

NMR spektroskopija ugljikohidrata

Novaković, Marko

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:027752>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2021-10-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Marko Novaković

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

NMR SPEKTROSKOPIJA UGLJIKOHIDRATA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za Organsku kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Đani Škalamera

Zagreb, 2020.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

10. srpnja 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

2. listopada 2020.

Mentor rada: [titula, ime i prezime mentora]

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Ugljikohidrati	1
1.2. Tehnike strukturne analize ugljikohidrata.....	2
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	5
2.1. Određivanje broja šećernih ostataka	5
2.2. Identifikacija šećernih ostataka	8
2.3. Određivanje anomerne konfiguracije	11
2.4. Konektivnost.....	12
2.5. Karplusova jednađba	16
2.6. Prisutnost ostalih skupina	18
2.7. Zaključak	19
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XXI

§ Sažetak

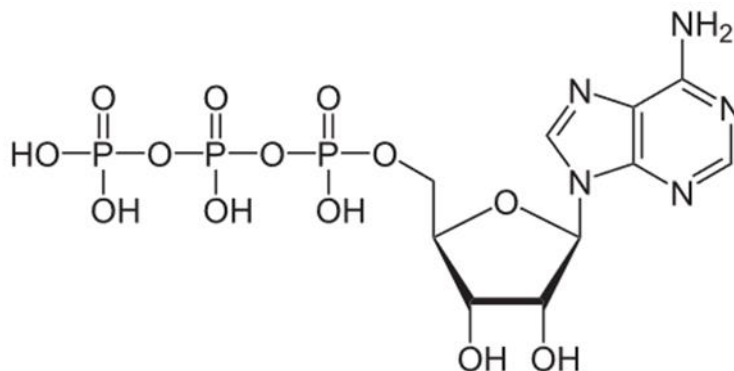
Ugljikohidrati često imaju iznimno važne uloge u biološkim procesima te je poznavanje i razumijevanje njihove strukture ključno kako bi se dobio potpuni uvid i u sami proces u kojem sudjeluju. Zanimljiva je činjenica da su upravo ugljikohidrati najslabije istraženi od triju glavnih biološki važnih skupina spojeva, u koje još ubrajamo proteine i nukleinske kiseline. Razlog tome je što analiza strukture ugljikohidrata pokazuje ipak određene poteškoće i prepreke. Njihova specifičnost je složena struktura zbog čega je njezino određivanje prilično zahtjevno i ograničeno na relativno mali broj metoda. Metoda koja je polučila uspjehe prilikom identifikacije strukture ugljikohidrata je NMR spektroskopija. U ovom radu su opisane mnoge mogućnosti koje nudi NMR spektroskopija prilikom određivanja strukture nekog ugljikohidrata.

§ 1. UVOD

1.1. Ugljikohidrati

Ugljikohidrati su spojevi ugljika, kisika i vodika. Nazvani su ugljikohidrati, tj. spojevi ugljika i vode jer se prema općoj formuli $C_m(H_2O)_n$ dobiva dojam da se radi o hidratima ugljika. Biološke su makromolekule koje se prema kompleksnosti strukture dijele na monosaharide, oligosaharide i polisaharide. Kompleksniji ugljikohidrati nastaju međusobnim povezivanjem jednostavnijih komponenata, monosaharida. Monosaharidi se mogu razlikovati u veličini i stereokemiji jednog ili više ugljikovih centara.¹ Međusobno se monosaharidi mogu povezati na mnogo različitih načina što, uz gore navedene razlike u njihovoj strukturi, rezultira iznimno velikim brojem ugljikohidrata koje nalazimo u prirodi. Dodatnu kompleksnost pružaju intermolekulske i intramolekulske vodikove veze koje mogu nastati zbog velikog broja hidroksilnih skupina u njihovoj strukturi, zatim mogućnost postojanja otvorenih lanaca i cikličkih struktura, kao i pojava mutarotacije prilikom prelaska jednog anomera u drugi.² Primjerice, u usporedbi s 4 dušične baze kod DNA i 20 amino kiselina kod proteina, kod bakterijskih polisaharida pronađeno je više od 100 različitih monosaharida i 50 ne ugljikohidratnih komponenata³ što je pokazatelj raznolikosti koju pronalazimo u kemiji ugljikohidrata.

Njihova uloga u organizmu nije jednoznačna već sudjeluju u nizu procesa koji se svakodnevno odvijaju i vrlo su važni za sam organizam. Ugljikohidrati primjerice, služe kao skladišni oblik energije (glikogen kod životinja i škrob kod biljaka), imaju strukturnu ulogu (hitin i celuloza), važna su komponenta mnogih koenzima (ATP, NAD) i nukleinskih kiselina (DNA, RNA). Također, nalaze se na vanjskim dijelovima membrana stanica gdje služe kao sredstvo prepoznavanja između stanica i za njihovu međusobnu komunikaciju. Navedene uloge samo pokazuju koliko je zapravo važno poznavanje točne strukture ugljikohidrata.



Slika 1. Struktura ATP-a čiji je sastavni dio saharid pentoza- D- riboza

1.2. Tehnike strukturne analize ugljikohidrata

Mnoštvo analitičkih tehnika može dati dobre rezultate u istraživanju strukture ugljikohidrata. Identifikacija nepoznatih struktura može se provesti koristeći na primjer metode kapilarne elektroforeze (engl. *Capillary electrophoresis*, CE), HPLC-a s fluorescentnim detekterom, i drugih, u kombinaciji s metodom masene spektrometrije (engl. *Mass spectrometry*, MS). Štoviše, masena spektrometrija se rapidno razvija, u kontekstu metode za određivanje strukture ugljikohidrata, zahvaljujući stalnim poboljšanjima instrumenata. Zanimljiva metoda koja se koristi za strukturnu identifikaciju glikoproteinskih oligosaharida bazira se na kombinaciji specifičnih hidrolaza i HPLC-a. Navedena tehnika može dovesti do potpunog opisa strukture željenih uzoraka.² No, krucijalan problem u rješavanju strukture koji opisane metode s današnjom metodologijom, prvenstveno masena spektrometrija, ne mogu riješiti je stereokemija šećera.⁴

Budući da se važnost stereokemije ne smije zanemariti potrebna je odgovarajuća metoda koja bez poteškoća može detektirati i ta svojstva nekog ugljikohidrata. Struktura ugljikohidrata može se riješiti difrakcijom na monokristalu. Ta metoda ima svoje prednosti, no njezini nedostaci se ne mogu zanemariti. Dobivanje čistog i dovoljno kvalitetnog monokristala često je dug i mukotrpan proces, koji uopće i ne mora dati željene rezultate, a adekvatni instrumenti nisu svima komercijalno dostupni. Uzimajući u obzir sve navedeno kao adekvatna metoda nameće se nuklearna magnetska rezonancija (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR). NMR se koristi u kombinaciji s primjerice masenom spektrometrijom, što zajedno nazivamo spektroskopska strukturna analiza. Navedena analiza koristi kombinaciju spektroskopskih i

spektrometrijskih tehnika u svrhu određivanja dvodimenzijске ili trodimenzijске strukture molekula.⁵

