

На правах рукописи



**ШАМСУТДИНОВ МАРАТ НАДИРОВИЧ**

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДАМИ ДИНАМИЧЕСКОГО И ДВУМЕРНОГО  
ЯМР ПРОСТРАНСТВЕННОГО СТРОЕНИЯ СОЕДИНЕНИЙ,  
ПОДВЕРЖЕННЫХ ХИМИЧЕСКОМУ ОБМЕНУ**

01.04.17 – Химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных  
состояний вещества

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

2017 - 2014

Работа выполнена на кафедре общей физики и в лаборатории ЯМР Института  
физики Казанского (Приволжского) федерального университета

Научный руководитель: доктор химических наук,  
профессор Клочков Владимир Васильевич

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,  
профессор Волков Виталий Иванович  
доктор физико-математических наук,  
профессор Овчинников Игорь Васильевич

Ведущая организация: Московский государственный университет

Защита состоится « 27 » сентября 2012 года в 14.30 часов  
на заседании диссертационного совета Д 002.191.01 при Учреждении  
Российской академии наук Казанский физико-технический институт  
им. Е.К. Завойского КазНЦ РАН: 420029, г. Казань, ул. Сибирский тракт, 10/7.

Отзывы на автореферат (два заверенных экземпляра) просим отправить по  
адресу: 420029, г. Казань, ул. Сибирский тракт, 10/7, КФТИ КазНЦ РАН.

*С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской  
академии наук Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского  
КазНЦ РАН*

Автореферат разослан « 24 » сентября 2011 года

Ученый секретарь

диссертационного совета



М.М. Шакирзянов

2012A  
856

### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Установление пространственного строения молекул является одной из важнейших задач химической физики. Зная структуру молекулы или хотя бы определенного ее фрагмента, можно предсказать физико-химические свойства вещества. Кислородсодержащие гетероциклические соединения входят в состав большого числа сложных молекул, активно используемых в медицине и промышленности. Также многие пептиды обладают фармакологическими свойствами, а некоторые короткие пептидные последовательности, синтезируемые клеткой, являются частью иммунной системы живого организма. Очевидно, что знание пространственного строения этих соединений в растворе позволит подойти к фундаментальному пониманию механизмов воздействия их на протекающие процессы на молекулярном уровне. Зачастую процессы быстрого химического обмена (конформационный позиционный обмен, внутри- или межмолекулярный водородный обмен) «маскируют» спектральные ЯМР параметры изучаемых соединений и не позволяют однозначно описать их пространственное строение в растворах.

Традиционно исследования пространственного строения соединений основаны как на данных одномерной ЯМР спектроскопии, включая динамический ЯМР, так и на использовании двумерной ЯМР NOESY спектроскопии (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy - спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера и обмена). Последняя позволяет определять пути переноса намагниченности, рассчитывать константы скорости медленного химического обмена, а также расстояния между магнитными ядрами, отстоящими друг от друга до 5 Å. При этом следует отметить, что по сравнению с динамическим ЯМР двумерная спектроскопия NOESY недостаточно адаптирована к исследованию структуры относительно малых молекул, подпадающих под условие быстрого движения ( $\omega_0 \tau_c \ll 1$ , где  $\tau_c$  - время корреляции молекулярного движения,  $\omega_0$  - угловая скорость прецессии магнитных ядер). Слабая интенсивность кросс-пиков, длительные времена акцепти-

мента, сильный дрейф спектральных параметров – являются основными факторами, затрудняющие такого рода исследования.

Одним из направлений в работе группы ЯМР кафедры общей физики Казанского федерального университета является развитие методов получения количественной информации о межпротонных расстояниях для низкомолекулярных органических соединений, основанных на данных ЯМР спектроскопии, дополнительная апробация и тестирование которых являлись необходимым условием выполнения данной работы.

Целью диссертационной работы являлось расширение области применения двумерного (2D) ЯМР NOESY подхода для решения структурно-динамических задач в новых соединениях с позиционным (химическим) обменом. В частности, необходимым являлось решение следующих задач:

1. Получение количественной информации о межпротонных расстояниях в молекулах пептидов в растворах при наличии в системе межмолекулярного водородного обмена.

2. Изучение пространственного строения и динамики гетероциклических соединений (S- и O- содержащих) и пептидов, подверженных химическому обмену, методами одномерной динамической ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  и двумерной обменной ЯМР спектроскопии в растворах.

**Методы исследования.** При решении поставленных задач использовались различные методы ЯМР спектроскопии высокого разрешения, в частности, такие ее модификации, как одномерная ЯМР спектроскопия, динамическая ЯМР спектроскопия на ядрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ , двумерные ЯМР импульсные последовательности [COSY (COrrelation Spetroscopy) и NOESY модификации]. Часть этих методов применялась в сочетании с методиками подавления сигнала протонов растворителя. Эксперименты проводились с использованием ЯМР спектрометров «Unity-300» фирмы «Varian Associates Inc.» (рабочая частота 299.94 МГц на ядрах  $^1\text{H}$  и 75.42 МГц на ядрах  $^{13}\text{C}$ ) и «AVANCE-500» фирмы «Bruker» (рабочая частота 500 МГц на ядрах  $^1\text{H}$  и 125 МГц на ядрах  $^{13}\text{C}$ ).

На защиту выносятся следующие основные положения:

1. Экспериментальное исследование процессов химического обмена в растворе для целого ряда ранее не изученных производных 2,4-диоксициклопентана.

2. Установление конформаций компонентов и термодинамических параметров химического обмена для соединений исследованного ряда по данным ЯМР спектроскопии.

3. Развитие методики расчета межпротонных расстояний с использованием NOESY спектроскопии и определение на ее основе значений относительных межпротонных расстояний для ряда пептидов.

4. Развитие метода определения межпротонных расстояний в относительно малых молекулах с использованием NOESY спектроскопии и подавления интенсивного сигнала протонов воды. Межпротонные расстояния для тетрапептида  $n\text{Ac-Ser-Phe-Val-Gly-OMe}$ , полученные с применением этого метода.

Научная новизна диссертации состоит в следующем:

*Впервые* установлены спектральные характеристики и структуры компонентов конформационного обмена в растворе для ряда ранее не изученных производных 2,4-диоксициклопентана.

При помощи двумерной ЯМР NOESY спектроскопии *впервые* оценены межпротонные расстояния для некоторых пептидов в дейтерированном растворителе ( $\text{D}_2\text{O}$ ), и на основании этих экспериментов установлено их пространственное строение в растворах.

С помощью методов двумерной ЯМР NOESY спектроскопии в сочетании с методикой подавления интенсивного сигнала ЯМР от протонов воды в растворителе  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  (1/9) *впервые* определены межпротонные расстояния между N-H протонами и протонами, относящимися к различным аминокислотным остаткам, в тетрапептиде  $n\text{Ac-Ser-Phe-Val-Gly-OMe}$

Методом двумерной ЯМР NOESY спектроскопии *впервые* получены экспериментальные данные об относительных межпротонных расстояниях в 8,8-дихлор-3,5-диоксо-4-тиабицикло[5.1.0]октан-4-оксиде; подтверждена корректность использования эмпирической зависимости Кардуса-Кеннол (различимость

константы спин-спинового взаимодействия от двугранного угла) для этиленоподобных фрагментов в этом типе молекул.

