



УДК 547.92:542.91:543.422.25

СПЕКТРОСКОПИЯ ЯМР В ИЗУЧЕНИИ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ И ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ АНАЛОГОВ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ

© 2002 г. С. И. Селиванов[#], А. Г. Шавва*Химический факультет Санкт-Петербургского государственного университета, 198504, Санкт-Петербург, Старый Петергоф, Университетский просп., 26*

Поступила в редакцию 20.07.2001 г. Принята к печати 23.01.2002 г.

Особенности применения гомо- и гетероядерных корреляционных методов спектроскопии ЯМР в одном и двух измерениях для определения пространственной структуры и изучения внутримолекулярной подвижности модифицированных аналогов стероидных гормонов (МАСГ) и тактика их использования как для отнесения сигналов в высокопольной области спектров ^1H -ЯМР, так и для определения наиболее важных стереоспецифических параметров – вицинальных констант спин-спинового взаимодействия (КССВ) $^3J_{\text{H-H}}$ и ядерных эффектов Оверхаузера (ЯЭО) обсуждаются на примерах ЯМР-изучения структуры нескольких различных эстрогенов и андрогенов при 300 МГц и анализа литературных данных. Учет спектральных и релаксационных свойств МАСГ в жидкости, включая анизотропность общего диффузионного движения, позволяет в каждом случае определить наиболее эффективную комбинацию этих методов и отобрать необходимую модификацию каждого из них. Для МАСГ характерно широкое применение корреляций через дальние КССВ (COSY-45, DQF-COSY), использование значений $^4,5J_{\text{H-H}}$ для установления пространственной структуры и преимущество гетероядерных методов HSQC с развязкой и без развязки от ядер ^{13}C над соответствующими методами HMQC не только по разрешающей способности, но и по чувствительности. Для конформационно жестких МАСГ на оценку межпротонных расстояний посредством калибровочного метода обработки данных спектров NOE-difference и NOESY сильно влияет анизотропность общего диффузионного движения этих молекул в жидкости, приводящая в зависимости от соотношения между полярными углами эталонного и измеряемого расстояний как к заниженным, так и к завышенным значениям этих расстояний. Показана возможность появления при определенных условиях у конформационно мобильных МАСГ дополнительного вклада скалярного механизма релаксации между скалярно связанными протонами, который приводит к заниженным значениям наблюдаемых ЯЭО и соответствующим ошибкам в определении расстояний между ними.

Ключевые слова: андрогены; эстрогены; ЯМР; пространственная структура; косвенные спин-спиновые взаимодействия; ядерный эффект Оверхаузера (ЯЭО).

ВВЕДЕНИЕ

Модифицированные аналоги стероидных гормонов (как эстрогенов, так и андрогенов) широко используются в терапии целого ряда тяжелых заболеваний [1–3]. Исследование механизмов действия этих групп гормонов привело к появлению новых препаратов для лечения таких тяжелых болезней, как остеопороз, атеросклероз, ишемия и т.д. [4–8]. Терапевтические свойства применяемых препаратов во многом определяются конформацией стероидов в растворе. Поэтому одной из основных задач при целенаправленном синтезе

соединений данного класса и при установлении зависимости между их структурой и биологической активностью является определение особенностей их пространственного строения, включая получение информации о внутримолекулярной динамике. Среди методов, позволяющих успешно решать эту задачу, важное место занимает спектроскопия ЯМР, использование которой в конформационном анализе основано на стереоспецифичности констант спин-спинового взаимодействия (КССВ) [9–11] и высокой чувствительности ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) к межъядерным расстояниям [12]. Поэтому корректное определение значений КССВ и оценка межпротонных расстояний r_{ij} , наиболее существенных для установления конформации, являются целью изучения молекул в растворе методами ЯМР.

Эти параметры обычно используются в качестве исходных данных для молекулярного моделиро-

Сокращения: КМ – корреляционные методы; КССВ – константа спин-спинового взаимодействия; МАСГ – модифицированные аналоги стероидных гормонов; РСА – рентгеноструктурный анализ; ХС – химический сдвиг; ЯЭО – ядерный эффект Оверхаузера.

[#] Автор для переписки (тел.: (812) 428-43-25; факс: (812) 428-69-36; эл. почта: nmr@paloma.spbu.ru).

вания и наряду с результатами рентгеноструктурного анализа (РСА) служат основным источником информации об особенностях пространственного строения и внутримолекулярной динамики стероидных гормонов. Хотя подтверждение структуры стероидных гормонов может быть также получено на основании характеристичных ХС ядер ^{13}C [13–15] и значений прямых и дальних гетероядерных КССВ $^{1-3}J_{\text{C-H}}$ [10, 11], прямой подход связан с использованием спектроскопии ^1H -ЯМР и изучением прямых и косвенных гомоядерных диполь-дипольных взаимодействий.

Однако анализ протонных спектров МАСГ, как правило, существенно затруднен из-за перекрывания мультиплетных сигналов приблизительно двадцати алифатических протонов в узкой области спектра 0.8–2.5 м.д. Поскольку все же именно в этой области содержатся сведения о наиболее важных для установления конформации параметрах, – вицинальных КССВ и скоростях кросс-релаксации (ЯЭО) между протонами колец стероидной молекулы, необходимым предварительным условием успешного решения поставленной задачи является полное и однозначное отнесение всех сигналов в спектре ^1H -ЯМР с помощью комбинированного использования корреляционных методов (КМ) спектроскопии ЯМР в одном и двух измерениях [16–18].

Данная работа посвящена анализу проблем, связанных с использованием спектроскопии ЯМР для конформационного анализа МАСГ с учетом их специфических спектральных и релаксационных особенностей, и определению наиболее приемлемых для данного класса соединений путей их решения. Очевидно, что общая стратегия применения ЯМР, основанная на разделении различного рода взаимодействий с помощью импульсных последовательностей [18], едина для всех химических соединений и не зависит от их размера. Однако тактика использования конкретных методов анализа спектров сложных спиновых систем может зависеть от класса соединений, которые, в частности, могут отличаться по релаксационным характеристикам, непосредственно связанным с размером молекул [12].

В случае МАСГ, кроме указанного выше перекрывания сигналов в высокопольной области спектра ^1H -ЯМР, следует учитывать их молекулярную массу (300–400), наличие значительного числа спин-спиновых взаимодействий, включая дальние (через 4–7 связей), относительно короткие времена спин-решеточной релаксации (T_1) алифатических протонов (0.3–1.0 с) и протонированных ядер ^{13}C метиновых и метиленовых групп (0.4–1.5 с), значительную анизотропность диффузионного движения стероидных молекул [19–21] и, наконец, возможность быстрых (в шкале времени ЯМР) конформационных перестроек [22–25].

Следует также отметить, что многие КМ спектроскопии ЯМР были разработаны с учетом особенностей спектральных и релаксационных свойств макромолекул и их применение к “ма-

лым” молекулам, для которых время корреляции диффузионного движения τ_c и рабочая частота спектрометра ω_0 находятся в соотношении $\omega_0\tau_c \ll 1$, не всегда оказывается столь же эффективным. Более того, интерпретация результатов и методические рекомендации по использованию таких КМ могут оказываться противоположными для этих двух типов молекул. Поэтому в настоящей работе основное внимание уделяется тем отличительным методическим приемам использования ЯМР для установления конформации и изучения внутримолекулярной динамики МАСГ в растворе, которые наиболее типичны для этого класса соединений, учитывая литературные сведения и результаты ЯМР-исследований нескольких различных их представителей на частоте 300 МГц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

МАСГ содержат два основных сорта магнитных ядер: ^1H и ^{13}C . Поэтому вся необходимая информация, подтверждающая принадлежность изучаемой молекулы к конкретному стереохимическому ряду, может быть получена на основании анализа двух соответствующих спектров ЯМР с использованием характеристичных ХС отдельных сигналов. Так, например, принадлежность эстрогенов к 8-изоряду легко установить по величинам ХС ядер ^{13}C в положениях 1, 6, 8 и 14 [14] и протонов H1 и H18 (C13-CH₃) [26, 27]. Благодаря простоте такой эмпирический подход достаточно хорошо применим к наиболее изученным стереохимическим рядам и получил широкое распространение.

Развитие КМ спектроскопии ЯМР привело к появлению нового, более доказательного подхода, основанного на комбинированном использовании всех спектральных параметров стероидной молекулы и возможности последовательного отнесения всех сигналов в спектрах ^1H - и ^{13}C -ЯМР. Эти методы значительно упростили процедуру анализа перекрывающихся областей спектров стероидов [28–30] и позволили использовать спектрометры с относительно невысокой рабочей частотой (300 МГц). Одним из доказательств преимущества такого подхода может служить появление в последнее время работ, посвященных исключительно исправлению отнесений некоторых сигналов в спектрах ^1H - и ^{13}C -ЯМР известных соединений, сделанных ранее на основании эмпирических правил. Очевидно, что тактика использования КМ ЯМР зависит также от характера перекрывания сигналов, который может существенно отличаться даже для структурно близких стероидных молекул. Можно выделить два крайних случая: перекрывание сигналов протонов, входящих в разные спиновые подсистемы (например, алифатических протонов, находящихся в различных кольцах стероида), и протонов, принадлежащих к одной спиновой подсистеме. На практике чаще встречается комбинация этих вариантов.