1.2.1. Nuklearna magnetna rezonancija

Nuklearna magnetna rezonancija je spektroskopska metoda koja se temelji na interakciji tvari i elektromagnetskog zračenja. Apsorpcijom zračenja jezgre u uzorku prelaze u pobuđeno stanje.⁵ Osim nuklearne magnetne rezonancije, među apsorpcijske metode ubrajamo i infracrvenu spektroskopiju (engl. *Infrared spectroscopy*, IR), elektronsku spektroskopiju (engl. *electron spectroscopy*, UV/VIS), itd. Spektroskopijom nuklearne magnetne rezonancije mogu se detektirati jezgre čiji je spin različit on nule, najčešće su to ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P itd. Zbog ranije navedene činjenice da se ugljikohidrati sastoje od ugljika, vodika i kisika, u svrhu određivanja strukture ugljikohidrata najviše se koriste ^1H i ^{13}C izvedbe. Apsorpcijom zračenja u radiovalnom području spektra dolazi do prijelaza između spinskih stanja, odnosno do prijelaza spinova elektrona i jezgre. Sam uređaj za snimanje NMR spektara nekog uzorka naziva se NMR spektrometar. Sastoji se od niza komponenata od kojih su neke od bitnijih supravodljivi magnet, NMR sonda s cjevčicom u koju se unosi uzorak, zavojnice i elektronika koja instrument povezuje sa računalom koje obrađuje sakupljene podatke.⁵ Postoje jednodimenzijске i dvodimenzijске NMR tehnike. Neke jednodimenzijске tehnike su ^1H NMR, ^{13}C NMR, APT, itd. Među dvodimenzijске tehnike ubrajamo COSY, NOESY, HMQC, itd.

Za razumijevanje NMR spektroskopije i pripadajućih rezultata (spektara) bitno je napomenuti nekoliko osnovnih parametara koji definiraju napomenutu metodu. Prvenstveno to je vrijeme relaksacije, odnosno vrijeme koje je potrebno spinovima da prijeđu iz pobuđenog stanja u osnovno.⁵ Interakcije spinova jezgara mogu se podijeliti na električne i magnetne. U ovome osvrtno od posebnog interesa su magnetne interakcije u koje ubrajamo kemijski pomak i spin-spin interakcije. Kemijski pomak se definira kao rezonantna frekvencija jezgre u odnosu na neki referentni uzorak, kada se nađe pod utjecajem vanjskog magnetnog polja. Koji uzorak se uzima kao referentni, ovisi o proučavanoj jezgri, otapalu, itd. Primjera radi, referentni uzorak ^1H NMR-a je TMS, tetrametil silan. Kemijski pomaci su često specifični za pojedine skupine ili fragmente u određenom kemijskom okruženju. Učinci koji najviše utječu na iznos kemijskog pomaka neke jezgre su lokalna elektronska gustoća i elektronegativnost susjednih skupina. Veća lokalna gustoća elektrona rezultirati će jačim zasjenjenjem, posljedično jezgra slabije

osjeća utjecaj vanjskog magnetnog polja, pa ima viši kemijski pomak. Skupine ili atomi s visokom elektronegativnošću smanjuju elektronsku gustoću oko promatrane jezgre. Takva jezgra je slabije zasjenjena i ima niži kemijski pomak. Spinovi dvaju pripadnih jezgara mogu interagirati na više načina. Spin-spin interakcije koje se odvijaju preko veznih elektrona, a još se nazivaju i skalarnе interakcije, opisane su konstantom sprege J , koja se izražava u Hercima (Hz). Konstanta sprege bit će jako zanimljiva prilikom razmatranja Karplusove jednadžbe. Sprezanje spinova jezgara rezultira simetričnim cijepanjem signala u spektru, iz čega možemo doći do vrlo važnih i detaljnih strukturnih informacija. Cijepanjem nastaje multiplet. Broj signala multiplета određuje se prema formuli $2nI + 1$, gdje je I spinski kvantni broj susjedne jezgre, a n broj susjednih jezgara.

Važno je kod razmatranja ove spektroskopske metode spomenuti nuklearni Overhauserov efekt (NOE). NOE efekt se uočava kao promjena u intenzitetu rezonancije određenog spina zbog promjene u ravnotežnoj napućenosti spinova druge jezgre ako su procesi povezani mehanizmom križne relaksacije.⁵

Analizom dobivenih spektara te navedenih pripadajućih parametara mogu se dobiti mnoge korisne informacije o primjerice udaljenostima atoma u molekuli, kutevima veza, kemijskoj okolini nekog atoma, itd., koje nam omogućuju točno i relativno brzo asigniranje strukture analiziranog uzorka. U rješavanju nepoznate strukture uvelike nam mogu pomoći i već postojeće baze podataka. Usporedbom eksperimentalno dobivenih podataka i rezultata s onima iz odgovarajuće baze podataka možemo se uistinu uvjeriti da se u danom uzorku nalazi točno određeni ugljikohidrat. Neke od poznatijih baza podataka su primjerice SUGABASE, CASPER⁴ i mnoge druge. Razvojem tehnologije sve više dolaze do izražaja računalima-potpomognute metode. Njihova najveća prednost je znatno skraćivanje vremena potrebnog za izvedbu kvalitativne i kvantitativne analize.

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Određivanje broja šećernih ostataka

Za početak vrlo je korisno odrediti od koliko se točno šećernih ostataka sastoji proučavani ugljikohidrat. Najjednostavnija metoda koja se nameće je jednodimenzionalni ^{13}C NMR. U kombinaciji s tom metodom korisno je i iskoristiti podatke dobivene iz ^1H spektra. Adekvatnom interpretacijom dobivenih podataka moguće je u većini slučajeva odrediti okviran broj ostataka nekog ugljikohidrata.

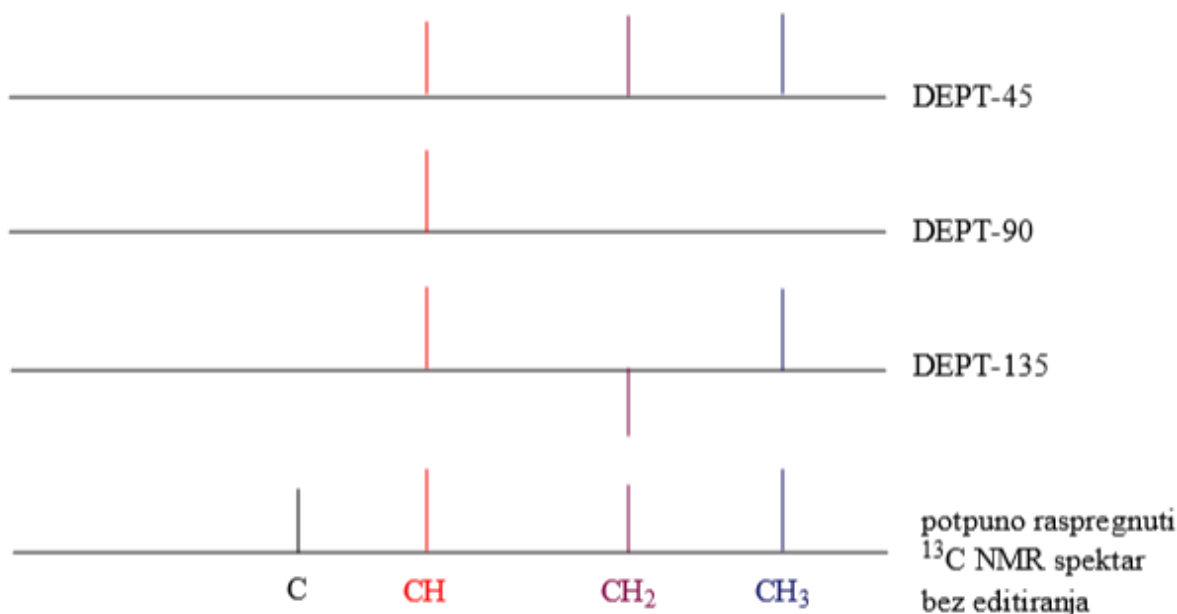
Problem korištenja navedenih metoda je mogućnost preklapanja signala, tako da efektivno ne bismo uočili točan broj signala. Preklapanje se događa zato što su svi signali dispergirani između određenih granica vrijednosti kemijskog pomaka. Naime, pomaci u ^{13}C spektru nalaziti će se između 60 ppm i 110 ppm,⁶ dok se signali ^1H spektra često nalaze između 3 ppm i 4,2 ppm za protone prstena šećernog ostatka kada se on nalazi u cikličkoj formi, te između 4,4 ppm i 5,5 ppm za anomerne protone.⁴ Kako bi se neželjeno preklapanje minimiziralo, koriste se 2D metode, poput ^{13}C - ^1H HSQC.

