О-β-D-ксилопиранозил-(1→3)-О-α-L-рамнопиранозил-(1→2)-О-α-L-арабинопиранозил-28-О-α-L-рамнопиранозил-(1→4)-О-β-D-6-О-ацетилглюкопиранозил-(1→6)-О-β-D-глюкопиранозилового эфира хедерагенина.
2. Рассмотрены принципы отнесения сигналов в одно-и двумерных спектрах ^{13}C -ЯМР применительно к тритерпеновым гликозидам.
3. Детально рассмотрено использование двумерных методик HSQC и HMBC.

Список литературы

1. Гришковец В. И. Тритерпеновые гликозиды Araliaceae. V. Методы ЯМР-спектроскопии в установлении структуры тритерпеновых гликозидов аралиевых. Одно- и двумерная спектроскопия ^1H -ЯМР / В. И. Гришковец // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2026. – Т. 12 (78), № 1. – С. 292–304.
2. Patt S. L. Attached proton test for carbon-13 NMR / S. L. Patt, J. N. Shoolery // J. Magn. Reson. – 1982. – Vol. 46. – P. 435–438.
3. Levitt M. H. The illusions spin decoupling / M. H. Levitt, G. Bodenhausen, R. R. Ernst // J. Magn. Reson. – 1983. – Vol. 53, № 3. – P. 443–461.
4. Bock K. Assignment of anomeric structure to carbohydrates through geminal C13-H coupling constants / K. Bock, I. Lundt, C. Pedersen // Tetrahedron Lett. – 1973. – № 13. – P. 1037–1040.
5. Bodenhausen G. Correlation of protonated carbon-13 NMR spectra by heteronuclear two-dimensional spectroscopy / G. Bodenhausen, R. Freeman // J. Magn. Reson. – 1977. – Vol. 28. – P. 471–475.
6. Bax A. New NMR techniques for structure determination and resonance assignments of complex carbohydrates / A. Bax, W. Egan, P. Kovac // J. Carbohydr. Chem. – 1984. – Vol. 3. – P. 593–597.
7. Gorin P. A. J. Further studies on the assignment of signals in ^{13}C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides / P. A. J. Gorin, M. Mazurek // Can. J. Chem. – 1975. – Vol. 53. – P. 1212–1215.
8. Tori K. Glycosidation shift in carbon-13 NMR spectroscopy: Carbon-13 signal shift from aglycon and glucose to glucoside / K. Tori, S. Seo, Y. Yoshimura [и др.] // Tetrahedron Lett. – 1977. – P. 179–180.
9. Seo S. Determination of absolute configuration of secondary hydroxy group in a chiral secondary alcohol using glycosidation shift in carbon-13 NMR spectroscopy / S. Seo, Y. Tomita, K. Tori [и др.] // J. Amer. Chem. Soc. – 1978. – Vol. 100. – P. 3331–3339.
10. Shashkov A. S. Stereochemical factors determining the effects of glycosilation on the ^{13}C chemical shifts in carbohydrates / A. S. Shashkov, G. M. Lipkind, Yu. A. Knirel [и др.] // Magnetic Resonance in Chemistry. – 1988. – Vol. 26. – P. 735–747.
11. Kasai R. Carbon-13 chemical shifts of isoprenoid-β-D-glucopyranosides and -β-mannopyranosides. Stereochemical influences of aglycone alcohols / R. Kasai, M. Suzuo, J. Asakawa [и др.] // Tetrahedron Lett. – 1977. – P. 175–177.
12. Kasai R. ^{13}C -NMR study of α- and -β-anomeric pairs of D-mannopyranosides and L-rhamnopyranosides / R. Kasai, M. Okihara, J. Asakawa [и др.] // Tetrahedron. – 1979. – Vol. 35. – P. 1427–1431.
13. Mizutani K. ^{13}C -NMR spectroscopy of α- and -β-anomeric series of alkyl L-arabinopyranosides / K. Mizutani, R. Kasai, O. Tanaka // Carbohydr. Res. – 1980. – Vol. 87. – P. 19–21.
14. Tsuda Y. Lycopodium triterpenoids. (11). The structures of inundoside-A, -B, -C, -D1, -D2, -E, -F, and -G, triterpenoid-glycosides occurring in Lycopodium inundatum L. / Y. Tsuda, M. Kaneda, N. Yasufuku [и др.] // Chem. Pharm. Bull. – 1981. – Vol. 29, № 8. – P. 2123–2134.

15. Bax A. ^1H and ^{13}C assignments from sensitivity enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple-quantum NMR / A. Bax, M. F. Summers // J. Amer. Chem. Soc. – 1986. – Vol. 108. – P. 2093–2095.

TRITERPENE GLUCOSIDES OF ARALIACEAE. VI. NMR SPECTROSCOPIC METHODS IN THE STRUCTURAL ELUCIDATION OF ARALIACEAE TRITERPENE GLYCOSIDES: ONE- AND TWO-DIMENSIONAL ^{13}C -NMR SPECTROSCOPY

Grishkovets V. I.

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

^{13}C NMR spectra with complete proton decoupling are the most informative for the structural elucidation of glycosides. This is explained by several well-established factors: the very high reproducibility of ^{13}C chemical shift values (± 0.1 – 0.2 ppm), their weak dependence on external parameters (temperature, concentration, presence of impurities), the narrow line widths, and the wide spectral range, which practically eliminates overlap. Altogether, these features make ^{13}C NMR spectroscopy particularly valuable for the identification of known compounds on the basis of ^{13}C chemical shift data.