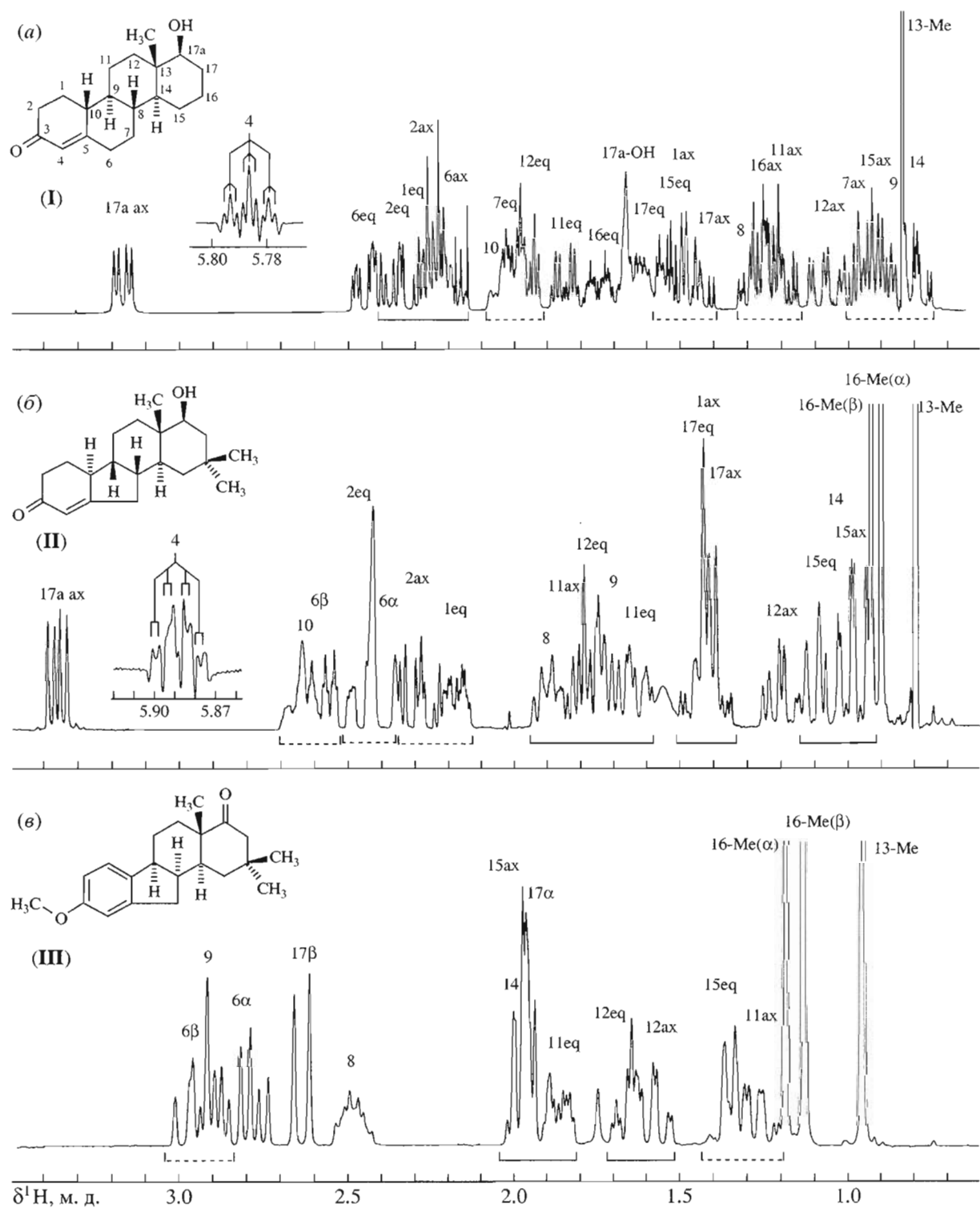


Рис. 1. Перекрытие сигналов в высокопольной области спектров $^1\text{H-NMR}$ соединений (I) (a), (II) (б) и (III) (в). Сильносвязанные группы сигналов показаны с помощью сплошных, а слабо связанные – пунктирных линий. Сигналы протона H4 в соединениях (I) и (II) получены с помощью процедур дополнительной предварительной обработки сигнала свободной индукции: дополнения нулями до 128 К и использования прямого линейного предсказания (CDCl_3 , 20°C).

В качестве примера на рис. 1 приведены высокопольные области спектров $^1\text{H-NMR}$ трех МАСГ с разделением на подспектры и полным отнесением сигналов. Видно, что в спектре *D*-го-

мо-19-нортестостерона (I) (рис. 1a) лишь в одном из подспектров (2.15–2.4 м.д.) наблюдается сильносвязанная система протонов $\text{H}_{2\text{eq}}$, $\text{H}_{1\text{eq}}$ и $\text{H}_{2\text{ax}}$, в то время как перекрывающиеся сигналы осталь-

ных протонов оказываются слабосвязанными и их мультиплетную структуру можно проанализировать по правилам, используемым для спектров первого порядка [31]. В то же время для 16,16-диметил-*D*-гомо-19,*B*-биснор-9,10-изотестостерона (II) и метилового эфира 16,16-диметил-*D*-гомо-*B*-нор-8-изоэстрогена (III), имеющих меньшее число алифатических протонов, таких сильносвязанных спиновых систем оказывается больше (см. рис. 1б и 1в).

Отнесение сигналов в спектрах ^1H -ЯМР

Удобной стартовой точкой при последовательном отнесении сигналов в протонном спектре модифицированных аналогов эстрогенов часто могут служить легко идентифицируемые сигналы протонов 18-метильной группы при C13 и протонов в ароматическом кольце A: H1 и H4, а при наличии ацетильной группы – протона при C17 (или при C17а для *D*-гомоаналогов). Хотя за исключением последнего эти протоны находятся через 4 связи от ближайших алифатических протонов (H12 α , H12 β для C13-CH₃; H9 для H1 и H6 α , H6 β для H4), в литературе неоднократно отмечалась возможность обнаружения малых (~0.5–1.2 Гц) КССВ $^4J_{\text{H-H}}$ между ними [32, 33]. Эти слабые взаимодействия могут быть использованы для идентификации сигналов H12 α (α), H9, H6 α и H6 β . Несмотря на небольшую величину указанных КССВ, эти корреляции обычно отчетливо проявляются в виде соответствующих кросс-пиков (18/12 α (α), 1/9, 4/6 α и 4/6 β) в обычных неоптимизированных на малую КССВ гомоядерных ^1H - ^1H корреляционных спектрах COSY-90, COSY-45 и DQF-COSY [34].

В спектрах гетероаналогов МАСГ появляются дополнительные слабопольные сигналы, которые легко идентифицируются на основании ХС и значительно упрощают процедуру отнесений в высокопольной области спектра таких молекул. Так, в случае 6-оксааналогов стероидных эстрогенов (см. (IV) и (VII)) сигналы протонов при C7 находятся в области 4.0–4.5 м.д., что позволяет легко определить положение сигнала протона H8, связанного с ними через вицинальные КССВ.

Аналогичным образом дальние спин-спиновые взаимодействия используются на начальной стадии отнесений сигналов в спектрах ^1H -ЯМР модифицированных аналогов андрогенов. Сигнал протона H4, находящийся в слабом поле (5.5–6.0 м.д.) и, как правило, проявляющий спин-спиновые взаимодействия с протонами H2 $_{\text{eq}}$, H6 α , H6 β и H10, может быть использован в качестве исходного. На рис. 1а и 1б показана мультиплетная структура сигнала протона H4 для соответственно стероидов (I) и (II), свидетельствующая о таких взаимодействиях с КССВ $^4J_{\text{H-H}}$ 0.5–2.5 Гц. Дальнейшая процедура установления схемы связывания между оставшимися алифатическими

протонами через геминальные и вицинальные гомоядерные КССВ обычно проводится с учетом гетероядерных корреляций через прямые ($^1J_{\text{C-H}}$) и дальние ($^{2,3}J_{\text{C-H}}$) спин-спиновые взаимодействия с помощью соответствующих методов: HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) [35] или HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) [36] и COLOC (COrelation spectroscopy via LOng range Coupling) [37] или HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation) [38]. Результаты отнесений проверяются с помощью наличия (или отсутствия) соответствующих кросс-пиков в спектре NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy) [39], которые позволяют одновременно сделать предварительные заключения о взаимном пространственном расположении протонов и их α - или β -ориентации.

Очевидно, что последовательность использования указанных гомо- и гетероядерных КМ зависит от степени связанности протонов, которая в неблагоприятных случаях приводит к слишком сложной структуре кросс-пиков вблизи диагонали двумерных гомоядерных спектров. В этом случае иногда удобнее вначале идентифицировать сигнал метинового протона H14, предварительно сделав отнесение сигнала углеродного атома C14 в спектре ^{13}C -ЯМР по кросс-пику C18/C14 в оптимизированном на ~8 Гц спектре COLOC, и затем найти положение сигнала H14 в спектре ^1H -ЯМР с помощью соответствующего кросс-пика в спектре HSQC (или HMQC).

Следует отметить, что тактика отнесений сигналов в протонном спектре с помощью полной предварительной идентификации сигналов в соответствующем спектре ^{13}C -ЯМР и использования корреляций через прямую гетероядерную КССВ $^1J_{\text{H-C}}$ также довольно широко представлена в литературе. Это объясняется относительной простотой отнесения в спектрах стероидных молекул ядер ^{13}C , имеющих протоны, на основе аддитивных схем расчета их ХС [13–15].

Кроме того, для уменьшения степени перекрытия сигналов в спектрах ^1H -ЯМР стероидов может быть использовано изменение условий регистрации путем смены растворителя или варьированием температуры и/или концентрации. Это часто приводит к небольшим изменениям химических сдвигов мультиплетных сигналов и соответствующему изменению степени связанности между взаимодействующими протонами. В результате спектральное представление перекрывающейся области может быть упрощено. Значительно более сильный эффект может быть достигнут с помощью использования “хиральных дериватизирующих реагентов”, которое было продемонстрировано недавно на примере упрощения спектра ^1H -ЯМР *цис*-андростерона [40].

Таким образом, наряду с другими методами использование корреляций через дальние гомо- и гетероядерные КССВ является удобным спосо-

бом идентификации сигналов в спектрах ^1H -ЯМР МАСГ.

Использование и определение гомоядерных и гетероядерных КССВ

Наиболее характерным для установления пространственной структуры МАСГ является использование зависимости вицинальной КССВ $^3J_{\text{H-H}}$ от торсионного угла (θ) [9]. Обычно экспериментальные значения $^3J_{\text{H-H}}^{\text{эксп}}$ сопоставляются с расчетными данными $^3J_{\text{H-H}}^{\text{расч}}$, полученными из зависимости $^3J_{\text{H-H}} = f(\theta)$ или ее модификаций [10–11, 41]. При этом значения торсионных углов $\theta^{\text{расч}}$ определяются в результате оптимизации конформации стероидной молекулы с помощью одного из методов молекулярного моделирования либо из данных РСА. Поскольку значения вицинальных КССВ используются, главным образом, для определения аксиальной или экваториальной ориентации кольцевых протонов на основе известного соотношения $^3J_{\text{ax-ax}} > ^3J_{\text{ax-eq}} \approx ^3J_{\text{eq-eq}}$, то отклонение экспериментальных данных от расчетных на 1.5–2.0 Гц считается удовлетворительным. Измерение же этих величин из спектров ^1H -ЯМР может быть сделано с более высокой точностью (± 0.1 Гц), что соответствует погрешности менее 1% для вицинальной КССВ между двумя диаксиальными протонами (~13.0–14.0 Гц). Точное измерение КССВ играет заметную роль при исследовании конформационных равновесий (см. ниже), поскольку в этом случае наблюдаемая константа $^3J_{\text{H-H}}^{\text{набл}}$ является усредненной по всем N -конформациям и ее величина отражает населенность каждой из них

$$P_i: ^3J_{\text{H-H}}^{\text{набл}} = \sum P_i ^3J_{\text{H-H}}^{(i)}$$

Значения дальних гомоядерных КССВ $^4,5J_{\text{H-H}}$ также используются в конформационном анализе стероидов. Их применение, прежде всего, связано с тем, что для систем простых связей W -типа между парой протонов наблюдаются значения КССВ до 2.5 Гц [32, 33]. Следовательно, обнаружение такого взаимодействия между двумя 1,3-протонами может служить доказательством их пространственной ориентации. Наличие двойной связи между парой протонов дает возможность по величине $^4J_{\text{H-H}}$ оценить ориентацию одного из них по отношению к плоскости $\text{C}=\text{C}$ -связи [42]. Так, в стероиде (I) КССВ $^4J_{\text{H-H}}$ между протоном H4 и ориентированными почти ортогонально плоскости 4,5-двойной связи протонами H10 и H6 β имеют соответственно значения 2.0 и 2.5 Гц, а с протоном H6 α , расположенным почти параллельно ей, – только 0.5 Гц. В результате в спектре ^1H -ЯМР этого соединения (рис. 1а) сигнал протона H4, имеющего еще одно (W -типа) спин-спиновое взаимодействие (~0.8 Гц) с экваториальным протоном H2 α ,

проявляется в виде триплета триплетов. В случае стероида (II) структура сигнала этого же протона (рис. 1б) свидетельствует о наличии трех приблизительно равных (~2.0–2.5 Гц) КССВ $^4J_{\text{H-H}}$ и одной КССВ с величиной ~0.8 Гц, что связано симметричным расположением протонов H6 α и H6 β по отношению к плоскости двойной связи в этой молекуле.