2.1.1. ^1H i ^{13}C NMR

^1H NMR tehnika omogućuje detekciju svih kemijski neekvivalentnih protona. Za protone kažemo da nisu kemijski ekvivalentni ako se ne nalaze u istom kemijskom okruženju. Analizom pripadnog spektra lako se može odrediti i točan broj takvih protona. Naime, on je proporcionalan omjeru površina ispod pojedinih signala.⁵ Signal koji u dobivenom spektru odgovara određenom protonu cijepa se na multiplet s $n+1$ linija, gdje n predstavlja broj protona s kojima je proučavani proton u sprezi. To saznanje može pomoći u otkrivanju kemijske okoline nekog protona. Nešto više o ovoj temi biti će rečeno u poglavlju koje govori o Karplusovoj jednadžbi.

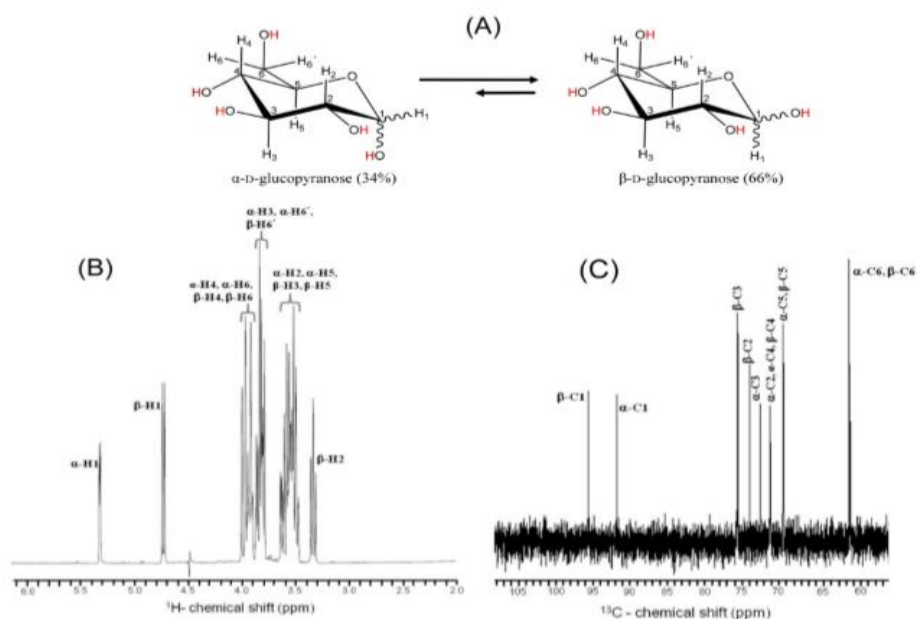
Zanimljiva metoda koja može pomoći u određivanju broja ugljikovih atoma je usporedba potpuno raspregnutog ^{13}C NMR spektra i spektara tehnika DEPT-45, DEPT-90 i DEPT-135. Naime, usporedbom navedenih spektara možemo utvrditi ne samo koliko ima ukupno

ugljkovih atoma u lancu već i kojeg su multipliciteta. Pod multiplicitetom se u ovom kontekstu želi reći zapravo koliko je vodikovih atoma vezano za taj ugljikov atom (kvaterni, terciarni, sekundarni, primarni ugljikov atom).



Slika 2. Shematski prikaz tehnika DEPT-45, DEPT-90, DEPT-135 i potpuno raspregnutog ^{13}C spektra ⁵

Iz prikaza na slici 2 jasno se vidi kako se kombinacijom više tehnika može elegantno utvrditi broj ugljikovih atoma.

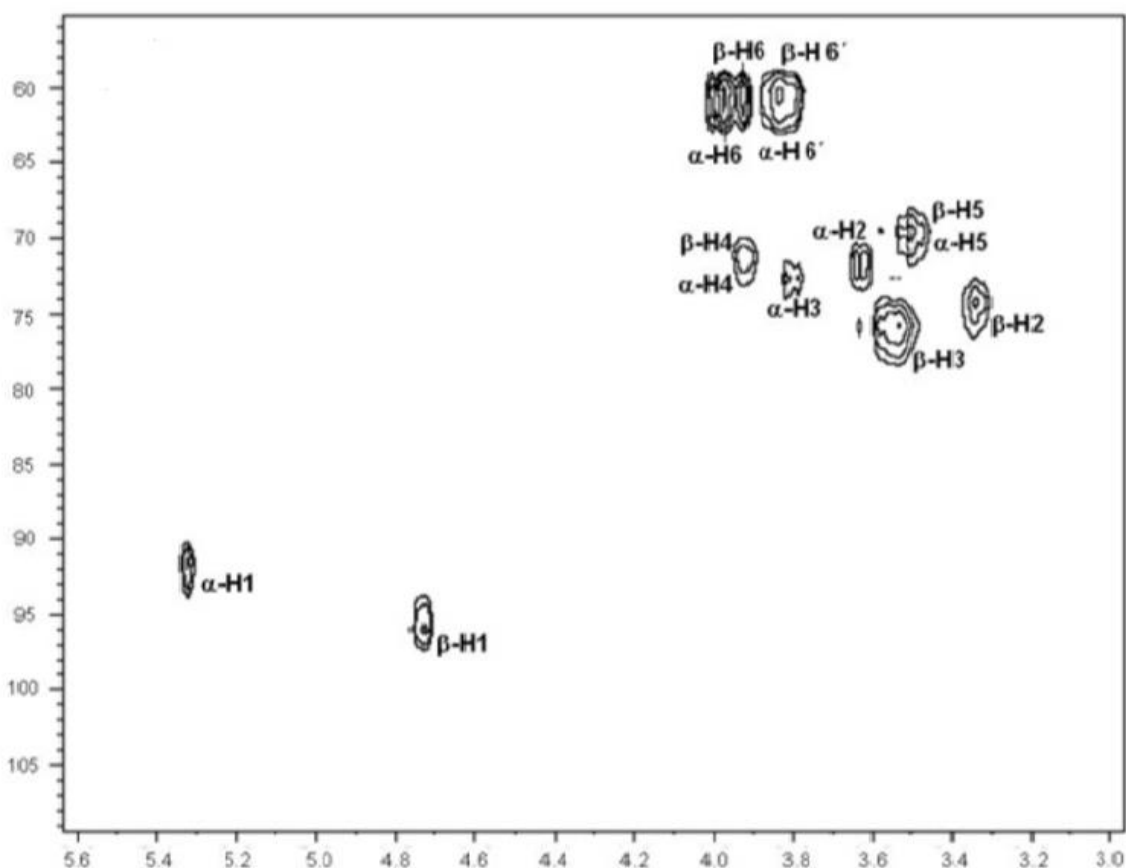


Slika 3. ^1H (B) i ^{13}C (C) spektri α - i β - anomera D-glukoze (A) ⁷

Spektri istaknuti na slici 3 zorno pokazuju prije napomenute činjenice poput, broj signala pokazuje broj kemijski neekvivalentnih jezgara, signal ^1H spektra cijepa se na multiplet s n+1 linija gdje je n broj protona koji okružuju proučavani proton. Kemijski pomaci anomernih protona poprimaju više vrijednosti u odnosu na ostale protone, analogno vrijedi i za anomerni C-atom. Također se može uočiti i relativno loša disperzija signala što nam može otežati strukturnu analizu.