**Обоснованность и достоверность результатов** подтверждается: согласием с аналогичными исследованиями, проводимыми с помощью других физических методов (рентгеноструктурный анализ) и подходов в ЯМР спектроскопии (например, с данными анализа величин остаточного диполь-дипольного взаимодействия, в тех случаях, где это было возможно); использованием современного ЯМР оборудования и программного обеспечения.

**Практическая значимость работы:**

1. Спектральные характеристики, конформации компонентов обмена и активационные параметры, характеризующие конформационный обмен, производных 2,4-диоксоциклогептана могут быть использованы при исследовании более сложных соединений, содержащих схожие структурные фрагменты.

2. Межпротонные расстояния для 3 пептидов и молекулы 8,8-дихлор-3,5-диоксо-4-гиабицикло[5.1.0]октан 4-оксида могут быть использованы при проверке на реализуемость теоретически рассчитанных структур.

3. Анализ систематической ошибки в значениях межпротонных расстояний, получаемых с использованием методов двумерной ЯМР NOESY спектроскопии в сочетании с методикой подавления сигнала от протонов растворителя в спектрах ЯМР, может быть использован при интерпретации результатов исследований подобных соединений.

**Личный вклад автора:**

1. Участие в постановке целей и задач исследования.
2. Проведение ЯМР экспериментов по изучению пространственного строения и параметров химического обмена ряда семичленных гетероциклов и небольших пептидов.
3. Обработка, анализ и интерпретация полученных экспериментальных результатов.
4. Написание статей.

**Апробация работы.** Результаты работы были доложены и обсуждены на IV-м Всероссийском семинаре «Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях» (г. Казань, 2005); на XII и XIII-й Всероссийских конференциях «Структура и динамика молекулярных систем» (г. Йошкар-Ола, 2005, 2006) и на IV-ой Международной конференции по новым технологиям и приложениям современных физико-химических методов для изучения окружающей среды (Ростов-на-Дону, 2007) и на международной конференции «EUROMAR 2008. Magnetic Resonance for the Future» (St.Peterburg, Russia, 2008).

Диссертационная работа выполнена в лаборатории ЯМР Института физики и в НИЛ «Изучение строения органических соединений» Химического института им.Бутлерова КФУ. Работа на отдельных этапах выполнялась в рамках грантов РФФИ (06-03-32101а, 09-03-00077а), совместной программы CRDF и Министерства образования России «Фундаментальные исследования и высшее образование» (REC-007) (2006 – 2007 г.г.) и программы Федерального агентства по образованию РФ (НИР КГУ N 1.3.03, ЕЗН).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 14 работ, из них 5 статей в рецензируемых журналах и 9 работ в сборниках трудов и тезисов вышеперечисленных Международных и Российских научных конференций.

**Структура и объем работы.** Работа состоит из введения, трех глав, выводов, благодарностей, списка литературы и авторского списка литературы. Работа изложена на 125 страницах, содержит 55 рисунков и 15 таблиц. Список цитированной литературы содержит 96 наименований.

#### ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность диссертационной работы, сформулирована цель, приведены методы и объекты исследования, научная новизна и практическая значимость полученных результатов, представлены выносимые на защиту научные положения.

В первой главе представлены общие вопросы ЯМР спектроскопии. Изложены положения теории одномерного ЯМР в системах с химическим обменом

ном (динамический ЯМР). Описаны основные особенности двумерной ЯМР спектроскопии, а также более подробно рассмотрено применение импульсной последовательности NOESY для определения пространственной структуры различных конформаций и расчета отдельных межпротонных расстояний в органических молекулах. Также в первой главе сделано краткое введение в существующие на сегодняшний день методики подавления интенсивного сигнала воды в одномерных и двумерных ЯМР спектрах.

Во второй главе дано теоретическое описание основных типов конформаций и конформационных переходов в циклах среднего размера, а также приводятся результаты исследования 4,8 замещенных 3,5-диоксо-бицикло[5.1.0]-октанов и семичленных ацеталей пиридоксина.

Для семичленных циклов возможно существование нескольких канонических конформационных структур: 2 конформера с плоскостью симметрии ( $C_s$ ) – «кресло» (К) и «ванна»; 2 конформера с осью симметрии ( $C_2$ ) – «твист-кресло» (ТК) и «твист-ванна» (ТВ). Введение одного или нескольких гетероатомов, равно как и введение заместителей в семичленный цикл, принципиальную картину конформационного состава семичленных циклов не меняет.

Взяв в качестве объекта исследования соединения ряда (I) (Рис.1) с 4,4-пентаметилеловым фрагментом, мы ожидали реализацию в растворе двух «твист» форм как для (Ia), так и для (Iб) [1].

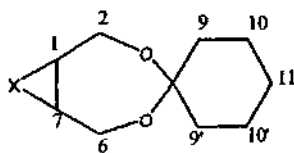


Рис. 1. Соединение (I): (Ia) X=S, (Iб) X=O

Результаты анализа спектров ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ , 2D COSY позволили подтвердить это предположение. Общий вид спектров для обоих соединений, а также то обстоятельство, что удалось выделить в спектре при  $T = 173$

К четырем АВ-системам, соответствующие 2 парам метиленовых протонов при атомах  $\text{C}^2$  и  $\text{C}^6$  (Рис.2), является подтверждением реализации двух «твист» форм в растворе. Для более симметричных форм «кресло» или «ванна» спектр был бы проще – две АВ-системы, вместо четырех.



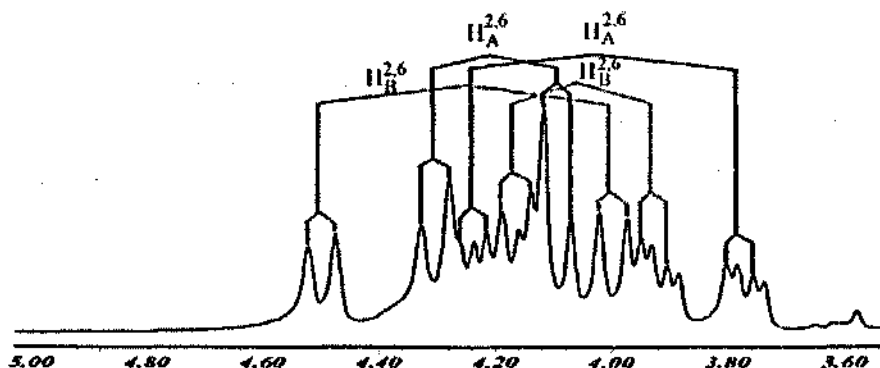


Рис. 2. Соотнесение сигналов в низкотемпературном спектре ЯМР  $^1\text{H}$  соединения (Ia) в области метиленовых протонов. Разной высотой линий выделены сигналы двух различных форм.