В работе [33], наряду с указанными закономерностями для дальних гомоядерных КССВ, были приведены примеры регистрации для МАСГ межпротонных спин-спиновых взаимодействий “через пространство” и сделана попытка объяснения этого эффекта. Очевидно, что возможность таких взаимодействий, которые ранее наблюдались только с участием ядер ^{19}F , свидетельствует о значительной напряженности стероидной структуры; следовательно, наряду с измерением ЯЭО, определение дальних КССВ для этого класса соединений может давать также информацию о пространственной сближенности двух протонов.

Прямые гетероядерные КССВ $^1J_{\text{C-H}}$ могут также быть использованы для определения аксиальной или экваториальной ориентации протонов метиленовой группы. В этом случае учитывается соотношение $^1J_{\text{C-Heq}} > ^1J_{\text{C-Hax}}$. Появившиеся недавно методы непрямого ^1H -регистрации гетероядерных корреляционных спектров НМQC [36] и HSQC [35], используемые в режиме отсутствия развязки от ядер ^{13}C , позволяют определять значения $^1J_{\text{C-H}}$ достаточно точно и с минимальными затратами времени. Указанный критерий особенно важен, если метиленовая группа изолирована, как, например, 17- CH_2 -группа в стероиде (III), и отсутствуют другие надежные критерии идентификации ее протонов. Но значительно чаще для конформационного анализа МАСГ используются дальние гетероядерные КССВ $^{2,3}J_{\text{C-H}}$ [43], для которых характерно соотношение $^3J_{\text{C-H}}^{\text{транс}} > ^3J_{\text{C-H}}^{\text{цис}} > ^2J_{\text{C-H}}$. При этом величина КССВ $^3J_{\text{C-H}}^{\text{транс}} \approx 7\text{--}10$ Гц, а $^3J_{\text{C-H}}^{\text{цис}} \approx ^2J_{\text{C-H}} \approx 2\text{--}4$ Гц [11]. Это позволяет при известном отнесении сигналов в спектре ^{13}C -ЯМР легко идентифицировать сигналы экваториальных протонов, которые имеют с *транс*-ориентированными ядрами ^{13}C примерно вдвое большие КССВ, чем другие протоны.

Поскольку способы регистрации гомо- и гетероядерных КССВ достаточно хорошо известны, рассмотрим подробнее лишь один наиболее существенный для МАСГ вопрос об относительной эффективности использования методов непрямого ^1H -регистрации гетероядерных корреляционных спектров НМQC и HSQC, которые известны прежде всего благодаря их более высокой чувствительности $\sim(\gamma^{\text{H}}/\gamma^{\text{C}})^3$ по сравнению с методами прямой ^{13}C -регистрации. Регистрация в инверс-

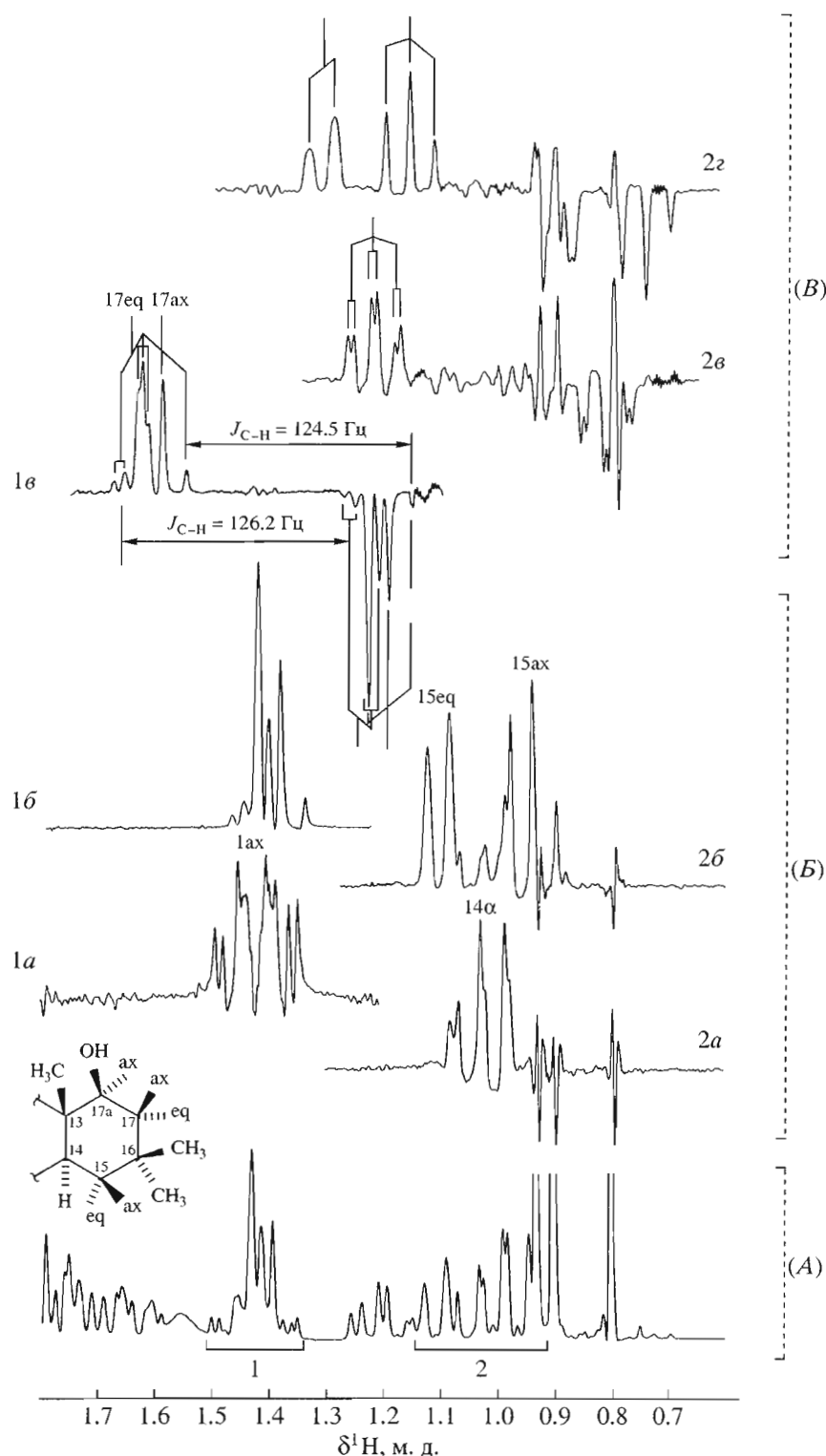


Рис. 2. Разложение двух перекрывающихся участков (1 и 2) в высокопольной области спектра ^1H -ЯМР соединения (II) (A) на подспектры (1a–1в и 2a–2z) с помощью ω_1 -разрезов в спектре HSQC с развязкой (B) и без развязки (B) от ядер ^{13}C (CDCl_3 , 20°C).

ных методах HMQC и HSQC проводится на ядрах ^1H и, благодаря более высокой разрешающей способности по координате ω_2 , они значительно превосходят методы прямой ^{13}C -регистрации и по

разрешающей способности протонных спектров, полученных из ω_1 -разрезов двумерных спектров HMQC и HSQC. Более того, поскольку ведется регистрация спутных (т.е. ^1H - ^{13}C) сигналов

ядер ^1H , появляется возможность упрощения сильносвязанных систем, присутствие которых в спектре ^1H -ЯМР характерно для большинства МАСТ. Для этого достаточно проводить регистрацию HMQC- или HSQC-спектров без развязки от ядер углерода-13 [44–46], что приводит к появлению дублетного расщепления кросс-пиков с противофазной ориентацией его компонент по координате ω_2 двумерного спектра и соответствующей двукратной потере его чувствительности. Однако такая потеря может быть частично компенсирована за счет устранения второго рефокусирующего периода, необходимость которого вызвана использованием развязки от ядер ^{13}C в исходных методах ^1H - ^{13}C HSQC и ^1H - ^{13}C HMQC. Это дает возможность сократить длительность импульсной последовательности ^1H - ^{13}C HSQC (или ^1H - ^{13}C HMQC) почти в 2 раза, что ведет к соответствующему уменьшению затухания поперечных компонент намагниченности, которые ответственны за амплитуду сигналов в результирующем спектре.

Для любых вариантов рассматриваемых методов непрямой регистрации характерны фазовые искажения мультиплетной структуры кросс-пиков. Они вызваны дополнительной модуляцией сигнала протон-протонными КССВ во время варьируемого периода t_1 . Следствие этого – появление дисперсной составляющей сигнала, которая не может быть компенсирована подстройкой фазы. Однако данный эффект значительно сильнее проявляется в спектре ^1H - ^{13}C HMQC, чем в ^1H - ^{13}C HSQC, поскольку в последнем из них модуляция протон-протонными КССВ компенсируется с помощью инвертирующего 180-градусного импульса, расположенного в середине варьируемого периода t_1 .

Недавно в работах [45, 46] показано, что введение в импульсную последовательность ^1H - ^{13}C HSQC дополнительных “spin-locking”-периодов приводит к практически полному исчезновению этого недостатка, в то время как для метода ^1H - ^{13}C HMQC не удается полностью устранить фазовые искажения кросс-пиков. Таким образом, сравнение двух гетероядерных КМ HMQC и HSQC по чувствительности и разрешающей способности [44] применительно к малым и средним молекулам показывает преимущество второго из них, тогда как для изучения макромолекул предпочтительнее метод HMQC.