2.1.2. ^1H - ^{13}C HSQC

Tehnika HSQC omogućuje detekciju sprege između protona i heterojezgri kroz jednu vezu,⁵ konkretno kod razmatrane metode radi se o ^{13}C jezgri. Takva sprega se naziva heteronuklearna jer se pojavljuje između dviju različitih jezgara.

Slika 4. HSQC spektar smjese anomera glukoze prikazanih na slici 3⁷

Na slici 4 prikazan je tipičan HSQC spektar smjese anomera glukoze. Na x-osi nalaze se ^1H kemijski pomaci dok se na y-osi nalaze ^{13}C kemijski pomaci. Ova dvodimenzijaska tehnika prikazuje koliko je zapravo protona vezano na određeni C-atom. Njezini rezultati se mogu iskoristiti i u svrhu strukturne analize, jer broj signala pokazuje ujedno i ukupan broj ugljikovih atoma prisutnih u uzorku.

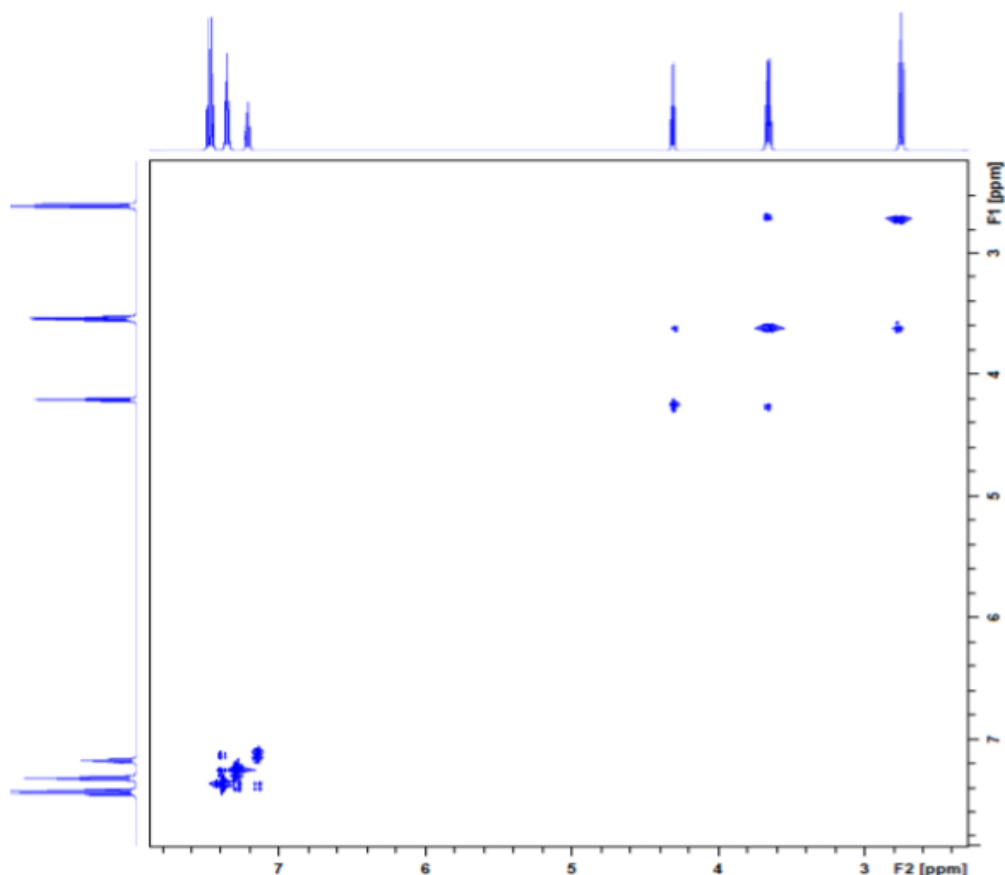
2.2. Identifikacija šećernih ostataka

Kada je utvrđen broj ostataka korisno bi bilo identificirati pojedine ostatke. U tu svrhu se mogu upotrijebiti spektri dobiveni homonuklearnim dvodimenzijaskim tehnikama COSY i TOCSY. Analizom rezultata iz navedenih spektara može se dobiti informacija o tome kako protoni međusobno utječu jedni na druge, gdje je interakcija opisana odgovarajućom konstantom sprege.

U kombinaciji s homonuklearnim tehnikama korištenje heteronuklearnih tehnika, poput već spomenute HSQC, omogućuje potpunu asignaciju svih kemijskih pomaka odgovarajućih jezgara. Jednom kada je asignacija izvršena, usporedbom s tabličnim vrijednostima vrlo lako se može donijeti zaključak o tome koji šećerni ostatci se nalaze u analiziranom ugljikohidratu.

2.2.1. COSY I TOCSY

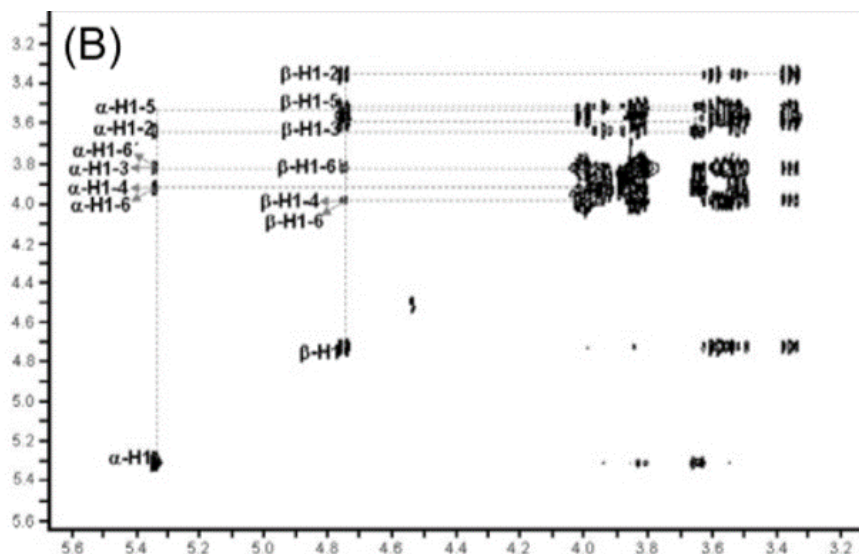
Tehnike COSY i TOCSY homonuklearne su dvodimenzijske tehnike koje se koriste za opis interakcija između protona nekog uzorka. COSY se smatra najpopularnijom dvodimenzijaskom homonuklearnom tehnikom. Opisuje međusobne interakcije spinova protona koji su udaljeni dvije ili tri kemijske veze. Dakle, protoni koji su u sprezi davati će signale u COSY spektru koji nam uvelike može pomoći u karakterizaciji neke molekule.



Slika 5. COSY spektar 2-feniletanola u DMSO. Na osima se nalaze odgovarajući ^1H NMR spektri ⁵

Na primjeru prikazanom na slici 5 vidljivo je kako signali koji nisu u dijagonalnom položaju odgovaraju protonima koji međusobno interagiraju preko spinova. Njihova interakcija se može i kvantificirati određivanjem odgovarajuće konstante sprege. Jednom kada su poznate konstante sprege, većina kemijskih pomaka dobivenih iz ^1H spektra mogu se asignirati. Tehnika TOCSY može potvrditi točnost asigancije provedene na temelju COSY spektra ili može pomoći u dodatnoj asignaciji u slučaju da COSY nije dao potpun rezultat jer primjerice neki signali nedostaju u COSY spektru ili su nejasni.