С использованием программы WINDNMR-Pro проведено сравнение теоретически рассчитанных и экспериментальных форм линий при различных температурах. В результате получены зависимости константы скорости химического обмена от температуры для (Ia) и (Iб) и определены энергетические параметры «кресло»-«кресло» инверсии спиранового фрагмента, представленные в таблице 1. Здесь и далее энергия активации  $\Delta G^\ddagger$  рассчитывалась в точке согласно одному из уравнений Эйринга и Винни-Джонса (4-й столбец) и путем обработки линейной зависимости (5-й столбец).

Таблица 1 Активационные параметры переходов для соединений ряда (I)

Соединение	$\Delta H^\ddagger$ , кДж/моль	$\Delta S^\ddagger$ , Дж/(К·моль)	$\Delta G^\ddagger$ , кДж/моль (T=188 К)	$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \cdot \Delta S^\ddagger$ , кДж/моль (T=188 К)
Ia	$37.9 \pm 4.3$	$-0.8 \pm 7.5$	38.1	$38.1 \pm 5.7$
Iб	$50.0 \pm 5.3$	$49.9 \pm 6.6$	40.5	$40.6 \pm 6.5$

Отдельного комментария заслуживает высокое значение величины  $\Delta S^\ddagger$  для соединения (Iб). Мы считаем, что оно связано с неточностью в определении  $\Delta H^\ddagger$ , обусловленной различного рода неучтенными факторами, такими как тем-

пературные зависимости спектральных параметров и величин диэлектрической проницаемости используемых растворителей.

Теоретические расчеты энергий возможных конформационных образований при помощи программы MORAC 8.0.3 в рамках полуэмпирического подхода с использованием метода PM 3 подтверждают возможность реализации 2 энергетически близких взаимопревращающихся «твист»-форм (Рис. 3).

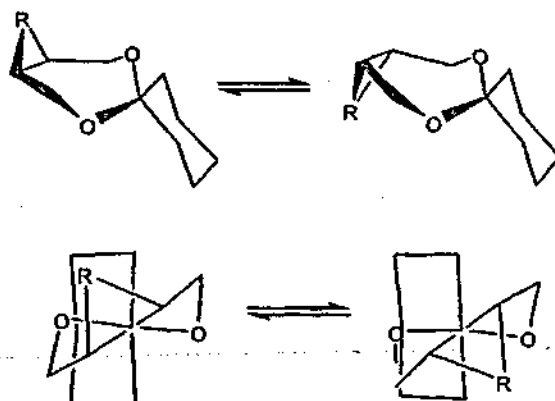


Рис. 3. Рассчитанные для соединений ряда (I) конформации (сверху – боковая проекция, снизу – проекция с другой стороны)

Для соединения (II) теоретически возможны несколько различающихся конформаций, что предопределено эндо- или экзо-положениями дихлорциклопропанового фрагмента, аксиальным или экваториальным расположением кислорода сульфоксидной группы, интерконверсией диоксана. Однако большой атомный радиус хлора обуславливает энергетическую невыгодность эндо-положения дихлорциклопропана. Соответственно, логично было ожидать различия лишь в ориентации S=O-связи и исследовать, какая конформация реализуется для семичленного цикла в обоих случаях. Для двух различных изомеров с аксиальным (IIa) и экваториальным (IIб) расположением атома кислорода группы S=O относительно плоскости цикла (Рис. 4) нами были проведены динамические исследования в диапазоне температур 179÷293К.

В процессе исследования продемонстрирована конформационная однородность соединения (IIa) в температурном диапазоне от 179 до 293K (растворитель - смесь  $CD_2Cl_2+CS_2$  в объемном отношении 1:2). Учитывая результаты исследований родственных соединений [2, 3], мы считаем, что в данном случае реализуется именно кресловидная конформация с аксиальным расположением  $S=O$ . Подтверждением этого является также то, что только такое расположение этой связи приводит к сильному влиянию электрического поля и магнитной анизотропии на неэквивалентность экваториальных и аксиальных протонов при атомах  $C^2$  и  $C^6$ . Последнее видно (таблица 2) из того, что для этих протонов имеет место обращение химических сдвигов, т.е. экваториально расположенные протоны резонируют в более сильных полях, чем соответствующие им аксиальные.

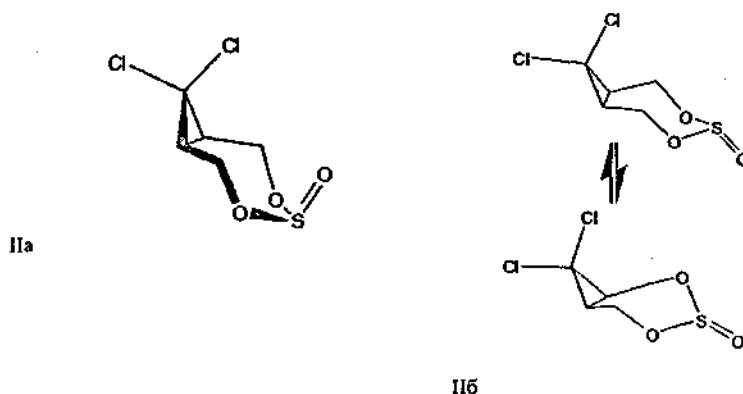


Рис. 4. Соединение (II), которое реализуется в виде двух изомеров

Соединение (IIb) оказалось конформационно неоднородным. Учитывая, что для семичленных гетероциклов с планарным фрагментом есть возможность реализации лишь двух конформаций— «кресло» и «твист», мы предположили, что наблюдается «кресло» — «твист» равновесие. Косвенным свидетельством этого является:

- сходство спектра одного из партнеров обмена со спектром для конформационно чистого изомера (на основании отсутствия обращения хими-

ческих сдвигов, чего и следовало ожидать для экваториального расположения атома кислорода в S=O), «кресловидность» которого уже продемонстрирована;

- малые величины вицинальных констант для метиленовых протонов второго набора, что может быть обусловлено усреднением за счет быстрого обмена атомов, который возможен для «твист»-«твист» перехода.

В результате симуляции спектров при помощи программы MestRe-C были извлечены значения геминальных и вицинальных констант спин-спинового взаимодействия (КССВ) для протонов гетероциклического фрагмента. Результаты представлены в таблице 2. Для получения дополнительной информации нами были записаны спектры и извлечены КССВ для схожей по структуре молекулы 4-фенил-3,5-диоксабицикло[5.1.0]-8-дихлороктана, для которой подтверждена реализация конформации «кресло» с экваториальным расположением фенильной группы по данным рентгеноструктурного и ЯМР анализа [1].