На рис. 2 показан пример разложения двух перекрывающихся участков протонного спектра стероида (II) на основе метода HSQC с развязкой (Б) и без развязки (В) от ядер ^{13}C . В каждом из этих фрагментов содержатся сигналы от трех протонов: $\text{H}17_{\text{eq}}$, $\text{H}17_{\text{ax}}$, $\text{H}1_{\text{ax}}$ (участок 1) и $\text{H}15_{\text{eq}}$, $\text{H}14$ и $\text{H}15_{\text{ax}}$ (участок 2). Однако в первом из них только два геминальных протона при $\text{C}17$ образуют сильносвязанную систему, а во втором – все три протона, находящихся при соседних атомах $\text{C}14$ и $\text{C}15$, взаимодействуют между собой и дают

более сложную для интерпретации мультиплетную структуру линий. Тем не менее подспектры $1a-1b$ и $2a-2z$, полученные из ω_1 -разрезов при ХС соответствующих ядер ^{13}C для двух вариантов спектров HSQC позволяют легко проанализировать мультиплетность каждого из указанных сигналов, поскольку они имеют достаточно хорошее разрешение и в них практически отсутствуют фазовые искажения. Это в первую очередь относится к разрезам $1b$, $2b$ и $2z$ спектра ^1H - ^{13}C HSQC (Б), из которых с высокой точностью могут быть определены значения как гомоядерных, так и гетероядерных КССВ.

Среди гомоядерных корреляционных методов определения КССВ $^{2-5}J_{\text{H-H}}$ наилучшей разрешающей способностью обладают методы DQF-COSY и J-COSY (J-resolved COrrrelation Spectroscopy) [17]. Они чаще всего используются для анализа мультиплетной структуры перекрывающихся сигналов в спектрах ^1H -ЯМР МАСТ. Более редкое использование двухквантовой корреляционной спектроскопии DQ-COSY (Double Quantum COrrrelation Spectroscopy) [47] объясняется сложностью спиновых систем в молекулах МАСТ. Тем не менее в отдельных случаях разложение перекрывающейся области протонного спектра по двухквантовым частотам позволяет упростить сложный участок спектра и определить значение КССВ между парой взаимодействующих протонов, имеющих общую двухквантовую частоту.

На рис. 3 показан фрагмент DQ-COSY-спектра стероида (II) и определение КССВ между тремя парами протонов, сигналы которых перекрываются в области 2.1–2.7 м.д. (см. спектр б на рис. 1). Значения КССВ получаются с помощью измерения расстояния между противофазными компонентами мультиплетных сигналов, полученных из соответствующих ω_1 -разрезов кросс-пиков (1–3) этого двумерного спектра.

Применение ЯЭО и изучение конформационных равновесий

Измерение ЯЭО является одним из наиболее часто применяемых и эффективных способов решения задачи по установлению конформации МАСТ в растворе. Тактика использования результатов измерения нестационарных ЯЭО, полученных из двумерного (NOESY) или одномерного (NOE-difference) вариантов эксперимента [12], весьма разнообразна. Эти данные могут быть полезными как для подтверждения (или доказательства) отнесений в спектре ^1H -ЯМР, так и для анализа мультиплетной структуры сигналов, находящихся в перекрывающихся областях этого спектра. Но основное назначение экспериментов по измерению ЯЭО заключается в возможности получать качественную и количественную информацию о межпротонных расстояниях r_{ij} для конфор-

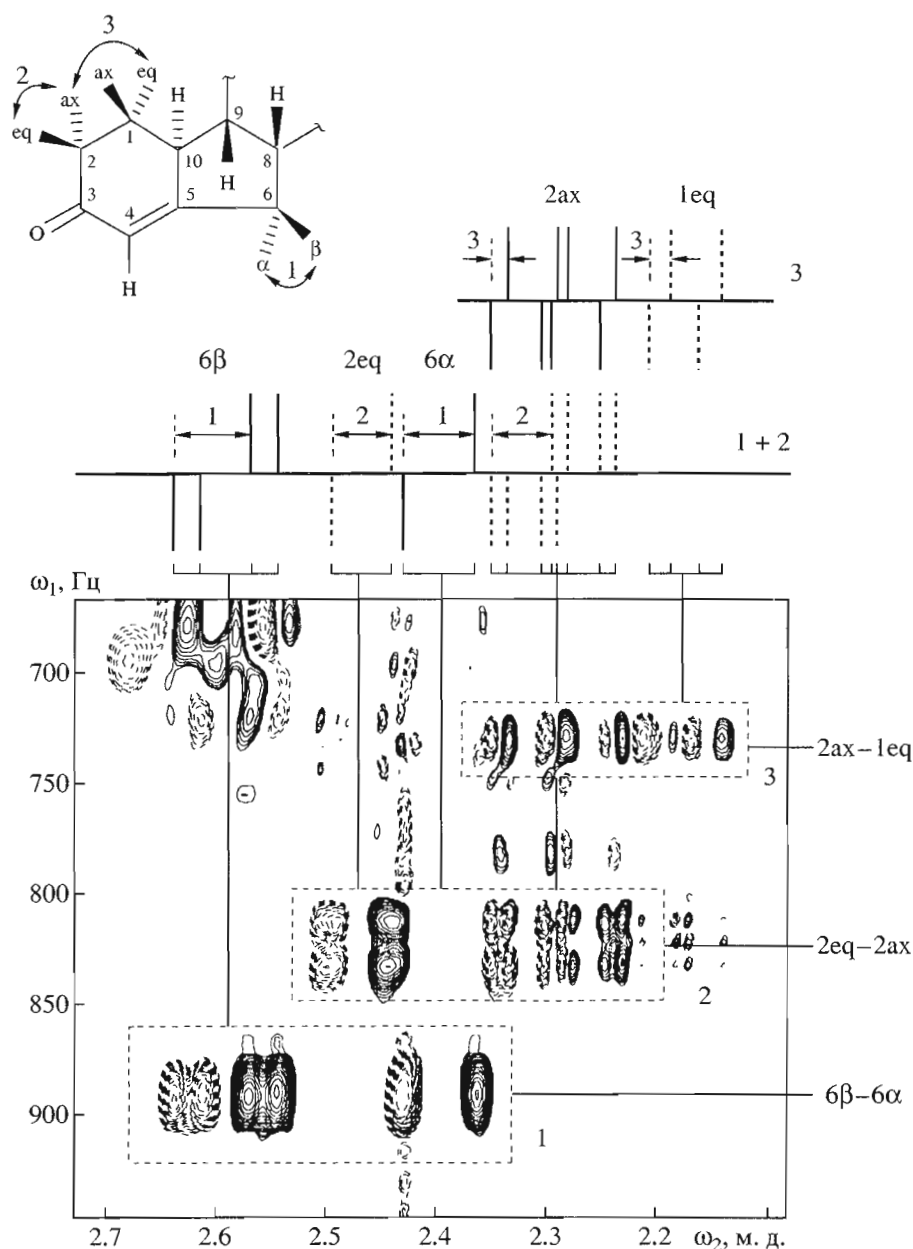


Рис. 3. Разложение перекрывающейся области спектра ^1H -ЯМР соединения (II) (рис. 1б) с помощью двухквантового гомоядерного (^1H - ^1H)-корреляционного спектра DQ-COSY, оптимизированного на КССВ 12.5 Гц. Положительные и отрицательные кросс-пики показаны соответственно сплошными и пунктирными линиями. Сверху схематично показаны ω_1 -разрезы по двухквантовым частотам: 1 – 6β – 6α , 2 – $2eq$ – $2ax$, 3 – $2ax$ – $1eq$, на которых стрелками указаны соответствующие активные КССВ (CDCl_3 , 20°C).

мационно жестких стероидных молекул, а также сведения о внутримолекулярной подвижности при наличии в них конформационных превращений.

Эти возможности определяются двумя основными факторами – сильной зависимостью скорости кросс-релаксации σ_{ij} от межпротонного расстояния r_{ij} : $\sigma_{ij} \sim (r_{ij})^{-6}$ и зависимостью σ_{ij} от эффективной скорости движения межпротонного вектора, определяемой как общим диффузионным движением молекулы в жидкости, так и внутримо-

лекулярной подвижностью ее фрагментов [12]. Поскольку МАСТГ, как правило, являются конформационно жесткими, наиболее часто используется первый из указанных факторов.

Такие работы можно условно разделить на две категории. К первой относятся те из них, в которых использование зависимости $\sigma_{ij} \sim (r_{ij})^{-6}$ проводится на качественном уровне. В этом случае все наблюдаемые ЯЭО разделяются по их величине на два (или три) сорта: сильные и слабые (или

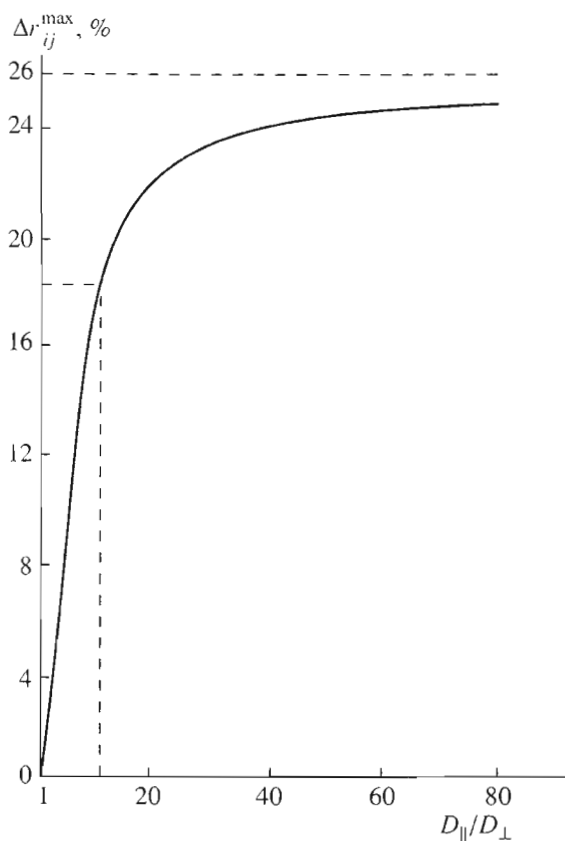


Рис. 4. График зависимости максимальной относительной погрешности при оценке межъядерных расстояний на основе калибровочного метода обработки данных измерений ЯЭО для аксиально-симметричных анизотропных молекул от отношения их диффузионных констант $D_{||}/D_{\perp}$.

сильные, средние и слабые). Затем проводится их сравнение с ожидаемыми ЯЭО, исходя из значений межпротонных расстояний в предполагаемой конформации стероидной молекулы, полученной на основании результатов РСА или полуэмпирических расчетных данных.

Ко второй категории работ следует отнести те, в которых делается количественная оценка межпротонных расстояний на основе так называемого калибровочного метода [48]. При его использовании не требуется определения времени корреляции τ_c^{ij} , которое характеризует подвижность межпротонного вектора r_{ij} в растворе: $\sigma_{ij} \sim \tau_c^{ij} (r_{ij})^{-6}$, поскольку одно из известных межпротонных расстояний используется в качестве эталона $r^{\text{эт}}$, а все другие определяются из соотношения: $r_{ij} = r^{\text{эт}} (\sigma^{\text{эт}}/\sigma_{ij})^{1/6}$. При этом предполагается, что времена корреляции τ_c^{ij} и $\tau_c^{\text{эт}}$ равны, что справедливо только для жесткой сферической молекулы [49]. Для анизотропных молекул это соотношение име-

ет более сложный вид: $r_{ij} = r^{\text{эт}} (\tau_c^{ij} \sigma^{\text{эт}}/\tau_c^{\text{эт}} \sigma_{ij})^{1/6}$. Нетрудно показать, что для аксиально симметричных молекул в случае, если радиус-вектор выбранного эталонного расстояния $r^{\text{эт}}$ ориентирован ортогонально главной оси инерции молекулы, а радиус-вектор измеряемого расстояния r_{ij} параллелен этой оси, то относительная ошибка определения r_{ij} , связанная с анизотропией диффузионного движения молекулы в жидкости, зависит от отношения диффузионных коэффициентов $D_{||}/D_{\perp}$ нелинейным образом и является максимальной для любых ориентаций указанных векторов. Это следует из известного соотношения Восснера [50, 51]: $\tau_c(\beta = 0^\circ)/\tau_c(\beta = 90^\circ) = 4A + 2/A + 5$, где $A = D_{||}/D_{\perp}$ и β – полярный угол.