Za razliku od tehnike COSY koja opisuje korelacije samo između protona koji su u skalarnoj sprezi, tehnika TOCSY ne diskriminira, tj. daje uvid u korelacije svih protona nekog spinskog sustava neovisno nalaze li se u skalarnoj sprezi. TOCSY je tehnika veće osjetljivosti u usporedbi s tehnikom COSY, što je ujedno i njezina najveća prednost. Usporedbom spektara ovih dvaju tehnika mogu se identificirati dijelovi organskih molekula koji posjeduju protone sličnih kemijskih pomaka.⁵



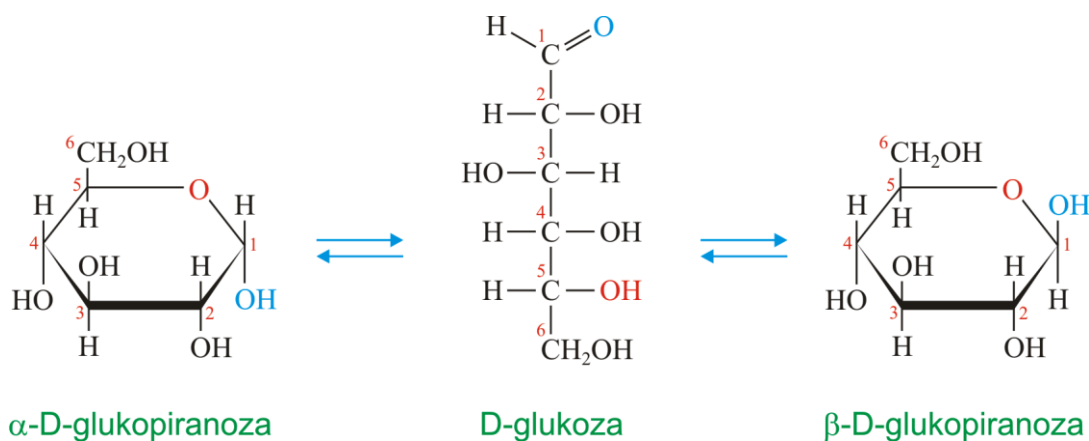
Slika 6. TOCSY spektar smjese anomera D-glukoze. Na osima se nalaze kemijski pomaci protona uzorka⁷

U konačnici, svi kemijski pomaci mogu se asignirati odgovarajućim ^1H jezgrama što uvelike može pomoći u daljnjoj identifikaciji ostalih strukturnih komponenata odgovarajućeg ugljikohidrata.

Nakon što se asigniraju svi kemijski pomaci protona, sljedeći korak je asignirati kemijske pomake odgovarajućim ^{13}C jezgrama. Poznate informacije dobivene iz COSY i TOCSY spektara u paru sa spektrom dvodimenzionalne heteronuklearne tehnike HSQC omogućuju takvu asignaciju. Budući da svaki signal u HSQC spektru odgovara protonima vezanim za ugljikov atom, a svim protonima je asigniran kemijski pomak, moguće je i svim ugljikovim atomima pridružiti odgovarajući kemijski pomak. Jednom kada su asignirani i svi kemijski pomaci ugljikovih atoma, dobiveni podaci mogu se usporediti s već poznatim parametrima za neke ugljikohidrate. Postoji niz baza podataka s takvim podacima koje su lako pristupačne. Na temelju asigniranih kemijskih pomaka i konstanti sprege, te usporedbom s poznatim podacima, moguće je utvrditi identitet pojedinačnih šećernih ostataka koji grade proučavani ugljikohidrat.

2.3. Određivanje anomerne konfiguracije

Anomeri su diastereizomeri nastali kao posljedica povezivanja ravnolančastog oblika monosaharida u cikličku strukturu. Ovi izomeri razlikuju se samo prema stereokemijskoj konfiguraciji na prvom asimetričnom C atomu koji prilikom izgradnje poluacetalata može imati hidroksilnu skupinu iznad ili ispod osnovne ravnine. Anomer se označava kao α ako je konfiguracija anomernog ugljika ista kao konfiguracija referentnog asimetričnog ugljika u Fischerovoj projekciji. Ako je konfiguracija različita označava se kao β .⁸



Slika 7. Prikaz anomera D-glukoze⁸

Podaci za kemijske pomake dobiveni iz ^1H i ^{13}C spektara, kao i konstante sprege između dvaju protona i između protona i ugljika, mogu uputiti na anomernu konfiguraciju pojedinog šećera. Na slici 3 gdje je prikazan ^1H NMR spektar jasno je vidljivo kako se kemijski pomak anomernog protona α anomera nalazi pri većem kemijskom pomaku u odnosu na anomerni proton β anomera. Valja napomenuti da se spomenuti fenomen uočava kod D-piranoza. Indikaciju o tome radi li se o α ili β anomeru dobivamo i iz vicinalnih konstanti sprege za anomerni H_1 i H_2 . Vicinalni su oni protoni koji se nalaze na susjednim ugljikovim atomima, odnosno udaljeni su međusobno tri veze. Povezanost vicinalne konstante sprege i prostornog položaja, koji je opisan torzijskim kutom, dvaju protona daje Karplusova jednadžba. Ona može dati indicaciju o prostornom rasporedu protona u slučaju da je poznata konstanta sprege između njih, tj. omogućava određivanje konfiguracije anomernog centra, no o njoj će više govora biti u jednom od kasnijih poglavlja.

Tablica 1. Ovisnost konstante sprege dvaju vicinalnih protona ($J_{1,2}$) o njihovom prostornom odnosu u piranoznoj strukturi⁴

Odnos u prostoru	$J_{1,2}$ / Hz	Anomerna konfiguracija
aksijalno-aksijalni	7-8	β
ekvatorijalno-aksijalni	4	α
aksijalno-ekvatorijalni	< 2	β
ekvatorijalno-ekvatorijalni	< 2	α

Važno je spomenuti kako se, gledano s lijeva na desno, prvi navedeni položaj odnosi na položaj anomernog protona. Aksijalan položaj anomernog protona odgovara β konfiguraciji. Ekvatorijalni položaj anomernog protona odgovara α anomeru. Osim konstante sprege između dvaju protona na susjednim ugljikovim atomima, konstanta sprege između anomernog protona i ugljika na kojem se nalazi također može ukazati na konfiguraciju anomera. Naime, kada konstante sprege iznosi $^1J_{C1,H1} \sim 170$ Hz to ukazuje na α anomernu konfiguraciju. Kada konstanta sprege iznosi $^1J_{C1,H1} \sim 160$ Hz radi se o β anomernoj konfiguraciji šećera. Ovakav odnos vrijedi za D šećere, dok je za L šećere obrnuto. Valja napomenuti da navedena opažanja vrijede za piranoze, dok za furanoze ne. Nedostatak ovakvog određivanja anomerne konfiguracije vidljiv je kod šećera koji nemaju proton vezan na anomerni ugljikov atom. U tom slučaju konfiguracija anomernog ugljikovog atoma može se odrediti primjerice iz konstanti sprege C2-H3 ili iz kemijskih pomaka protona H4 i H6.⁴