Близость величин геминальных и вицинальных констант (см. таблицу 2) для сульфитов соответствующим величинам констант молекулы с фенильным фрагментом подтверждает реализацию «кресло-а» и «кресло-е» конформаций для (IIa) и (IIб).

Соотнесение сигналов производилось, исходя из предположения о том, что вицинальная константа между метиновым и метиленовым атомами водорода больше для аксиального протона. Однако это утверждение, являющееся следствием обобщения ситуации для этиленоподобных фрагментов сложных молекул (зависимость Карплуса-Конроя), было проверено путем определения соответствующих расстояний между протонами для жесткого изомера при комнатной температуре. В качестве калибровочного принималось расстояние между метиленовыми протонами и относительно него были измерены два других расстояния (таблица 3). Полученные результаты подтвердили корректность нашего изначального предположения о структуре – значения вицинальных констант между метиновым и метиленовыми протонами больше для случая аксиального расположения атома водорода при C<sup>2</sup> и C<sup>6</sup>.

Так же определены активационные параметры «кресло-е» – «твист» инверсии гетероциклического фрагмента, представленные в таблице 4.

Таблица 2 КССВ для исследованных соединений.

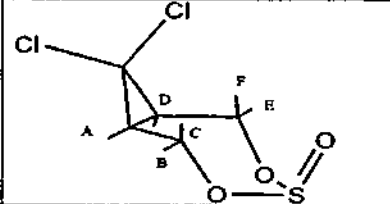
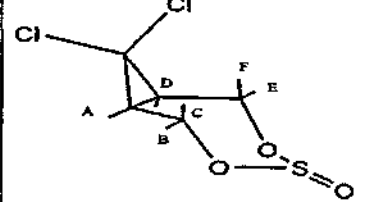
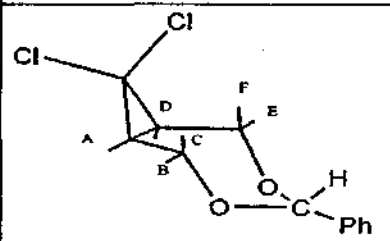
	$I_{AB} = I_{DE} = 6.7 \text{ Гц}$ $I_{AC} = I_{DF} = 10.9 \text{ Гц}$ $I_{AD} = 11.1 \text{ Гц}$ $I_{BC} = I_{EF} = 13.5 \text{ Гц}$ $I_{AE} = I_{DB} = 0.2 \text{ Гц}$ $I_{AF} = I_{DC} = -0.5 \text{ Гц}$	$\delta_A = \delta_D = 2.36 \text{ м.д.}$ $\delta_B = \delta_E = 4.23 \text{ м.д.}$ $\delta_C = \delta_F = 5.07 \text{ м.д.}$
	$I_{AB} = I_{DE} = 6.2 \text{ Гц}$ $I_{AC} = I_{DF} = 9.6 \text{ Гц}$ $I_{BC} = I_{EF} = 13.6 \text{ Гц}$ $I_{AD} = 10 \text{ Гц}$	$\delta_A = \delta_D = 2.37 \text{ м.д.}$ $\delta_B = \delta_E = 4.72 \text{ м.д.}$ $\delta_C = \delta_F = 4.17 \text{ м.д.}$
	$I_{AB} = I_{DE} = 7.2 \text{ Гц}$ $I_{AC} = I_{DF} = 9.5 \text{ Гц}$ $I_{AD} = 11.9 \text{ Гц}$ $I_{AE} = I_{DB} = 0.3 \text{ Гц}$ $I_{AF} = I_{DC} = 0.2 \text{ Гц}$ $I_{BC} = I_{EF} = 13.2 \text{ Гц}$	$\delta_A = \delta_D = 2.31 \text{ м.д.}$ $\delta_B = \delta_E = 4.65 \text{ м.д.}$ $\delta_C = \delta_F = 3.92 \text{ м.д.}$

Таблица 3 Относительные расстояния для жесткого изомера

	расстояние, $r/r_c$	погрешность, $\Delta r/r_c$
$r(H^B-H^C)$	1	-
$r(H^A-H^B)$	1.21	0.06
$r(H^A-H^C)$	1.40	0.14

Таблица 4 Активационные параметры переходов для соединений ряда II

Соединение	$\Delta H^\ddagger$ , кДж/моль	$\Delta S^\ddagger$ , Дж/(К·моль)	$\Delta G^\ddagger$ , кДж/моль ( $T=188 \text{ К}$ )	$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \cdot \Delta S^\ddagger$ , кДж/моль( $T=188 \text{ К}$ )
II	$42.4 \pm 4.6$	$1.6 \pm 0.3$	41.6	$42.1 \pm 3.1$

Для соединения (III) возможны различные расположения как для трехчленного, так и семичленного фрагментов молекулы. Изначально были синтезированы и разделены 2 изомера – с экзо- и эндо- положениями трехчленного цикла (Рис.5).

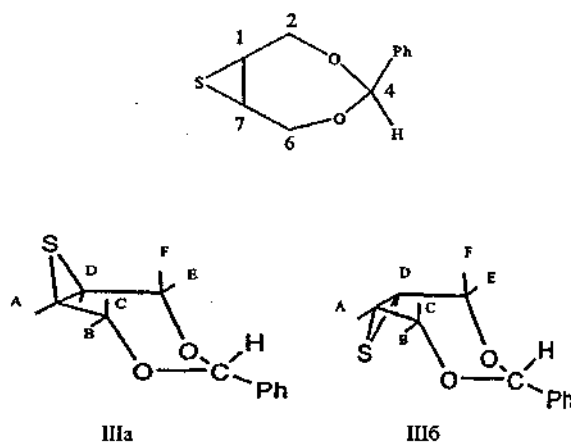


Рис. 5. Структурные формулы экзо-(слева) и эндо-(справа) изомеров соединения (III)

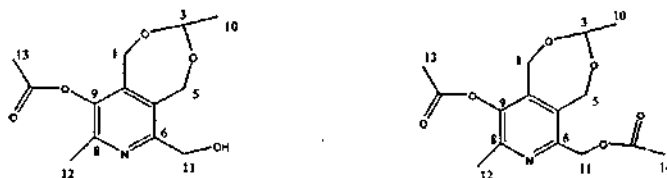
Для первого изомера ожидалась конформационная однородность, что и было подтверждено в результате анализа  $^1\text{H}$  ЯМР спектров соединения (IIIa) в температурном диапазоне 153–293 К.

Для второго изомера с эндо-положением трехчленного фрагмента ожидалось равновесие «твист» – «кресло» [4]. Результаты экспериментов ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  подтвердили это предположение. Также нами определены параметры активации для обмена (таблица 5). Большая величина  $\Delta S^\ddagger$  для (III), по нашему мнению, обусловлена причинами, озвученными ранее для соединения (16).