На графике этой зависимости (рис. 4) видно, что максимальная относительная ошибка Δr_{ij}^{\max} даже для очень анизотропных молекул ($D_{||}/D_{\perp} \rightarrow \infty$) не может превосходить 26%, но она быстро растет при изменении параметра анизотропности от 1 до 10 и достигает ~18%. Следовательно, с учетом такого характера зависимости “анизотропного” вклада в точность определения межпротонных расстояний калибровочным методом их вычисление в случае МАСГ, для которых значения параметра анизотропии A нередко превышает 10, должно проводиться на основе второго анизотропного соотношения. Хотя этот эффект достаточно хорошо известен и учитывается при исследовании биологических макромолекул, для которых обычно параметр анизотропии A относительно невелик (~2–4) [52], применительно к малым молекулам, включая МАСГ, количественная оценка межпротонных расстояний проводится, как правило, без учета этого фактора.

На рис. 5 приведены результаты расчета межпротонных расстояний на основе измерения ЯЭО в спектре NOESY 17β-ацетокси-3-метокси-6-окса-8-изоэстра-1,3,5(10)-триена (IV) для сферической и аксиально-симметричной моделей в сопоставлении с данными РСА. В качестве эталонного было выбрано расстояние 1.77 Å между двумя геминальными протонами при C7. Значение полярного угла $\beta^{\text{эт}}$ составляло ~80°. Для расстояний, радиусы-векторы которых имели значительно меньшие полярные углы β_{ij} , сферическая модель (рис. 5а) дает более короткие значения расстояний по сравнению с данными РСА. В то же время учет анизотропии диффузионного движения (рис. 5б) позволяет на основе ЯЭО получать значения r_{ij} с относительной погрешностью не хуже ±5%. Необходимо отметить, что выбор эталонного расстояния с малым полярным углом $\beta^{\text{эт}}$ привел бы в соответствии со “сферической” моделью расчета к расстояниям, увеличенным по сравнению с данными РСА.

Сопоставление результатов ЯМР с данными РСА позволяет определить наличие локальной

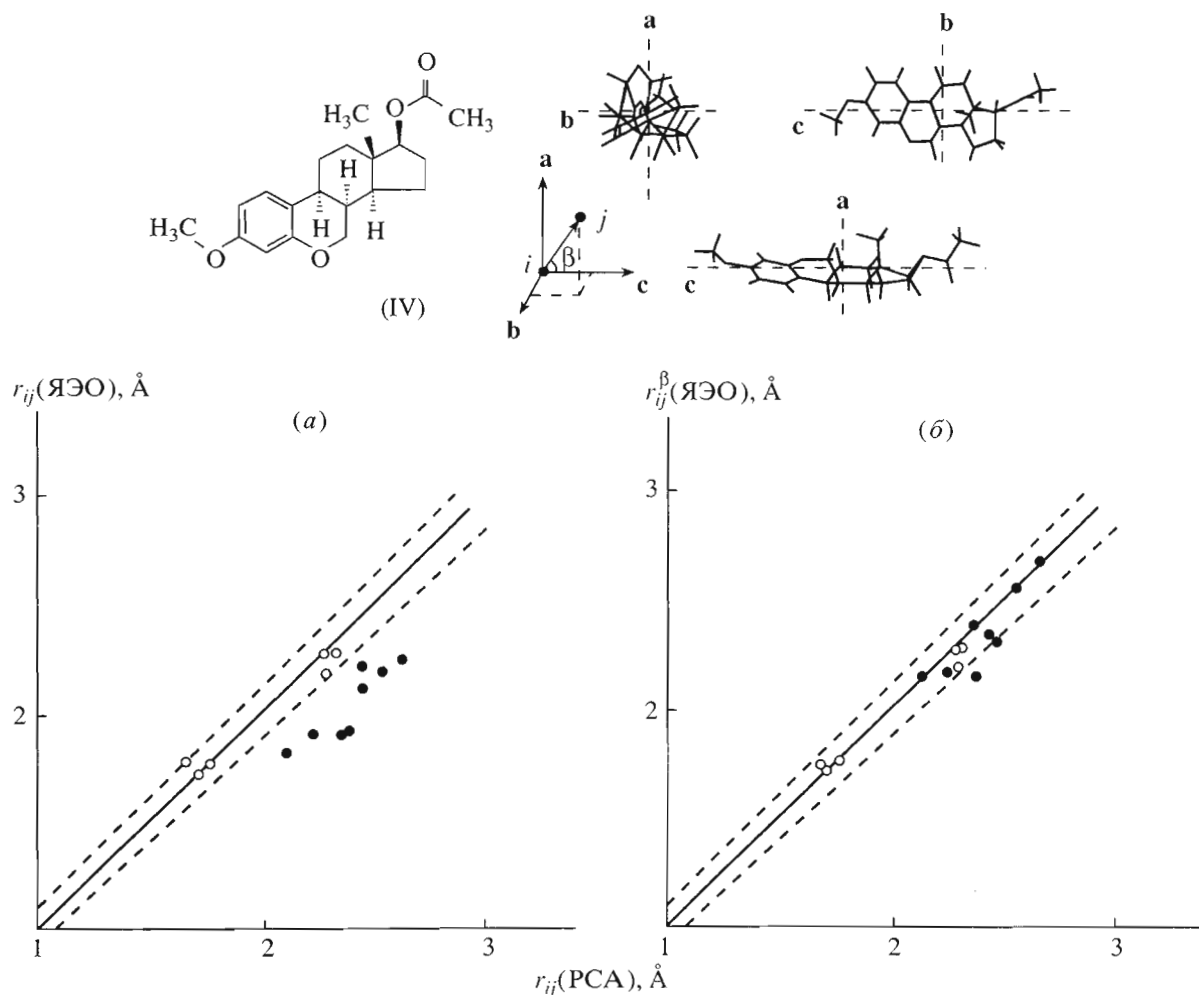


Рис. 5. Корреляция оценок межпротонных расстояний, полученных на основании калибровочного метода обработки данных спектра NOESY, с результатами РСА для конформационно жесткого стероида (IV): (а) – для сферической модели и (б) – для аксиально-симметричной модели. Пунктирные прямые соответствуют относительной погрешности $\pm 5\%$. Сверху показана пространственная структура молекулы стероида (IV) и система главных осей моментов инерции: **a**, **b**, **c**.

внутримолекулярной подвижности между отдельными фрагментами молекулы, которая, с одной стороны, приводит к уменьшению анизотропного вклада в скорость кросс-релаксации [50–52], а с другой – к усреднению наблюдаемого ЯЭО между двумя протонами, находящимися на разных расстояниях в каждой из конформаций молекулы. Следовательно, отличие межпротонных расстояний, полученных на основе ЯЭО в жидкости, от данных РСА для МАСГ может рассматриваться как свидетельство наличия в них внутренней подвижности только после учета анизотропного фактора. В противном случае интерпретация результатов является ошибочной.

В качестве примера такой некорректной интерпретации можно привести работу [53], в которой ее авторы объясняют завышенные расчетные значения некоторых межпротонных расстояний по отношению к данным РСА присутствием внутримолекулярной подвижности в изучаемой

стероидной молекуле, хотя эти значения были получены ими без учета анизотропии ее общего диффузионного движения в жидкости.

Следует отметить еще одну важную особенность количественных измерений межпротонных расстояний в МАСГ – влияние скалярных спин-спиновых взаимодействий на наблюдаемые ЯЭО между протонами, включенными в сильно связанные спиновые системы [12], что весьма характерно для этого класса соединений. Эффекты сильносвязанности могут приводить к дополнительным ошибкам как при отнесениях сигналов, так и при оценке межпротонных расстояний.

Внутримолекулярная динамика МАСГ может включать, прежде всего, подвижность в боковых цепях стероидной молекулы [24], а также конформационную перестройку, связанную с инверсией колец стероидного скелета [22, 23, 25]. Обычно в шкале времени ЯМР это быстрые процессы, которые могут быть зарегистрированы с

помощью изучения температурных зависимостей усредненных обменом спектральных или релаксационных параметров ЯМР, включая ЯЭО. Этот подход связан с предположением о различии в термодинамической устойчивости участвующих в обмене конформаций, в результате чего при варьировании температуры происходит изменение соотношения их населенностей и соответствующее изменение параметров ЯМР.

Среди многочисленных работ по регистрации и изучению методами динамического ЯМР конформационной мобильности МАСГ наиболее интересными являются те, которые посвящены внутримолекулярным превращениям, затрагивающим углеродный скелет этих молекул. Изучение специфической роли такого рода конформационных превращений в сложном процессе образования гормонрецепторного комплекса является одной из наиболее важных и одновременно наименее исследованных проблем в данной области. В настоящее время ведется поиск подходящих для этой цели МАСГ с двумя или несколькими равновесными конформациями, соизмеримыми по населенностям, и изучение факторов, влияющих на их термодинамические и кинетические параметры в растворе. Необходимо отметить, что если геометрические параметры отдельных конформеров достаточно точно могут быть вычислены с помощью известных полуэмпирических методов расчета, то достоверность предсказания соотношения конформеров в растворе остается слабым местом такого подхода. Поэтому экспериментальная проверка с помощью спектроскопии ЯМР является наиболее надежным инструментом получения информации о качественном и количественном составе изучаемых равновесных смесей конформеров.