2.4. Konektivnost

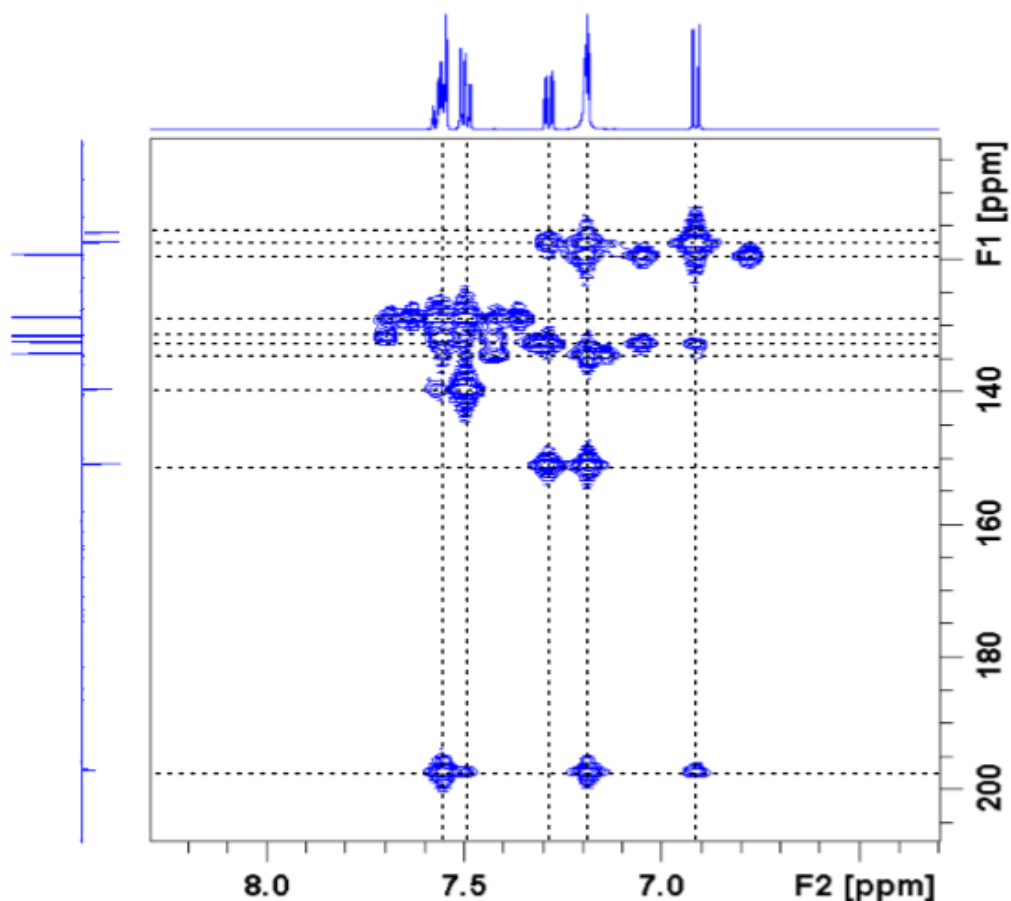
Najvažniji korak strukturne analize je točno odrediti redoslijed vezivanja šećernih ostataka u lancu. Točnost se mora naglasiti jer zamjena redoslijeda makar i samo dvije komponente rezultirati će drugačijim ugljikohidratom u odnosu na stvarnu strukturu. Uloga ugljikohidrata kao svojevrsnih receptora na stanici već je istaknuta u prijašnjim poglavljima. Ako se struktura ugljikohidrata koji služi kao receptor za vezanje nekog patogena, kao npr. bakterije *Salmonella enterica*, točno odredi moguće je na temelju iste detaljno proučiti mehanizam kojim dolazi do

zaraze što uvelike može pomoći u razumijevanju tijeka iste. Iz navedenog primjera jasno je istaknuta važnost točnog određivanja strukture ugljikohidrata.

Indikacija o tome gdje se nalazi glikozidna veza može se dobiti proučavanjem ^1H i ^{13}C kemijskih pomaka. Uočeno je da su kemijski pomaci na mjestima glikozilacije drugačiji u odnosu na kemijske pomake na susjednim položajima, tj. da su kemijski pomaci jezgara koje se nalaze na mjestu glikozilacije (supstitucije) drugačiji u odnosu na kemijske pomake istih jezgara kada supstitucije nema.⁴ Metode koje mogu dati bolje informacije o točnom položaju glikozidnih veza su HMBC i NOESY. HMBC detektira interakcije spinova kroz više kemijskih veza, a NOESY interakcije kroz prostor. Iz njihovih spektara vidljivo je kako položaj glikozidne veze utječe na kemijske pomake i konstante sprege odgovarajućih jezgara.

2.4.1. HMBC

HMBC je heteronuklearna dvodimenzijaska tehnika koja za razliku od HSQC tehnike daje uvid u korelacije protona i ugljikovih atoma udaljenih dvije, tri ili čak i četiri veze. Usporedbe radi, HSQC uzima u obzir korelacije jezgara udaljenih za jednu vezu. Zanimljivo je da se pomoću ove tehnike mogu opaziti interakcije protona s kvaternim ugljikovim atomima. Budući da HMBC može detektirati korelacije i kroz četiri veze, vrlo je korisna jer se analizom dobivenih spektara mogu povezati različiti spinski sustavi. Ako se utvrdi povezanost atoma koji nisu u istim spinskim sustavima, moguće je dobivene fragmente povezati u cjelinu.⁵



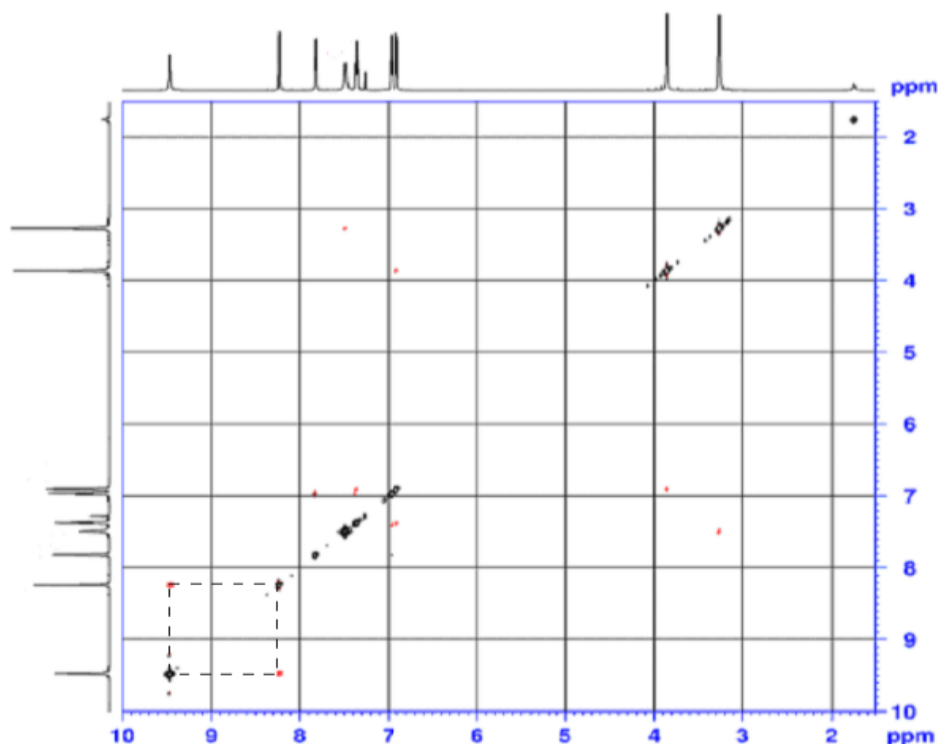
Slika 8. HMBC spektar 2-amino-5-klorbenzofenona snimljen u DMSO- d_6 . Na osima se nalaze odgovarajući ^1H i ^{13}C spektri⁵

Na primjeru prikazanom na slici 8 vidljivi su signali koji odgovaraju skalarnim interakcijama protona i ugljikovih atoma preko kemijskih veza. Valja napomenuti da su u HMBC spektru vidljive intra- i interrezidualne interakcije protona i ugljikovih atoma, no od posebne važnosti u ovom kontekstu su intra- rezidualne interakcije. HMBC je vrlo korisna metoda jer omogućuje uvid u interakcije protona i ugljika koje se odvijaju i preko ostalih heterojezgara poput dušika i kisika, što ovu tehniku čini izvrsnom za strukturnu karakterizaciju. To se svojstvo pokazuje i kod ugljikohidrata jer glikozidne veze sadrže atom kisika. U kombinaciji s potpuno asigniranim ^1H i ^{13}C spektrima iz HMBC spektra vrlo lako se može vidjeti kako je pozicionirana glikozidna veza jer će relevantni protoni i ugljikovi atomi davati signal koji označava međusobnu interakciju.