Таблица 5 Активационные параметры переходов для соединений ряда (III)

Соединение	$\Delta H^\ddagger$ , кДж/моль	$\Delta S^\ddagger$ , Дж/(К·моль)	$\Delta G^\ddagger$ , кДж/моль (T=188 К)	$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \cdot \Delta S^\ddagger$ , кДж/моль (T=188 К)
III	26.9±4.7	-56.5±20.8	38.0	37.8±8.6

При изучении динамики и структуры соединений ряда (IV) (Рис.5) нами ставилась задача определения межпротонных расстояний для различных конформаций.



(IVa)

(IVб)

Рис. 6. Структурные формулы соединений ряда (IV)

На основе анализа одномерных  $^1\text{H}$  и NOESY ЯМР спектров установлено, что монозамещенные ацилированные ацетали в растворах существуют в конформациях «кресло» и спектральная картина при динамическом ЯМР в этом случае обусловлена только процессами диастереотопомеризации структур в рамках одной конформации семичленного цикла – «кресло(е)». Спектральные параметры соединений (IVa) и (IVб) представлены в таблице 6.

Таблица 6 Химические сдвиги ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\delta$ , м.д.) и константы спин-спинового взаимодействия ( $J$ , Гц) соединений ряда (IV)

	$\delta$ , м.д.	$\text{H}^{1,5}$	$\text{H}^3$	$\text{H}^{10}$	$\text{H}^{11}$	$\text{H}^{12}$	$\text{H}^{13}$	$\text{H}^{14}$
IVa	293 К	4.88, 4.60 (15.14 Гц) 1.1	5.12 (5.25 Гц)	1.40 (5.35 Гц)	-4.57	2.40	2.37	-
		4.83, 4.56 (15.75 Гц) 1.0						
IVa	183 К	4.86, 4.62 (15.40 Гц) 4.83, 4.45 (15.86 Гц)	5.09 (5.10 Гц) 5.11 (5.10 Гц)	1.34(-4.86 Гц) 1.33(-4.77 Гц)	5.51	2.28	2.35	-
		4.67, -4.55 (15.86 Гц) -4.55, 4.46 (14.38 Гц)						
IVб	293 К	5.02, 4.74 (15.17 Гц) 4.83, 4.56 (15.68 Гц)	5.12(5.30 Гц)	1.39 (5.32 Гц)	-5.11	2.08	2.36	2.34
		4.95, 4.72 (15.29 Гц) 4.95, 4.66 (16.00 Гц)	5.10(5.27 Гц)	1.35(-4.22 Гц) 1.34(-4.42 Гц)	-5.03	2.05	2.37 2.36	2.30
4.87, 4.47 (15.74 Гц) 4.69, 4.57 (15.68 Гц)								

Анализ спектров NOESY при температуре 183 К (рис. 7) выявил всего 2 кросс-пика, обусловленных ЯЭО:

- ✓ между одиночным протоном при атоме  $C^3$  и ближайшей метиловой группой;
- ✓ между этой же  $CH_3$ -группой и метиленовыми протонами семичленного гетероцикла.

Две перечисленные выше пары расстояний интереса не представляют – они не характеризуют пространственное строение молекул в целом, поэтому задачу получения межпротонных расстояний можно считать не решенной. Однако следует отметить, что отсутствие других кросс-пиков может быть использовано для проверки реализуемости теоретически рассчитанных структур. Если какое-либо из расстояний окажется менее 5 Å, то можно утверждать, что найденная модель недостаточно корректно описывает реальную ситуацию.

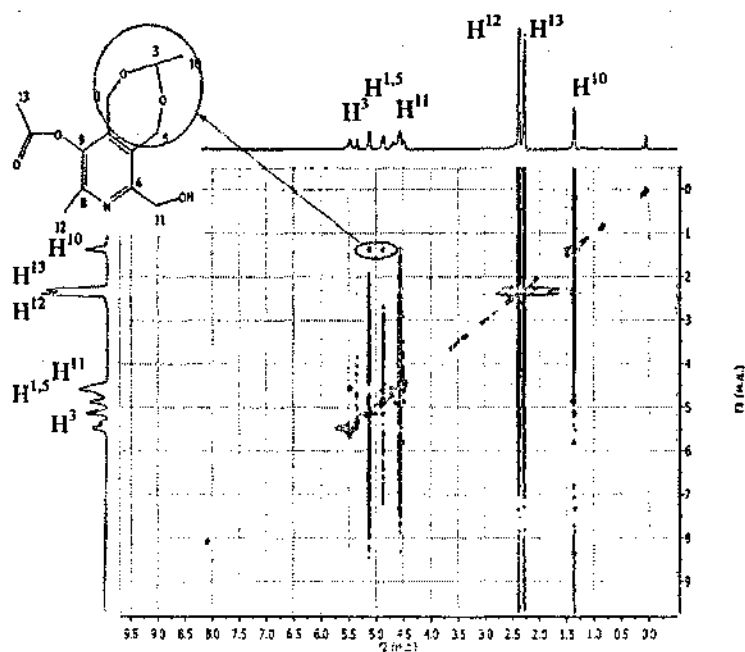


Рис. 7. Спектр 2D NOESY (500 МГц) соединения IVa при температуре 183 К ( $t_{mix} = 0,5$  с)



В третьей главе описаны спектры ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY и NOESY трех пептидов (Рис. 8). Для тетрапептида проведено сравнение расстояний, вычисленных с использованием стандартной методики и методики, основанной на совмещении количественной NOESY спектроскопии для малых молекул с подавлением интенсивного сигнала воды в двумерном спектре.

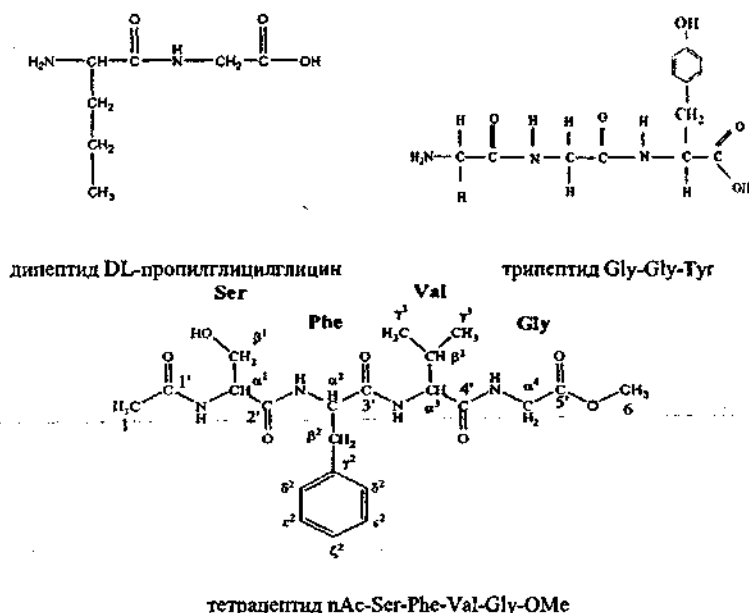


Рис. 8. Структурные формулы исследованных пептидов

Изначально в качестве образцов использовались соединения, растворенные в  $\text{D}_2\text{O}$ . Для всех пептидов были записаны спектры ЯМР  $^1\text{H}$  и COSY при комнатной температуре, что позволило однозначно соотнести сигналы в спектре для использования в дальнейшем при количественных расчетах.