В ряду немногочисленных примеров детально-го исследования конформационной мобильности МАСГ наиболее известны работы по изучению быстрой в шкале времени ЯМР инверсии кольца А в замещенных 4-ен-3-онах [22, 23]. Изучение конформационного состава проводилось на основе анализа температурной зависимости усредненных обменом одной геминальной ${}^2J(2\alpha, 2\beta)$ и двух вицинальных ${}^3J(1\alpha, 2\beta)$, ${}^3J(1\beta, 2\alpha)$ КССВ, которые оказались наиболее чувствительными параметрами спектра ${}^1\text{H}$ -ЯМР. Так, например, амплитуда изменения геминальной КССВ ${}^2J(2\alpha, 2\beta)$ при переходе от 1α -полукресло- к инвертированной 1α -ванна-конформации составляла всего 2 Гц (от -16.0 до -18.0 Гц), а для указанных вицинальных КССВ ~ 10 Гц (~ 14 Гц для диаксиальной ориентации и ~ 4 Гц для диэкваториальной). Это соответствует изменению торсионного угла относительно связи C2–C3 от ~ 50 до $\sim 20^\circ$. Повышение температуры приводило к уменьшению наблюдаемой КССВ ${}^3J(1\alpha, 2\beta)$ и к увеличению ${}^3J(1\beta, 2\alpha)$. Это свидетельствовало о том, что нормальная конформация энергетически предпочтительнее, так как указанное изменение КССВ соответствует возрас-

танию вклада инвертированной формы, в которой протоны 1α и 2β экваториальны, а 1β и 2α – аксиальны. Очевидно, что аксиально-экваториальные КССВ ${}^3J(1\alpha, 2\alpha)$ и ${}^3J(1\beta, 2\beta)$, значения которых невелики (3–5 Гц) и близки между собой в каждом из конформеров, наименее чувствительны к изменению равновесия.

Аналогичный подход был использован нами для изучения связанного с инверсией кольца А конформационного равновесия в этиловом эфире 19-нор-8,10-изотестостерона (V), который при температуре 20°C в растворе CDCl_3 существует в двух формах А и Б. На рис. 6а приведен фрагмент спектра ${}^1\text{H}$ -ЯМР этого стероида с аномальной мультиплетностью сигналов двух геминальных протонов 2α и 2β , для каждого из которых значения вицинальных КССВ с протонами 1α и 1β практически совпадают. Кроме того, наблюдается квартетная структура сигнала протона 10α с тремя одинаковыми вицинальными КССВ ~ 6.0 Гц, две из которых соответствуют спин-спиновым взаимодействиям с протонами при C1. Все эти факты свидетельствуют о том, что в растворе стероида (V) существует быстрое динамическое равновесие между двумя конформациями, имеющими приблизительно равные населенности.

Для сравнения на рис. 6б приведен фрагмент протонного спектра 16,16-диметил-*D*-гомо-19,19-биснор-8,10-изотестостерона (VI), существующего в растворе в одной конформации с аксиальными протонами 1β и 2α , для которой стереохимические параметры кольца А близки к параметрам тестостерона (V) в конформации Б. Поэтому значения вицинальных КССВ для тестостерона (VI) – ${}^3J(2\alpha, 1\beta) = 14.44$ Гц и ${}^3J(2\beta, 1\alpha) = 2.54$ Гц – были использованы для определения доли формы Б тестостерона (V), близкой к нему по пространственной структуре кольца А. При допущении, что значения КССВ между диаксиальными и диэкваториальными протонами при C1 и C2 для обоих сравниваемых стероидов одинаковы, можно получить следующие населенности каждого из конформеров стероида (V): 54% для А-формы и 46% для Б-формы. Этому соотношению конформеров соответствует наблюдаемое значение геминальной КССВ ${}^2J(2\alpha, 2\beta) = 16.44$ Гц и уменьшение дальнейшей КССВ ${}^4J(4, 2\beta)$ до величины ~ 0.4 Гц, сравнимой с шириной линии, тогда как в тестостероне (VI) эта константа равна 0.95 Гц. Повышение температуры до 50°C приводило к увеличению на $\sim 1\%$ доли формы Б и, следовательно, эта конформация тестостерона (V) менее устойчива в растворе.

Необходимо отметить, что, несмотря на возможность измерения КССВ с точностью не хуже ± 0.1 Гц (т.е. $\sim 1\%$ амплитуды ее изменения), точность оценок относительных населенностей форм ограничивается степенью достоверности выбранных для расчета значений КССВ, соответствующих каждой из форм. К сожалению, эти значения чаще всего не могут быть получены эксперимен-

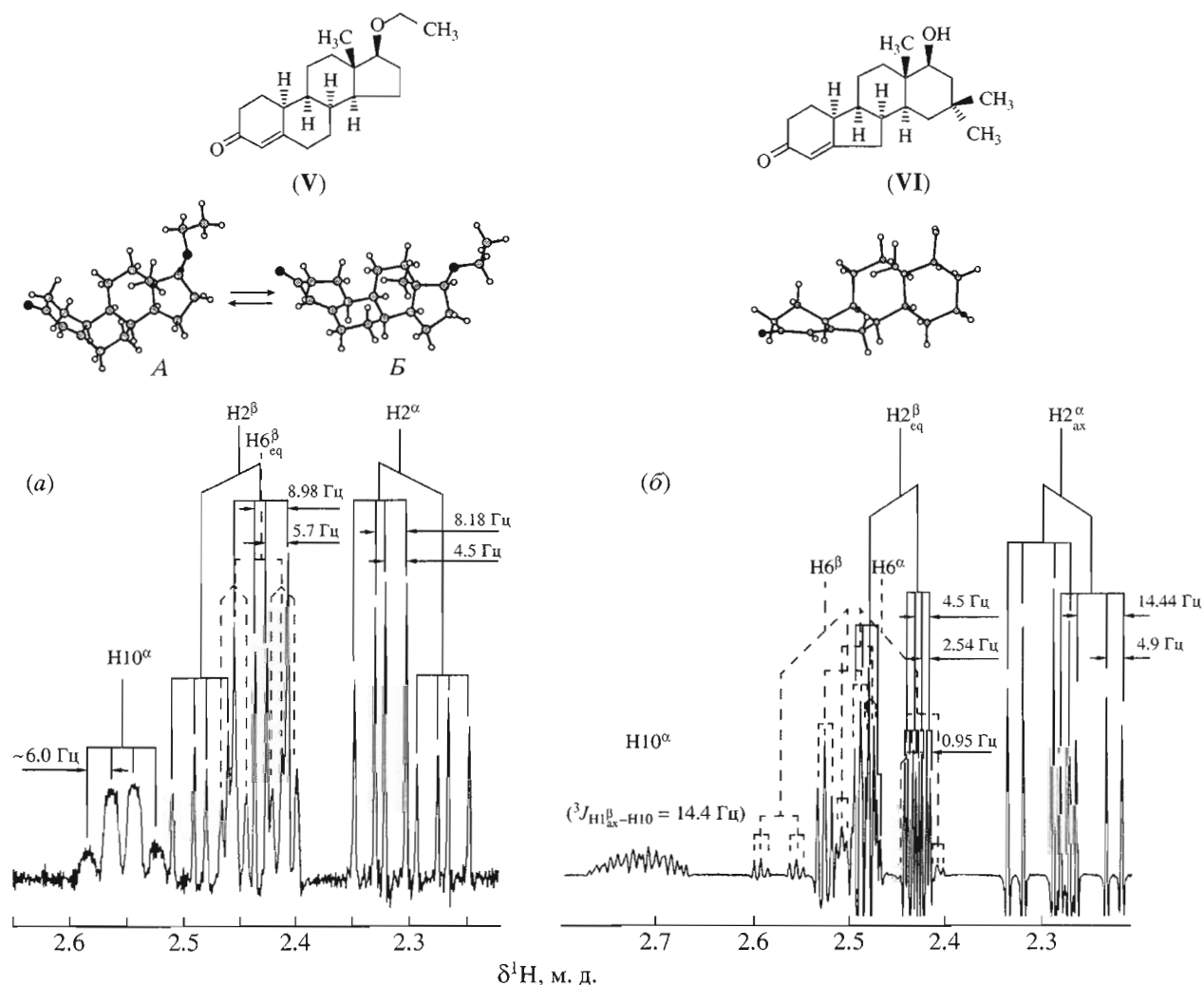


Рис. 6. Фрагменты спектров ¹H-ЯМР в CDCl₃ при 20°C мобильного стероида (V) (а) и жесткого стероида (VI) (б), содержащие сигналы протонов H2 и H10. Пунктиром показаны мультиплетные сигналы протонов при C6.

тально с помощью перехода в область медленно в шкале времени ЯМР обмена путем понижения температуры и/или использования спектрометров с более высокими рабочими частотами. Наиболее же точные методы расчета вицинальных КССВ [41] дают значительно худшие результаты: ±0.5–1.0 Гц (т.е. 5–10%).

Аналогичные трудности возникают и при использовании для этих целей значений химических сдвигов, усредненных обменом. Использование же измерений ЯЭО в данном случае осложнено не только нелинейным характером зависимости этого параметра от населенностей, но и появлением, в случае быстрого обмена между двумя конформациями, коррелированного характера движения межпротонных векторов r_{ij} , которое не учтено в классической теории релаксации и не отражено в хорошо известном выражении для скорости кросс-релаксации σ_{ij} через функции спектральной плотности $J_0(\omega)$ и $J_2(\omega)$ [49–51]. Кроме того, при быстром конформационном обмене между свя-

занными через скалярные взаимодействия протонами может появляться дополнительная модуляция локальных полей, вызванная флуктуацией величины КССВ между ними. Это приводит к увеличению вероятности нуль-квантовых переходов, которое связано только с разностью химических сдвигов рассматриваемых протонов и со скоростью обменного процесса [54]. Следствием этого явления будет уменьшение наблюдаемого ЯЭО между такими протонами или даже изменение его знака на противоположный.

На рис. 7 показан пример такого скалярного вклада в ЯЭО между протонами при C11 и C12 в условиях быстрого в шкале времени ЯМР конформационного превращения 17 α -ацетокси-7 α -метил-3-метокси-D-гомо-6-окса-8,14-изоэстра-1,3,5(10)-триена (VII), связанного с инверсией колец B, C и D. На графике приведена температурная зависимость отношения интегральных интенсивностей кросс- и диагональных пиков в спектре NOESY между вицинальными 12 α /11 β (I) и геми-

