

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

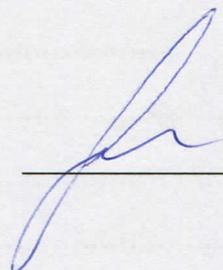
Направление: 03.04.02 Физика
Профиль: Медицинская физика

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

**Внутримолекулярная подвижность пиллар[5]арена в свободном
состоянии и в комплексе с альфа-липоевой кислотой по данным ЯМР
спектроскопии**

Студент 2 курса группы 06-119

« 8 » июль 2023 г

 (Шарипова Л.В.)

Научный руководитель

к.ф.-м.н., доцент

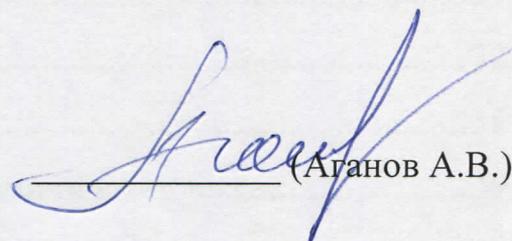
« 8 » июль 2023 г

 (Хайрутдинов Б.И.)

Заведующий кафедрой медицинской физики

д.х.н., профессор

« 8 » июль 2023 г

 (Аганов А.В.)

Казань-2023

Содержание

Введение.....	2
1. Теоретическая часть.....	4
1.1 Физические основы ядерного магнитного резонанса	4
1.1.1 Молекулярный спин в магнитном поле	4
1.1.2 Макроскопическая намагниченность и уравнения Блоха.....	4
1.1.3 Спин-решеточная релаксация	7
1.1.4 Спин-спиновая релаксация	8
1.2 Основные методы 1D и 2D спектроскопии ЯМР.....	9
1.2.1 Одномерная спектроскопия ЯМР	9
1.2.1.1 Последовательность спинового эха	10
1.2.1.2 Импульсная последовательность Карра-Парселла-Мейбум-Гилла.	11
1.2.2 Основы двумерной спектроскопии ЯМР	14
1.2.2.1 Ядерный эффект Оверхаузера	15
1.2.2.2 Последовательность ^1H - ^1H NOESY и практические аспекты	
эксперимента	15
1.3 Кинематика обменного процесса	17
1.4 Метод Карра-Парселла-Мейбум-Гилла	20
2. Материалы и методы	22
2.1 Объекты исследования	22
2.2 Методика приготовления образца.....	24
3. Результаты и обсуждения.....	26
3.1 ^1H ЯМР спектр пиллар[5]арена.....	26
3.2 Внутримолекулярная подвижность.....	27
3.3. Вращательные процессы в системе.....	32
3.4 Пространственная структура комплекса	35
3.5 Исследование внутримолекулярной динамики комплекса	39
Заключение	46
Список публикаций по теме выпускной квалификационной работы	47
Список литературы	50

ВВЕДЕНИЕ

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса является методом изучения взаимодействий между ядрами и электронами внутри исследуемого образца, его пространственного строения, межмолекулярных взаимодействий и внутримолекулярной подвижности объекта.

Развитие современной супрамолекулярной химии привело к созданию новых макроциклических соединений – пиллар[n]аренов, способных к образованию комплексов «гость-хозяин». Уникальными свойствами пиллар[n]арена являются: планарная хиральность, возможность пошаговой функционализации, трубчатая пространственная структура, формирующая электронодонорную полость. Данные макроциклические соединения демонстрируют хорошую биосовместимость и отсутствие цитотоксичности. Являются перспективными в качестве транспортных систем, используя гидрофобную макроциклическую полость для инкапсулирования в нее небольших молекул. Данные свойства супрамолекулярной химии в биомедицине позволяют повысить биодоступность, пролонгировать действие препарата, предотвратить его преждевременную деградацию, что снижает количество побочных эффектов и повышает терапевтической эффективности препарата.

Макромолекулы являются динамическими объектами, которые претерпевают конформационные изменения и способны к образованию комплексов. Таким образом, знание структурных и функциональных свойств этих различных конформационных состояний имеет решающее значение для понимания процессов, происходящих в биологических системах. Одним из методов ЯМР применяемым для изучения динамических процессов в молекулярных системах является метод релаксационной-дисперсии основанной на импульсной последовательности Карра-Перселла-Мейбума Гилла (КПМГ), который так же чувствительный к обменным процессам,

происходящим в миллисекундном временном диапазоне. При условии, что кинетика обмена находится в области между медленным и промежуточным обменом, а доля заселенностей возбужденных состояний составляет порядка 0,5% или больше, профили релаксационной дисперсии КПМГ могут быть использованы для определения констант скоростей химического обмена и относительных заселенностей состояний и, что наиболее важно, абсолютных значений разностей в химических сдвигах между основными и возбужденными конформерами.

Целью представленной работы является исследование влияния условий внешней среды (температуры, кислотности), а также наличия лиганда на внутримолекулярную подвижность декааммониевой соли 4,8,14,18,23,26,28,31,32,35-дека (карбоксиметокси) -пиллар[5]арена.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить константы скорости химического обмена для протонов гидрохинонового фрагмента пиллар[5]арена при различных температурах и значениях pH раствора с помощью последовательности импульсов Карра-Парселла-Мейбума-Гилла.
2. Определить термодинамические параметры конформационного обмена протонов гидрохинонового фрагмента пиллар[5]арена.
3. Записать одномерные и двумерные спектры ЯМР для подтверждения образования комплекса между пиллар[5]ареном и лигандом (α -липоевой кислотой).
4. Охарактеризовать подвижность протонов гидрохинонового фрагмента пиллар[5]арена в комплексе с α -липоевой кислотой.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1.1 Физические основы ядерного магнитного резонанса