На основании анализа спектров NOESY, записанных при различных временах смешивания, были рассчитаны межпротонные расстояния для дипептида пропилглицилглицин, трипептида Gly-Gly-Tyr, тетрапептида nAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe. Результаты этих расчетов представлены в таблице 7.

Таблица 7 Межпротонные расстояния для исследованных пептидов

дипептид DL-пропилглицилглицин			
	r/r <sub>0</sub>	Δr/r <sub>0</sub>	-
r(H <sup>a</sup> -H <sup>b</sup> )	1.00	-	-
r(H <sup>a</sup> -H <sup>δ</sup> )	1.38	0.08	-
r(H <sup>a</sup> -H <sup>γ</sup> )	1.19	0.07	-
r(H <sup>β</sup> -H <sup>γ</sup> )	1.06	0.05	-
r(H <sup>β</sup> -H <sup>δ</sup> )	1.10	0.07	-
r(H <sup>γ</sup> -H <sup>δ</sup> )	1.07	0.05	-
трипептид Gly-Gly-Tyr			
	r, Å	Δr, Å	r <sub>листор</sub> , Å
r(H <sup>γ</sup> -H <sup>δ</sup> )	2.49	-	2.49
r(H <sup>γ</sup> -H <sup>α</sup> )	3.02	0.10	2.99
r(H <sup>γ</sup> -H <sup>β</sup> )	2.61	0.11	2.50
r(H <sup>γ</sup> -H <sup>β</sup> )	2.73	0.13	2.43
r(H <sup>α</sup> -H <sup>β</sup> )	2.85	0.14	3.06
r(H <sup>α</sup> -H <sup>β</sup> )	2.59	0.13	2.52
r(H <sup>β</sup> -H <sup>β</sup> )	1.84	0.10	1.76
тетрапептид nAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe			
	r, Å	Δr, Å	-
δ <sup>2</sup> -CH - ε <sup>2</sup> -CH	2.49	-	-
δ <sup>2</sup> -CH - α <sup>2</sup> -CH	2.27	0.12	-
δ <sup>2</sup> -CH - β <sup>2</sup> -CH <sub>2</sub>	1.88	0.08	-
β <sup>3</sup> -CH - γ <sup>3</sup> -CH <sub>3</sub>	2.01	0.11	-
α <sup>2</sup> -CH - β <sup>2</sup> -CH <sub>2</sub>	1.91	0.10	-
α <sup>4</sup> -CH <sub>2</sub> - β <sup>3</sup> -CH	2.36	0.09	-
α <sup>4</sup> -CH <sub>2</sub> - γ <sup>3</sup> -CH <sub>3</sub>	2.27	0.09	-

Следует отметить несколько важных моментов:

1. Выбрать калибровочную пару протонов для дипептида было затруднительно, так как нет изначально пространственно жестких фрагментов. В итоге в качестве калибровочного мы брали расстояние между протоном при

атоме  $C^\alpha$  и протонами при  $C^\beta$  (оно обозначено как  $r_0$ ). Все остальные расстояния определены относительно  $r_0$ .

2. Для трипептида в таблице, кроме рассчитанных нами расстояний, в крайнем правом столбце указаны те же расстояния, рассчитанные с использованием методики анализа констант остаточного диполь-диполь взаимодействия в лиотропных средах [6].

3. Используемая методика позволяет получить лишь расстояния, не превышающие  $3\text{--}4 \text{ \AA}$ , поэтому, для всех 3 соединений не представляется возможным судить об относительном положении различных аминокислотных остатков.

Следующим этапом исследования была запись спектров ЯМР с применением импульсных последовательностей для подавления сигнала воды в спектре. Это позволило использовать в качестве растворителя смесь 10%  $D_2O$  / 90%  $H_2O$ .

Нами были опробованы разные методики подавления сигнала воды в спектре (метод предварительного насыщения, метод подавления селективным составным  $90^\circ$  импульсом [7], WATERGATE со стандартным  $180^\circ$ -импульсом 3-9-19-19-9-3 [8]). Сравнение полученных в результате спектров показало, что различия в интенсивности сигналов при использовании различных методик минимальны, следовательно, можно применять любую из них. В дальнейшем нами за основу брался метод предварительного насыщения, как наиболее простой и дающий удобные в интерпретации результаты.

Используя импульсную последовательность NOESY в сочетании с методикой подавления сигнала протонов воды, мы определили расстояния между протонами. При этом использовалась методика нормирования кросс-пиков на диагональные. Измеренные таким способом межпротонные расстояния приведены в таблице 8. Для сравнения там указаны расстояния, измеренные без подавления сигналов воды в спектре.

Таблица 8 Межпротонные расстояния, найденные из анализа спектров 2D NOESY, записанных с подавлением интенсивных сигналов воды.

	$r, \text{Å}$	$\Delta r, \text{Å}$	$r, \text{Å}$ , без подавл.
$\delta^2\text{-CH} - \varepsilon^2\text{-CH}$	2.49	-	-
$\delta^2\text{-CH} - \alpha^2\text{-CH}$	2.64	0.09	2.27
$\delta^2\text{-CH} - \beta^2\text{-CH}_2$	2.29	0.07	1.88
$\beta^1\text{-CH} - \gamma^1\text{-CH}_3$	2.59	0.10	2.01
$\alpha^2\text{-CH} - \beta^2\text{-CH}_2$	2.34	0.12	1.91
$\delta^2\text{-CH} - \beta^1\text{-CH}_2$	3.50	0.12	-
$\alpha^2\text{-CH} - \text{NH}^{\text{Phe-Val}}$	2.55	0.08	-
$\beta^1\text{-CH} - \alpha^1\text{-CH}_3$	2.66	0.06	-
$\alpha^1\text{-CH} - \gamma^1\text{-CH}_3$	2.57	0.08	-
$\beta^2\text{-CH}_2 - \text{NH}^{\text{Phe-Val}}$	3.41	0.11	-
$\gamma^1\text{-CH}_3 - \text{NH}^{\text{Phe-Val}}$	3.06	0.08	-
$\beta^1\text{-CH} - \text{NH}^{\text{Phe-Val}}$	3.12	0.13	-
$\alpha^1\text{-CH} - \text{NH}^{\text{Phe-Val}}$	2.45	0.09	-

Использование методик подавления сигнала протонов растворителя в сочетании с двумерной NOESY спектроскопией позволило не только определить расстояния между протонами внутри отдельных аминокислотных остатков, но и судить об относительном расположении аминокислотных остатков.