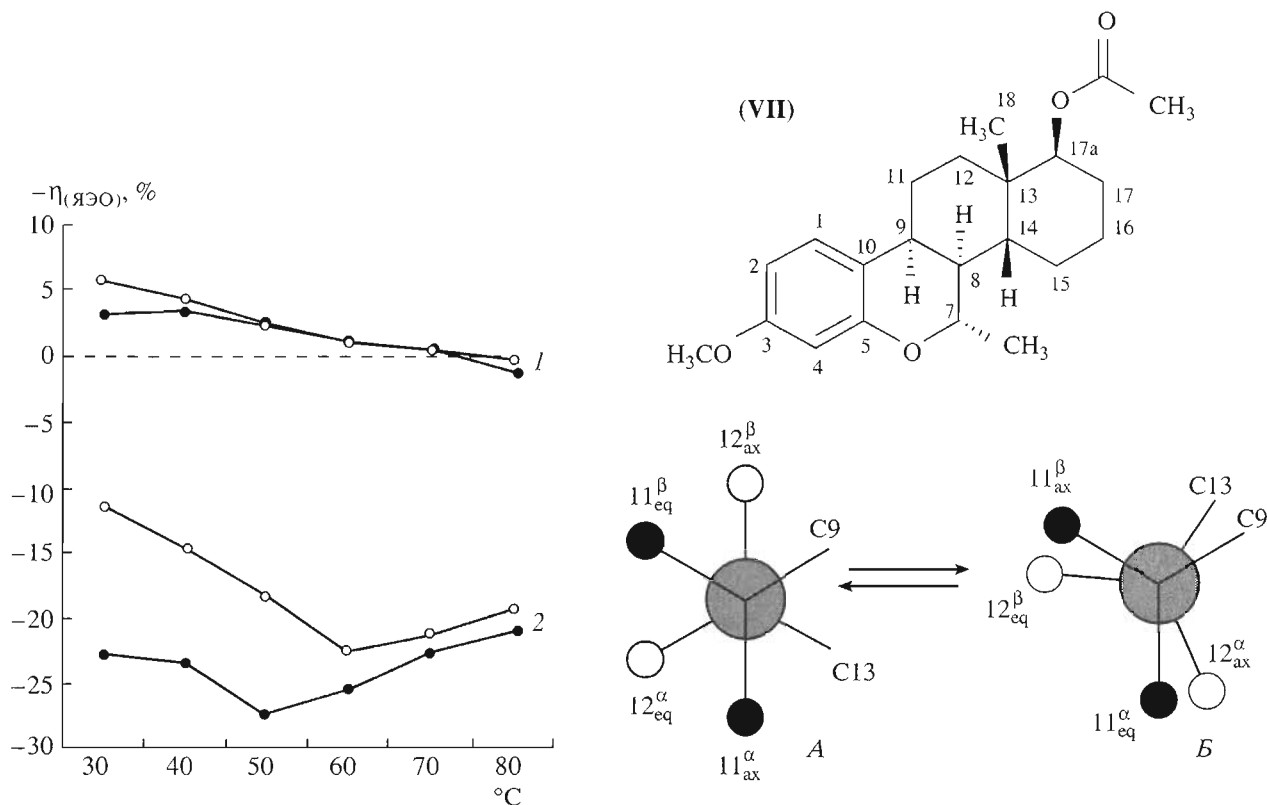


Рис. 7. Температурная зависимость отношения объемных интегралов кросс- и диагональных пиков S_{ij}/S_{ii} (светлые точки) и S_{ji}/S_{ii} (темные точки) в спектре NOESY ($\tau_m = 0.5$ с) между парами протонов: H11 β – H12 α (1) и H11 β – H12 β (2) в условиях быстрой в шкале времени ЯМР инверсии кольца C в конформационно мобильном стероиде (VII). Взаимная ориентация протонов при C11 и C12 в конформерах A и B показана с помощью ньютмановских проекций.

нальными 12 α /12 β (2) протонами кольца C, инверсия которого показана с помощью ньютмановских проекций. Соотношение форм A и B при температуре 30°C равно $\sim 2 : 1$. Протоны H12 α и H11 β в конформере A экваториальны, а в конформере B аксиальны. Следовательно, при переходе из одной конформации в другую амплитуда модуляции КССВ между ними составляет ~ 10 Гц. При соизмеримости скорости этого конформационного равновесия с разностью ХС между ними вклад скалярной модуляции становится преобладающим и в спектре NOESY наблюдаются положительные (синфазные с диагональными) кросс-пики, соответствующие отрицательному ЯЭО между рассматриваемыми протонами (кривые 1 на рис. 7). Этот скалярный механизм релаксации в данном случае полностью подавляет диполь-дипольный вклад, с которым связан ЯЭО, и в этих условиях информацию о расстояниях между протонами получить невозможно.

Не менее интересна температурная зависимость отношения интенсивностей кросс- и диагональных пиков между геминальными протонами при C12 (кривые 2 на рис. 7), КССВ между которыми при конформационном превращении практически не меняется. Тем не менее наблюдаемое

при повышении температуры от 30 до 60°C увеличение положительного ЯЭО между ними свидетельствует о наличии относительно небольшого скалярного вклада, который, по-видимому, связан со скалярной релаксацией второго рода, так как каждый из этих протонов имеет vicinalные КССВ с протонами при C11.

В отличие от рассмотренного выше конформационного равновесия в тестостероне (V) (рис. 6a) скорость конформационного перехода в стероиде (VII) значительно меньше и при температурах ниже -20°C в спектрах ^1H - и ^{13}C -ЯМР наблюдается разделение всех без исключения сигналов, соответствующих формам A и B. Это позволило в условиях медленного в шкале времени ЯМР обменного процесса получить информацию, необходимую для доказательства пространственного строения каждого из конформеров.

На рис. 8 приведены фрагмент спектра NOESY стероида (VII) при температуре -40°C (a) и область спектра ^1H -ЯМР (3.2–5.5 м.д.) при температурах от -40 до 50°C (б), которые свидетельствуют как о значительном различии пространственного строения конформеров A и B, так и о динамическом равновесии между ними. Это различие отражается, прежде всего, на значениях

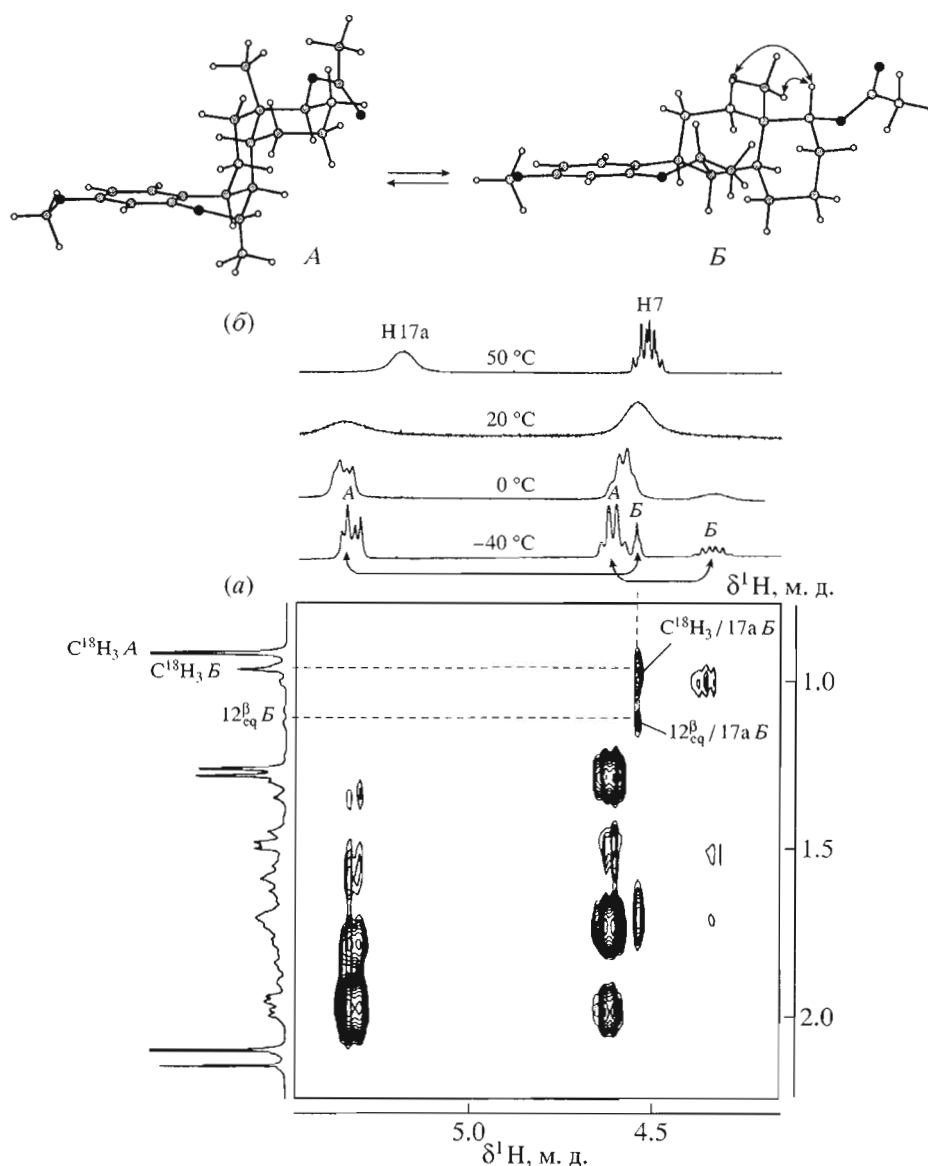


Рис. 8. Фрагмент NOESY-спектра конформационно мобильного стероида (VII) при -40°C в CDCl_3 в условиях медленного в шкале времени ЯМР обмена между двумя конформациями А и В (а) и фрагмент протонного спектра при различных температурах (б). Стрелками на пространственной структуре конформера В показаны ЯЭО, отмеченные в спектре NOESY (а).

КССВ и, следовательно, на мультиплетной структуре сигналов одинаковых протонов, находящихся в двух различных конформациях. Например, сравнение мультиплетности сигналов протона Н17а, свидетельствует о том, что в форме А он аксиальный, а в форме В экваториальный. Его пространственную ориентацию в этих формах подтверждают (см. рис. 8а) наличие ЯЭО с протонами CH_3 -группы при С13 для формы В и отсутствие такого эффекта для формы А. О конформационной перестройке в кольце В свидетельствуют КССВ 10.2 Гц между протонами Н7 β и Н8 α , находящимися в форме В в *транс*-ориентации, и только 2.0 Гц – для формы А. Ориентация протона Н7 β в кон-

формере В подтверждается ЯЭО с протонами Н18, тогда как в конформере А этот эффект отсутствует. Необходимо также отметить, что различие в ориентации протона Н9 α по отношению к плоскости ароматического кольца А в формах А и В стероида (VII) отражается на величине дальней КССВ ${}^4J_{\text{H}9\alpha, \text{H}1}$, которая для конформера А равна 1.1 Гц, а для конформера В отсутствует.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотренные примеры изучения пространственной структуры и внутримолекулярной динамики МАСГ (I)–(VII) на основе получения и ана-

лиза стереоспецифичных параметров спектров ^1H -ЯМР КССВ и ЯЭО свидетельствуют о том, что применение корреляционных методов спектроскопии ЯМР в одном и двух измерениях к данному классу соединений имеет ряд характерных отличий, которые связаны со спектральными и релаксационными особенностями этих молекул. Наличие в них сложной системы косвенных спин-спиновых взаимодействий, приводящее к значительному перекрыванию широких (до 50 Гц) мультиплетных сигналов в высокопольной области протонного спектра, позволяет с помощью комбинированного использования гомо- и гетероядерных КМ спектроскопии ЯМР достаточно легко устанавливать схему связывания и определять значения КССВ не только между геминальными и вицинальными протонами, но и протонами, разделенными друг от друга 4 и более связями. При определении межпротонных расстояний на основе измерения ЯЭО для этого класса соединений необходимо учитывать анизотропию их диффузионного движения в жидкости и вносить соответствующую поправку. При оценке достоверности результатов определения расстояний между скалярносвязанными протонами необходимо также учитывать и возможность вклада скалярного механизма релаксации в наблюдаемый между ними ядерный эффект Оверхаузера.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ^1H -ЯМР регистрировали при 20°C на спектрометре Bruker DPX-300 с рабочей частотой 300.13 МГц. Для регистрации использовали растворы 7–10 мг вещества в 0.6 мл CDCl_3 . Все корреляционные гомоядерные (COSY, DQF-COSY [34], DQ-COSY [47] и NOESY [39]) и гетероядерные (HSQC [35] с развязкой и без развязки от ядер ^{13}C) спектры получены в фазочувствительном режиме с помощью стандартных импульсных программ фирмы Bruker. Для измерения межпротонных расстояний в соединении (IV) были получены 8 спектров NOESY с временами смешивания $\tau_m = 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0$ и 1.2 с. При этом суммарная величина релаксационной задержки $D1$ и τ_m в каждом из них сохранялась постоянной: $D1 + \tau_m = 2.2$ с. Подавление вклада нуль-квантовых когерентностей в интенсивность кросс-пиков между скалярносвязанными протонами проводилось с помощью случайного варьирования длительности τ_m в пределах $\pm 10\%$ и усреднения 64 накоплений для каждого из 256 t_1 -инкрементов [18]. Обработка спектров NOESY и расчет r_{ij} для сферической модели проводились по методике, описанной в работе [48]. Поправка для аксиально-симметричной модели сделана при значении параметра анизотропии диффузионного движения $D_{\parallel}/D_{\perp} = 10 \pm 2$.