2.4.2. NOESY

Do sada razmatrane tehnike temelje se na skalarnom sprezanju. NOESY se za razliku od prije navedenih tehnika temelji na dipolnom sprezanju. Skalarno sprezanje već je spomenuto u prijašnjim poglavljima te se odnosi na indirektnu interakciju spinova kroz kemijske veze. Dipolno sprezanje uključuje interakciju dvaju spinova direktno preko prostora.⁵ U uvodu je spomenut Nuklearni Overhauserov efekt, NOE, čiji se učinci koriste u tehnici NOESY u svrhu strukturne analize. NOE može biti pozitivan, kada križna relaksacija rezultira povećanjem intenziteta signala, te negativan kada križna relaksacija rezultira smanjenjem intenziteta signala.⁵

NOESY je dvodimenzijska tehnika koja detektira spin-spin interakcije koje se odvijaju kroz prostor, a ne kroz kemijske veze. Omogućuje procjenu međusobne udaljenosti spinova koji su u interakciji. Osnovni uvjet koji mora biti ispunjen da bi dipolne interakcije dale signal u spektru je dovoljna prostorna blizina jezgara jer jačina NOE efekta ovisi o udaljenosti, njezinim porastom jačina efekta opada. U slučaju NOESY-a nuklearni Overhauserov efekt je pozitivan za molekule male molekulske mase, a negativan za molekule velikih molekulskih masa.⁵ Ugljikohidrati mogu biti razno veličina tako da nema smisla generalizirati hoće li NOE efekt biti pozitivan ili negativan.



Slika 9. NOESY spektar 2-metoksibenzaldehid-4-metiltiosemikarbazona snimljen u deuteriranom kloroformu. Na osima se nalaze odgovarajući ^1H spektri⁵

Budući da NOESY spektar prikazuje signale koji potječu od prostornih interakcija dvaju jezgara, protoni koji interagiraju a ne nalaze se u istom spinskom sustavu ukazuju na položaj glikozidne veze. Takav princip može se primijeniti na cijelu strukturu danog ugljikohidrata. U kombinaciji s NOESY spektrom važno je imati i pripadajući ^1H spektar koji je prethodno asigniran, isto kao i kod korištenja HMBC tehnike. Kada su položaji glikozidnih veza moguće je definirati redoslijed vezanja komponenata u ugljikohidratnom lancu.

Usporedno tehnici NOESY koristi se i tehnika ROESY. Tehnike se slične, razlika je u tome što NOE efekt nastaje u xy ravnini, a ne uzduž z osi kao kod NOESY-a. Korelacije dobivene tehnikom ROESY ekvivalentne su NOESY korelacijama. Nedostatak tehnike ROESY je pojava signala TOCSY, zbog sličnosti pulsnih sljedova navedenih tehnika.⁵

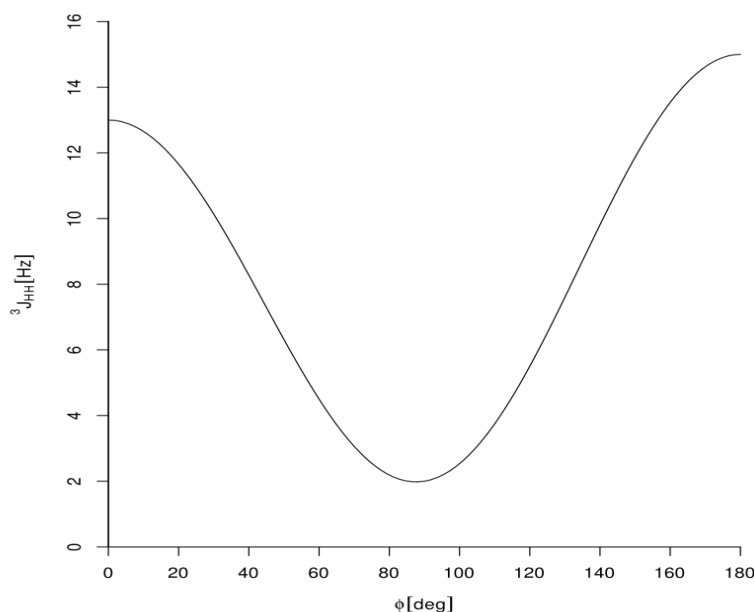
2.5. Karplusova jednadžba

Kako bi opis strukture neke molekule korištenjem NMR tehnika bio potpun, svakako je važno spomenuti Karplusovu jednadžbu. Karplusova jednadžba opisuje korelaciju između vicinalne

konstante sprege dvaju protona i torzijskog kuta između njih. Analiza strukture NMR tehnikama je u vrijeme rada Martina Karplusa bila u samim začecima. Postavljanjem jednadžbe, Karplus je napravio revoluciju u navedenom polju te je ona postala neizostavan alat u određivanju konformacija molekula poput proteina, ugljikohidrata itd.⁹ Karplusova jednadžba glasi:

$$J(\varphi) = A \cos^2\varphi + B \cos\varphi + C$$

Jednadžba jasno pokazuje da proton može interagirati sa svojim vicinalnim susjedom, te da interakcija ovisi o geometriji ta dva protona.⁹ Konstante A, B i C su empirijski određeni parametri koji ovise o vrsti atoma i supstituenata.¹⁰ Ovisnost konstante sprege o torzijskom kutu može prikazati i grafički.

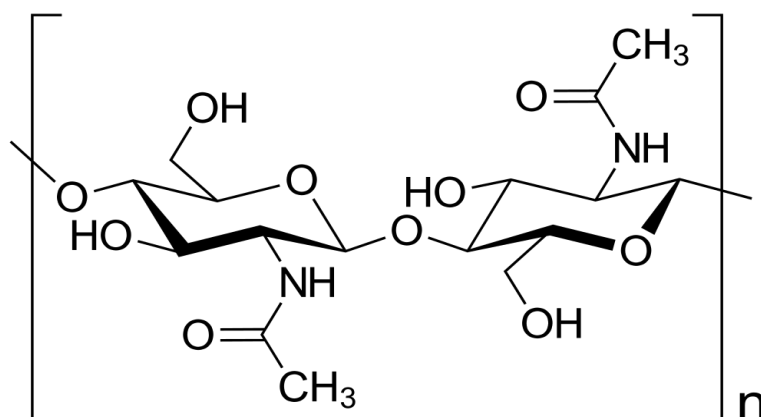


Slika 10. Grafički prikaz Karplusove jednadžbe, $J_{HH}(\varphi) = 12 \cos^2\varphi - \cos\varphi + 2$, dobivene za derivate etana¹¹

Konkretna primjena ove ovisnosti istaknuta je u jednom od prijašnjih poglavlja (§2.3.). Jednadžba je vrlo korisna prilikom određivanja konformacije ugljikohidrata jer lako i efikasno otkriva torzijski kut između dvaju jezgara u sprezi, koji upućuje na njihov položaj odnosno konformaciju.