Однако сравнение результатов исследований с использованием методики подавления сигнала протонов воды и без использования этой методики показывает наличие определенного систематического расхождения в расстояниях. При подавлении сигнала протонов воды полученные расстояния примерно на 0,40 Å больше расстояний, найденных без использования подавления. Возможной причиной таких различий является присутствие протонного обмена молекул пептида с протонами растворителя со скоростью выше 1 с<sup>-1</sup>.

### ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

На основании экспериментальных исследований (спектроскопия ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ , двумерная ЯМР спектроскопия, COSY и NOESY модификации) пространственного строения соединений с позиционным (химическим) обменом получены следующие основные результаты:

1. Установлены спектральные характеристики, конформации компонентов химического обмена в растворе и термодинамические параметры конформационного обмена для ряда ранее не изученных производных 2,4-диоксоциклопентана.

2. При помощи двумерной ЯМР NOESY спектроскопии оценены межпротонные расстояния для некоторых олигопептидов в дейтерированном растворителе ( $\text{D}_2\text{O}$ ), и на основании этих экспериментов установлено их пространственное строение в растворах.

3. С помощью методов двумерной ЯМР NOESY спектроскопии в сочетании с методикой подавления интенсивного сигнала ЯМР от протонов воды впервые определены межпротонные расстояния между N-H протонами и протонами, относящимися к различным аминокислотным остаткам, в тетрапептиде пAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe. Показано наличие систематической ошибки в расчетных значениях межпротонных расстояний, получаемых с использованием этой методики.

4. Методом двумерной ЯМР NOESY спектроскопии получены экспериментальные данные об относительных межпротонных расстояниях в 8,8-дихлор-3,5-диоксо-4-тиабцикло[5.1.0]октан 4-оксиде; подтверждена корректность использования обобщенной зависимости Карплуса-Конроя для этиленоподобных фрагментов в этом типе молекул.

### ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Стереохимия семичленных гетероциклов. Пространственная структура 4-R-3,5-диоксабицикло[5.1.0]октанов / В.Ю. Федоренко, Р.Н. Барышников, Б.И. Хайрутдинов и др. // Ж. Орг. Химии. - 2005. - Т.41, Вып. 2. - С.301-305.

2. Overberger C.G. Temperature dependence of the conformational equilibria of cyclic sulfites / C.G. Overberger, T. Kurtz, S. Yaroslavsky // *J. Organ Chem.* – 1965. – V.30, № 12. – P.4363-4364.

3. Исследование анизотропной поляризуемости сульфитной группы/ Б.А. Арбузов, А.Н. Верещагин, И.В. Анонимова и др. // *Изв. АН СССР, сер. хим.* – 1973. – № 1 – С.105-107.

4. Ключков В.В. Динамический ЯМР карбо- и гетероциклов среднего размера: Дис. д-ра хим. наук: 02.00.03 / Каз. гос. ун-т. – Казань, 1991. – 406 с.

5. Петухов А.С. Синтез, пространственная структура и свойства семичленных ацеталей пиридоксина: Дис. канд. хим. наук: 02.00.03 / Каз.гос.ун-т. – Казань, 2004. – 177 с.

6. Пространственное строение некоторых трипептидов в диотропных средах, растворах и твердой фазе по данным ЯМР спектроскопии/ А.В. Ключков, М.Н. Шамсутдинов, Б.К. Валеев и др. // XIII Всероссийская конференция "Структура и динамика молекулярных систем": Сборник статей. - Й-Ола, Казань, Уфа, Москва, РФ. - 2006. - Ч.1. – С.406-410.

7. Вах А. A Spatially Selective Composite 90° Radiofrequency Pulse / A.A. Vax // *J. Magn. Reson.* – 1985. – V.65. – P.142-145.

8. Piotto M. Gradient-tailored Excitation for Single-quantum NMR Spectroscopy of Aqueous Solutions / M. Piotto, V. Saudek, V. Sklenar // *J. Biomol. NMR.* – 1992. – V.2. – P.661-666.

#### СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Стереохимия семичленных гетероциклов. XLVI. Синтез, динамическая спектроскопия ЯМР  $^{13}\text{C}$  4,4-пентаметилен гетеробиицикло [5.1.0]октанов. Расчеты родственных формалей и ацетонидов методом теории функционала плотности/ В.В. Гаврилов, М.Н. Шамсутдинов, Г.А. Чмутова и др. // *Ж. Орг. Химии.* - 2007.- Т. 43, Вып.12. - С.1841-1847.

2. Conformational stability of diastereomeric 3,8-dichloro-3,5-dioxo-4-thia-4-oxobicyclo[5.1.0]octanes: X-ray crystallography, dynamic  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy

---

troscopy study / V.V. Gavrilov, M.N. Shamsutdinov, O.N. Kataeva et al. // *Journal of Molecular Structure* – 2008. – V. 888. – P.173-179.

3. Пространственное строение тетрапептида *n*Ac-Ser-Phe-Val-Gly-OMe по данным двумерной  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY ЯМР спектроскопии/ М.Н. Шамсутдинов, А.Р. Юльметов, А.В. Клочков и др. // *Ученые Записки Казанского Государственного Университета*. - 2008. - Т. 150, Серия Естеств. науки, книга 1. - С.76-86.

4. Изучение структуры тетразамещенных стереоизомеров р-третбутилтиакаликс[4]арена, содержащих морфолиновый фрагмент, методом 1D и 2D (NOESY) спектроскопии ЯМР/ Ф.Х. Каратаева, М.В. Резепова, М.Н. Шамсутдинов и др. // *Ученые Записки Казанского Государственного Университета*. - 2008. - Т. 150, Серия Естественные науки, книга 3. - С.40-53.

5. A spatial structure of tripeptides glycyglycyl-L-histidine and glycyglycyl-L-tyrosine based on residual dipolar couplings and quantum-chemical computations / V.V. Klochkov, A.V. Klochkov, M.N. Schamsutdinov et al. // *Mendeleev Communications*. - 2011 - Vol.21, № 2. - P. 72-74.

6. Динамическая и двумерная спектроскопия ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  4,4-пентаметиленгетеробифенно[5.1.0]октанов / М.Н.Шамсутдинов, В.В. Гаврилов, Р.М. Вафина и др. // *Новости ЯМР в письмах*. Изд-во: Полиграфический комплекс физического факультета. Казань, КГУ. - 2007. – № 1-4. - С.1843-1852.

7. Lyotropic liquid crystalline systems and NMR dipolar couplings for the spatial structure determination of oligopeptides / V.V. Klochkov, A.R. Julmetov, M.N. Schamsutdinov, A.V. Klochkov // *Book of abstracts of International Symposium "EUROMAR 2008. Magnetic Resonance for the Future"*, St.Peterburg, Russia, 2008. - St.Peterburg, 2008. - P.76.

8. Двумерная NOESY ЯМР спектроскопия и лиотропные жидкокристаллические среды в исследованиях структуры относительно небольших органических соединений / В.В. Клочков, Т.А. Гадиев, М.Н. Шамсутдинов и др. // XII Всероссийская конференция "Структура и динамика молекулярных систем": Сборник статей. - Й-Ола, Казань, Уфа, Москва. - 2005. – Ч.1. - С.360-369.