Авторы выражают благодарность за синтез соединений, рассмотренных в работе, М.С. Егорову ((I–III), (V), (VI)) и С.Б. Цогоевой ((IV), (VII)), а также Г.Л. Старовой за предоставленные данные по РСА соединения (VII).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Macgregor J.I., Jordan V.V. // *Pharmacol. Rev.* 1998. V. 50. P. 151–196.
2. Green S., Furr B. // *Endocrine-Related Cancer.* 1999. V. 6. P. 349–371.
3. Gambineri A., Pasquali R. // *J. Endocrinol. Invest.* 2000. V. 23. P. 196–214.
4. Labrie F., Luu-The V., Lin S.X., Simard J., Labrie C., Alfy M., Pelletier G., Belanger A. // *J. Mol. Endocrinol.* 2000. V. 5. P. 1–16.
5. Bulun S.E., Zeitoun K.M., Takayama K., Simpson E., Sasano H. // *TEM.* 2000. V. 11. P. 22–27.
6. Патент США № 5554601 (1996). // *C.A.* 1996. V. 125. 294029c.
7. PCT Int. Appl. WO 98/22113.
8. Purohit A., Woo L.W.L., Potter B.V.L., Reed M.J. // *Cancer Res.* 2000. V. 60. P. 3394–3396.
9. Gutowsky H.S., Karplus M., Grant D.M. // *J. Chem. Phys.* 1959. V. 31. P. 1278–1289.
10. Самютов Ю.Ю. Стереоспецифичность констант ядерного спин-спинового взаимодействия и конформационный анализ. Изд. Казанского ун-та, 1990.
11. Matsumory N., Kaneno D., Murata M., Nakamura H., Tashibana K. // *J. Org. Chem.* 1999. V. 64. P. 866–876.
12. Neuhaus D., Williamson M.P. *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis.* New York; Weinheim; Cambridge: VCH Publishers, Inc., 1989.
13. Wittstruck T.A., Williams K.I.H. // *J. Org. Chem.* 1973. V. 38. P. 1542–1548.
14. Terasava T., Yoshimura Y., Tori K. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* 1983. P. 903–908.
15. Batsanov A., Chen L., Gill G.B., Pattenden G. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* 1996. P. 45–55.
16. Ernst R.R. // *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 1992. V. 31. P. 805–830.
17. Eberstadt M., Gemmechker G., Mierke D.G., Kessler H. // *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 1995. V. 34. P. 1671–1695.
18. Ernst R.R., Bodenhausen G., Wokaun A. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions.* Oxford: Clarendon Press, 1987.
19. Fujiwara N., Da Y.-Z., Zheng D., Sasaki Y., Takai Y., Sawada M. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* 1990. P. 97–101.
20. Levy G.C., Kumar A., Wang D. // *J. Am. Chem. Soc.* 1983. V. 105. P. 7536–7540.
21. Quinn D.M. // *Biochemistry.* 1982. V. 21. P. 3548–3555.
22. Marat K., Templeton J.F., Kumar V.P.S. // *Magn. Reson. Chem.* 1987. V. 25. P. 25–30.
23. Sridharan R., Desai U.R., Rao R.M., Trivedi G.K. // *Steroids.* 1983. V. 58. P. 170–177.
24. Sebag A.B., Friel C.J., Hanson R.N., Forsyth D.A. // *J. Org. Chem.* 2000. V. 65. P. 7902–7919.
25. Schonecker B., Lange C., Kotteritzsch M., Gunther W., Weston J., Anders E., Gorls H. // *J. Org. Chem.* 2000. V. 65. P. 5487–5497.
26. Ruter C., Schroder E., Gibian A. // *Ziebig's Ann. Chem.* 1967. Bd. 705. S. 211–226.

27. Stein R.P., Buzby G.C., Smith H. // *Tetrahedron*. 1970. V. 26. P. 1917–1933.
28. Hayamizu K., Ishii T., Yanagisawa M., Kamo O. // *Magn. Reson. Chem.* 1990. V. 28. P. 250–256.
29. Zeng B., Pollack R., Summers M.F. // *J. Org. Chem.* 1990. V. 55. P. 2534–2536.
30. Szedi Z., Forgo P., Sweet F. // *Steroids*. 1995. V. 60. P. 442–446.
31. Егоров М.С., Зорина А.Д., Балыкина Л.В., Селиванов С.И., Шавва А.Г. // *Вест. СПбГУ*. 2000. Сер. 4. Вып. 4. С. 99–105.
32. Platzner N., Goasdoue N., Dovoust D. // *Magn. Reson. Chem.* 1987. V. 25. P. 311–316.
33. Schröder H., Haslinger E. // *Magn. Reson. Chem.* 1994. V. 32. P. 12–15.
34. Rance M., Sorensen O.W., Bodenhausen G., Wagner C., Ernst R.R. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983. V. 117. P. 479–485.
35. Bodenhausen G., Ruben D.J. // *Chem. Phys. Lett.* 1980. V. 69. P. 185–189.
36. Bax A., Subramanian S. // *J. Magn. Res.* 1986. V. 67. P. 565–572.
37. Kessler H., Griesinger C., Zaboock J., Loosli H.R. // *J. Magn. Res.* 1984. V. 57. P. 331–336.
38. Bax A., Summers M.F. // *J. Am. Chem. Soc.* 1986. V. 108. P. 2093–2094.
39. Jeener J., Meier G.H., Bachman P., Ernst R.R. // *J. Chem. Phys.* 1979. V. 71. P. 4546–4553.
40. Латыпов Ш.К. Дизайн хиральных дериватизирующих реагентов для определения абсолютной конфигурации органических соединений методом ЯМР. Автореферат дис. на соискание ученой степени д-ра хим. наук. Казань: ИОФХ им А.Е. Арбузова КНЦ РАН, 1999. С. 17–18.
41. Imai K., Osawa E. // *Tetrahedron Lett.* 1989. V. 30. P. 4251–4254.
42. Barfield M., Dean A.M., Fallick C.J., Spear R.J., Sternhell S., Westerman P.W. // *J. Am. Chem. Soc.* 1975. V. 97. P. 1482–1485.
43. Waterhouse A.L. // *Magn. Reson. Chem.* 1989. V. 27. P. 37–43.
44. Reynolds W.F., McLean S., Tay L.-L., Yu M., Enriquez R.G., Estwick D.M., Pascoe K.O. // *Magn. Reson. Chem.* 1997. V. 35. P. 455–462.
45. Simova S., Sengstschmid H., Freeman R. // *J. Magn. Res.* 1997. V. 124. P. 104–111.
46. Simova S. // *Magn. Reson. Chem.* 1998. V. 36. P. 505–510.
47. Bodenhausen G. // *Multiple Quantum NMR. Progress in NMR Spectroscopy / Eds Emsley J.W., Feeney J., Sutcliffe G.* Oxford: Pergamon Press, 1982. V. 14. P. 137–173.
48. Andersen N.H., Eaton H.L., Lai X. // *Magn. Reson. Chem.* 1989. V. 27. P. 515–528.
49. Genest D., Simorre J.P. // *Magn. Reson. Chem.* 1990. V. 28. P. 21–24.
50. Woessner D.E. // *J. Chem. Phys.* 1962. V. 36. P. 1–4.
51. Woessner D.E. // *J. Chem. Phys.* 1962. V. 36. P. 647–654.
52. Withka J.M., Swaminathan S., Bolton P.H. // *J. Magn. Reson.* 1990. V. 89. P. 386–390.
53. Maes D., Cauteren M.V., Wyns L., Lisgarten J., Palmer R., Lisgarten D., Willem R., Biesemans M., Kayser F. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*. 1992. P. 2179–2185.
54. Balonga P.E. // *J. Magn. Res.* 1984. V. 59. P. 50–57.

An NMR Study of the Spatial Structure and Intramolecular Dynamics of Modified Analogues of Steroid Hormones

S. I. Selivanov[#] and A. G. Shavva

[#]Phone: +7 (812) 428-4325; fax: +7 (812) 428-6936; e-mail: nmr@paloma.spbu.ru

Chemical Faculty, St. Petersburg State University, Universitetskii pr. 26, Staryi Peterhof, St. Petersburg, 198504 Russia

Special features of the use of homo- and heteronuclear correlation methods of NMR in one and two dimensions for studying the spatial structure and intramolecular dynamics of modified analogues of steroid hormones (MASH) are considered. The application of these methods to the assignment of resonances in the high-field ¹H NMR region and to the determination of the most stereospecifically important parameters, such as the vicinal constants of spin–spin coupling (³J_{H–H}) and nuclear Overhauser effects (NOE), are discussed using the example of NMR studies of some estrogens and androgens at 300 MHz and on the basis of literature data. The most efficient combination of the methods and the necessary modification of each of them may be chosen considering the spectral and relaxation parameters of MASH in liquid medium, including the anisotropy of the overall diffusive motion. The characteristics of MASH are the wide use of correlations through long-range couplings (COSY-45 and DQF-COSY), the application of the ^{4,5}J_{H–H} constants for the determination of spatial structure, and the advantage of heteronuclear HSQC methods with and without ¹³C decoupling over the corresponding HMQC methods in both resolution and sensitivity. In the conformationally rigid MASH molecules, the anisotropy of the MASH diffusive motion in liquid adversely affects the determination of interproton distances by the calibrating processing method for the NOE difference and NOESY spectra: it results in both overestimated and underestimated distance values depending on the polar angle ratios of the reference and the determined distances. Under certain conditions, conformationally mobile MASH demonstrate the additional contribution of the scalar relaxation mechanism between the indirectly (scalarly) bound protons. This mechanism is responsible for the underestimated values of NOE and the corresponding errors in the distance determination. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: androgens, estrogens, indirect spin-spin coupling, NMR, nuclear Overhauser effect (NOE), spatial structure