2.6. Prisutnost ostalih skupina

Ugljikohidrati često osim prije navedenih vrsta atoma mogu sadržavati i neke druge atome (fosfor, dušik,...) ili skupine (metil, etil,...). Prisutnost drugih atoma ili skupina utječe na kemizam samog ugljikohidrata tako da je za njegov potpun opis potrebno provjeriti sadrži li promatrani ugljikohidrat navedene komponente, te u slučaju da sadrži valja utvrditi koje su to komponente. Najbolji primjer ugljikohidrata koji sadrži između ostalog i neki drugi atom, konkretno dušik, je hitin. Hitin je polisaharid građen od dugačkih lanaca *N*-acetilglukoamina, derivata glukoze. U prirodi se nalazi kao sastavni dio staničnih stijenki gljiva i egzoskeleta rakova i insekata.¹²



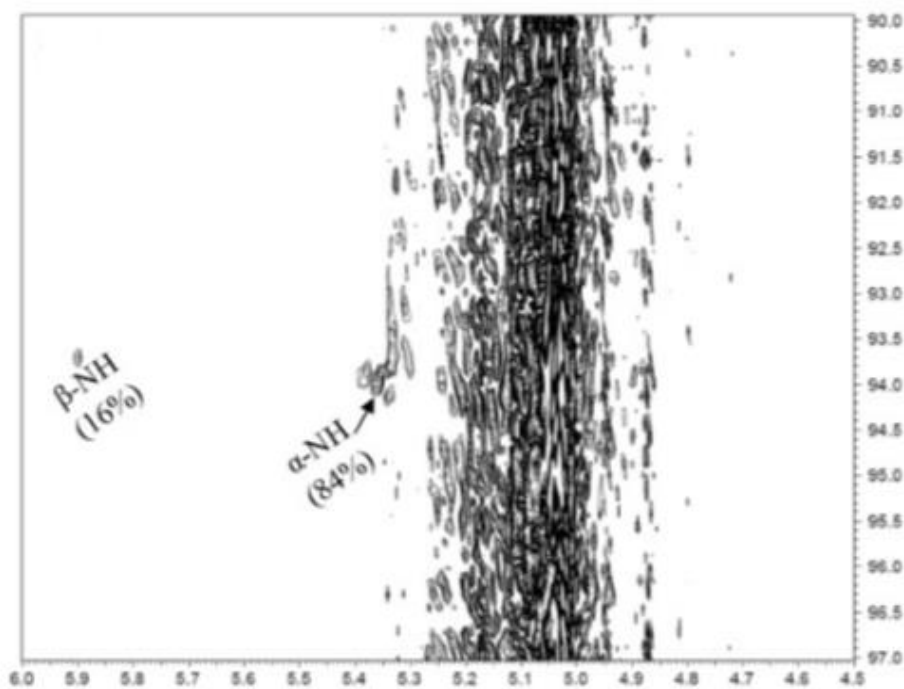
Slika 11. Struktura hitina

Kemijski pomaci protona i ugljika osjetljivi su na prisutnost neugljikohidratnih skupina poput metila, acetila, fosfata ili sulfata. Vezanje takvih skupina utječe na iznos kemijskih pomaka okolnih jezgara. Uočeno je da se kemijski pomaci pomiču prema većim vrijednostima za otprilike $\Delta\delta = 0,2-0,5\text{ppm}$ za protone, dok je $\Delta\delta$ za ugljike čak i veći. Navedene promjene pomiču kemijske pomake u manje napučeni dio spektra što ujedno znači i lakšu detekciju dodatno vezanih skupina. Osim detekcije preko kemijskih pomaka protona i ugljika, u slučaju da dodatno vezana skupina sadrži NMR aktivnu jezgru, moguće je utvrditi njezinu prisutnost uporabom nekih homo ili heteronuklearnih tehnika. NMR aktivne jezgre koje se mogu pojaviti kod ugljikohidrata, osim od prije poznatih ^1H i ^{13}C , su najčešće ^{15}N i ^{31}P te rjeđe ^{33}S .¹⁴

2.6.1. ^1H - ^{15}N HSQC

Jedna od tehnika koja se može upotrijebiti je HSQC. O njezinim specifikacijama je već bilo govora u prijašnjim poglavljima. Ova tehnika vrlo jednostavno i transparentno daje informaciju o tome nalazi li se u strukturi prisutna jezgra dušika, te ako da gdje se točno nalazi. Pripadni spektar bio bi sličan onome prikazanom na slici 4. Razlika bi bila u tome što bi se umjesto pripadnog ^{13}C spektra na osi nalazio odgovarajući ^{15}N spektar. Signali na spektru odgovarali bi interagirajućim jezgrama protona i dušika.

Opisana metoda odabrana je samo kako bi se na primjeru prikazale razne mogućnosti koje pružaju NMR tehnike. Naravno, osim odabrane metode postoji i niz drugih koje mogu dati željene informacije. Primjerice mogu se koristiti heteronuklearne metode, poput HSQC, u potrazi za ostalim NMR aktivnim jezgrama, kao što je ^{31}P .



Slika 12. HSQC spektar anomera *N*-sulfo-D-glukozamina. Na osima se nalaze pripadni ^1H i ^{15}N spektri ⁷

2.7. Zaključak

Ugljikohidrati će radi svoje kompleksnosti, raznovrsnosti, ali i značajne uloge u nizu biološki važnih procesa sve više biti centralna točka znanstvenih istraživanja. Na temelju danog pregleda

NMR tehnika nameće se zaključak da u polju strukturne analize NMR spektroskopija daje izvrsne rezultate. Fasciniraju izvanredne mogućnosti koje razne NMR tehnike pružaju prilikom analize strukture molekula. Iz navedenih razloga, upravo je NMR danas jedna od najčešće korištenih analitičkih metoda. Daljnji razvoj tehnologije samo će poboljšati izvedbe NMR spektroskopije, te će ona nastaviti biti glavno oruđe znanosti u otkrivanju dosada nepoznatih struktura.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman and company, New York, 1975., str. 320
2. D. Lowicki, *Nucl. Magn. Reson.* **42** (2013) 383-419
3. W. A. Bubb, *Concepts Magn. Reson.*, Part A, Vol. 19A, Wiley Interscience, Sydney, 2003, str. 1-19
4. J. Ø. Duus, C. H. Gotfredsen, K. Bock, *Chem. Rev.* **100** (2000) 4589-4614
5. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA, Varaždin, 2013, str. 1-178
6. A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, J. Marth, *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1999., str. 98
7. V. H. Pomin, u S. Petrescu (ur.), *Unravelling Glycobiology by NMR Spectroscopy*, IntechOpen, 2012., str. 64-93
8. <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=anomer> (datum pristupa 20.09.2020.)
9. L. Dalton, *Karplus Equation*, 22.12.2003., *Chem. Eng. News* **81** (2003) 37
10. M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **85** (1963) 2870-2871
11. M. J. Minch, *Concepts Magn. Reson.* **6** (1994) 41-56
12. A. Alegro, M. Krajačić, A. Lucić, *Život 2*, Školska knjiga, Zagreb, 2014, str. 64, 117
13. <https://www.chemistryworld.com/podcasts/chitin/6478.article>
(datum pristupa 21.09.2020)
14. D. Goffin, A. S. Shashkov, P. Bystricky, A. Savage, *Bull. Korean Chem Soc.*, **30** (2009) 2535-2541