9. Пространственное строение некоторых трипептидов в лиотропных средах, растворах и твердой фазе по данным ЯМР спектроскопии / А.В. Ключков, М.Н. Шамсутдинов, Б.К. Валсев и др. // XIII Всероссийская конференция "Структура и динамика молекулярных систем": Сборник статей. - Й-Ола, Казань, Уфа, Москва, РФ. - 2006. - Ч.1. - С.406-410.

10. 1М и 2М ЯМР спектроскопия для исследования пространственной структуры ряда гетероциклов / М.Н. Шамсутдинов, В.В. Гаврилов, Р.М. Вафина и др. // XIII Всероссийская конференция "Структура и динамика молекулярных систем": Сборник статей. - Й-Ола, Казань, Уфа, Москва, РФ. - 2006. - С.403-406.

11. Пространственная структура семичленных ацеталей витамина В-6 / А.С. Петухов, Б.И. Хайрутдинов, М.Н. Шамсутдинов и др. // Тезисы докл. IV Всероссийской конференции "Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях". Изд-во: Полиграф. комплекс физического факультета. Казань, КГУ. - Апрель, 4-7. 2005. - С.43.

12. Пространственное строение некоторых трипептидов в лиотропных средах, растворах и твердой фазе по данным ЯМР спектроскопии / А.В. Ключков, М.Н. Шамсутдинов, Б.К. Валеев и др. // Тезисы докладов XIII-ой Всероссийской конференции "Структура и динамика молекулярных систем". Й-Ола, Уфа, Казань, Москва, РФ. - 25 июня – 1 июля. 2006 г. – С.114.

13. 1М и 2М ЯМР спектроскопия для исследования пространственной структуры ряда гетероциклов / М.Н. Шамсутдинов, В.В. Гаврилов, Р.М. Вафина, В.В. Ключков // Тезисы докладов XIII-ой Всероссийской конференции "Структура и динамика молекулярных систем". Й-Ола, Уфа, Казань, Москва, РФ. - 25 июня – 1 июля. 2006 г. – С.280.

14. Остаточные константы диполь-дипольного взаимодействия в определении пространственного строения некоторых олигопептидов / А.В. Ключков, М.Н. Шамсутдинов, Б.К. Валеев и др. // Тезисы докладов IV-ой Международной конференции по новым технологиям и приложениям современных физико-химических методов для изучения окружающей среды. Ростов-на-Дону. - 18-22 сентября. 2007 г. – С.35.

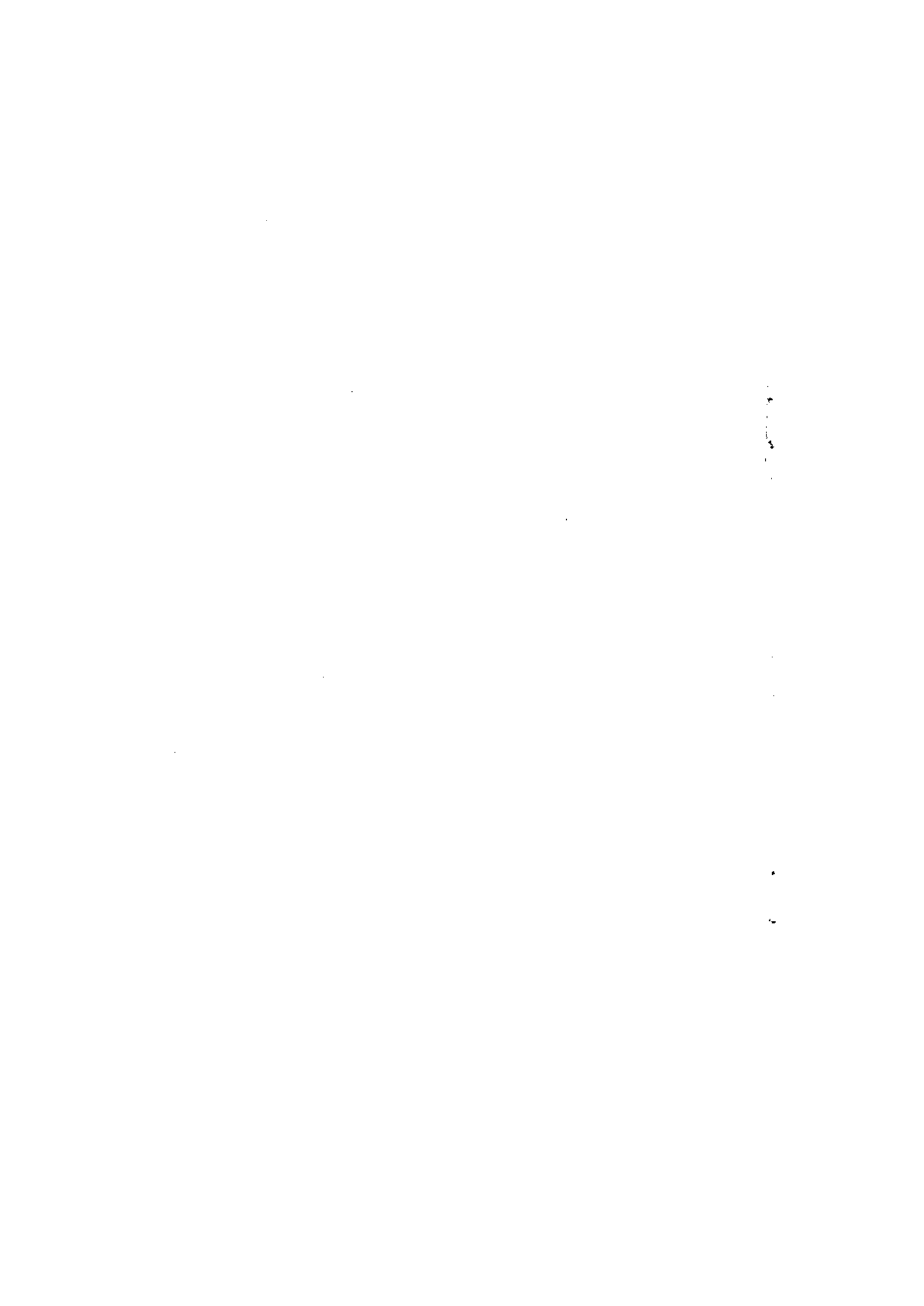




Подписано в печать 16.12.11  
Бумага офсетная. Печать ризографическая.  
Формат 60x84 1/16. Гарнитура «Times New Roman». Усл. печ. л. 1,5  
Уч.-изд. л. 0,8. Тираж 120 экз. Заказ 112/12

Отпечатано с готового оригинала-макета  
в типографии Издательства Казанского университета

420008, г. Казань, ул. Профессора Нухина, 1/37  
тел. 233-73-59, 292-65-60



---

•

•

•

•

•

•

•

12-856

2642A  
856