Signal assignments through identification of glycoside fragments (especially the aglycone portion) in conventional ^{13}C NMR spectra were significantly facilitated by the additional use of one-dimensional ^{13}C experiments with editing. The standard APT (Attached Proton Test) editing protocol was commonly employed. In some cases, spectra without proton decoupling were also recorded in order to measure one-bond $^1J_{\text{CH}}$ coupling constants.

The use of two-dimensional heteronuclear correlation spectroscopy (HETCOSY) virtually solved the problem of unambiguous signal assignment in ^{13}C spectra (at least for the carbohydrate moieties) by cross-peaks of directly bonded C–H pairs, since proton resonances are usually well assigned in ^1H NMR spectra with the aid of correlation methods such as COSY, TOCSY, and ROESY. A major limitation of HETCOSY, however, is its very low sensitivity, as signals of carbon nuclei are directly detected, which requires substantial amounts of material and instrument time.

These limitations were largely overcome with the development of the inverse-detected heteronuclear correlation method HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation), in which proton signals are detected during acquisition, thereby greatly improving sensitivity compared to HETCOSY. Most assignments of ^{13}C resonances in both the carbohydrate and aglycone portions of the isolated glycosides were carried out using this correlation method.

In structural studies of new aglycones, the two-dimensional heteronuclear correlation technique HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) proved particularly effective. This method detects correlations of protons with carbons separated

by multiple bonds. The most prominent correlations are observed across three bonds (especially in cases of s-trans arrangements of H and C atoms), although two- and four-bond correlations are also frequently detectable.

For the carbohydrate moieties of glycosides, HMBC most often allows the determination or confirmation of the glycosidic linkage types, since three-bond cross-peaks are readily observed between the anomeric proton (H-1) of the glycosylating sugar residue and the glycosylated carbon atom, and conversely, between the anomeric carbon atom and the corresponding skeletal proton of the glycosylated carbon.

Keywords: Araliaceae, triterpene glycosides, one- and two-dimensional ^{13}C -NMR spectroscopy, ^{13}C -ЯМР-APT, HSQC, HMBC methods.

References

1. Grishkovets V. I. Triterpene glycosides of Araliaceae. V. NMR Spectroscopic Methods in the Structural Elucidation of Araliaceae Triterpene Glycosides: One- and Two-Dimensional ^1H -NMR Spectroscopy, *Scientific notes of the Crimean Federal University named after V. I. Vernadsky. Biology. Chemistry*, **12** (1), 292 (2026). (in Russ.).
2. Patt S. L., Shoolery J. N., Attached proton test for carbon-13 NMR, *J. Magn. Reson.*, **46**, 435 (1982).
3. Levitt M. H., Bodenhausen G., Ernst R. R., The illusions spin decoupling, *J. Magn. Reson.*, **53** (3), 443 (1983).
4. Bock K., Lundt I., Pedersen C., Assignment of anomeric structure to carbohydrates through geminal C13-H coupling constants, *Tetrahedron Lett.*, (13), 1037 (1973).
5. Bodenhausen G., Freeman R., Correlation of protonated carbon-13 NMR spectra by heteronuclear two-dimensional spectroscopy, *J. Magn. Reson.*, **28**, 471 (1977).
6. Bax A., Egan W., Kovac P., New NMR techniques for structure determination and resonance assignments of complex carbohydrates, *J. Carbohydr. Chem.*, **3**, 593 (1984).
7. Gorin P. A. J., Mazurek M., Further studies on the assignment of signals in ^{13}C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides, *Can. J. Chem.*, **53**, 1212 (1975).
8. Tori K., Seo S., Yoshimura Y., Arita H., Tomita Y., Glycosidation shift in carbon-13 NMR spectroscopy: Carbon-13 signal shift from aglycon and glucose to glucoside, *Tetrahedron Lett.*, 179 (1977).
9. Seo S., Tomita Y., Tori K., Yoshimura Y., Determination of absolute configuration of secondary hydroxy group in a chiral secondary alcohol using glycosidation shift in carbon-13 NMR spectroscopy, *J. Amer. Chem. Soc.*, **100**, 3331 (1978).
10. Shashkov A. S., Lipkind G. M., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K., Stereochemical factors determining the effects of glycosylation on the ^{13}C chemical shifts in carbohydrates, *Magnetic Resonance in Chemistry*, **26**, 735 (1988).
11. Kasai R., Suzuo M., Asakawa J., Tanaka O., Carbon-13 chemical shifts of isoprenoid- β -D-glucopyranosides and - β -mannopyranosides. Stereochemical influences of aglycone alcohols, *Tetrahedron Lett.*, 175 (1977).
12. Kasai R., Okihara M., Asakawa J., Mizutani K., Tanaka O., ^{13}C -NMR study of α - and - β -anomeric pairs of D-mannopyranosides and L-rhamnopyranosides, *Tetrahedron*, **35**, 1427 (1979).
13. Mizutani K., Kasai R., Tanaka O., ^{13}C -NMR spectroscopy of α - and - β -anomeric series of alkyl L-arabinopyranosides, *Carbohydr. Res.*, **87**, 19 (1980).
14. Tsuda Y., Kaneda M., Yasufuku N., Shimizu Y., Lycopodium triterpenoids. (11). The structures of inundoside-A, -B, -C, -D1, -D2, -E, -F, and -G, triterpenoid-glycosides occurring in Lycopodium inundatum L., *Chem. Pharm. Bull.*, **29** (8), 2123 (1981).
15. Bax A., Summers M. F., ^1H and ^{13}C assignments from sensitivity enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple-quantum NMR, *J. Amer. Chem. Soc.*, **108**, 2093 (1986).