1.1.1 Молекулярный спин в магнитном поле

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса наблюдает переходы между спиновыми состояниями ядер, находящихся во внешнем магнитном поле. ЯМР-измерения можно проводить на ядрах, содержащих нечетное число протонов, так как они имеют ненулевой спин. Важными примерами являются ядра водорода, представляющие собой положительно заряженные частицы с соответствующим угловым моментом или спином. В присутствии приложенного внешнего магнитного поля ^1H ядра существуют в двух ядерных спиновых состояниях с различной энергией. Чуть больше половины ядер находятся в более низком энергетическом состоянии, называемом альфа (α), чем в более высоком энергетическом состоянии, называемом бета (β) [1]. Разность энергий ΔE между спиновыми состояниями пропорциональна внешнему магнитному полю B_0 .

$$\Delta E = h\nu = \gamma\hbar B_0, \quad (1)$$

где \hbar – постоянная Планка, ν – частота переходов, γ – гиромагнитное отношение, определяющееся строением ядра.

ЯМР-спектроскопия регистрирует переходы между этими спиновыми состояниями, индуцированные радиочастотным электромагнитным полем, называемым полем B_1 .

1.1.2 Макроскопическая намагниченность и уравнения Блоха

Из распределения Больцмана следует, что наиболее стабильное и низкоэнергетическое состояние в системе будет наиболее населенным в состоянии равновесия [2]. При этом наименьшую энергию имеют ядерные

магнитные диполи, ориентированные по направлению B_0 . Однако разница в энергии с менее стабильным состоянием (диполи, ориентированные против B_0) невелика, что приводит к небольшой разнице в населенности. Хотя дисбаланс заселенности незначителен, он приводит к ядерному магнитному моменту, который представляет собой сумму дипольных моментов (векторов) всех ядер, присутствующих в образце. Этот суммарный ядерный магнитный момент называется намагниченностью (\bar{M}) и представлен вектором, параллельным постоянному магнитному полю B_0 . Длина вектора \bar{M} пропорциональна разнице заселенностей между параллельным и антипараллельным дипольными моментами. При резонансном воздействии слабым переменным магнитным полем, применяющимся в спектроскопии ЯМР, \bar{M} изменит свою ориентацию относительно внешнего магнитного поля B_0 . Соответствующее поглощение энергии ядрами при этом действии измеряется с помощью ЯМР, и эта энергия соответствует энергии радиоволн [1].

Рассмотрим для простоты макроскопическое тело, состоящее из протонов, то есть ядер водорода, спиновые/магнитные моменты которых будут давать вклад в сигнал ЯМР. Намагниченность $\bar{M}(\vec{r}, t)$ определяется как локальный магнитный момент на единицу объема в точке \vec{r} тела и в момент времени t следующим образом. Рассмотрим объем $V(t)$ с центром в точке \vec{r} , который достаточно мал, так что внешние поля в хорошем приближении однородны по $V(\vec{r})$, но при этом достаточно велик, чтобы содержать большое число протонов. Тогда намагниченность

$$\bar{M}(\vec{r}, t) = \frac{1}{V(\vec{r})} \sum_i \bar{\mu}_i, \quad (2)$$

где сумма ведется по всем протонам в $V(\vec{r})$. Взаимодействие каждого магнитного момента в $V(\vec{r})$ с внешним магнитным полем \bar{B}_1 определяется выражением:

$$\frac{d\bar{\mu}_i}{dt} = \gamma \bar{\mu}_i \times \bar{B}_1. \quad (3)$$

Если мы просуммируем все протоны в $V(\vec{r})$ и разделим на $V(\vec{r})$, мы придем к следующему уравнению для намагниченности в \vec{r} :

$$\frac{d\bar{M}}{dt} = \gamma \bar{M} \times \bar{B}_1. \quad (4)$$

Подчеркнем здесь, что никакие другие взаимодействия с участием магнитных моментов $\bar{\mu}_i$ в настоящее время не рассматриваются. Другими словами, мы игнорируем любые взаимодействия между протонами.

Мы можем рассматривать результирующую намагниченность макроскопического ансамбля спиновых магнитных моментов как единый магнитный момент, полученный из векторной суммы магнитных моментов в ансамбле, если не рассматривать межмолекулярные взаимодействия.

В случае основного статического поля $\bar{B}_1 = \bar{B}_1 = B_0 \hat{k}$ удобно рассматривать две составляющие намагниченности:

- 1) $\bar{M}_{\parallel} = M_z \hat{k}$, параллельный или «продольный» компонент,
- 2) $\bar{M}_{\perp} = M_x \hat{i} + M_y \hat{j}$, «поперечные» компоненты.

Из уравнения (4), следует, что

$$\frac{dM_z}{dt} = 0, \quad (5)$$

$$\frac{d\bar{M}_{\perp}}{dt} = \gamma \bar{M}_{\perp} \times \bar{B}_0. \quad (6)$$

Однако уравнения (3) и (4) недостаточны для моделирования реальных ансамблей протонов в макроскопических материалах, так как протоны взаимодействуют друг с другом в своих окрестностях. Для более реалистичного описания реальных систем потребуются дополнительные члены в этих уравнениях, которые зависят от параметров релаксации, различных для двух уравнений. Компоненты M_z и \bar{M}_{\perp} по-разному релаксируют к своим конечным значениям.

1.1.3 Спин-решеточная релаксация

В макроскопической системе взаимодействующих протонов, погруженных в статическое внешнее магнитное поле $\bar{B}_1 = B_0 \hat{k}$, магнитные моменты этих протонов пытаются выровняться с внешним полем за счет обмена энергией с окружающей средой. Этот обмен осуществляется за счет теплового движения атомов, содержащих эти протоны, и их последующих столкновений с другими атомами в системе. Рассуждение с учетом потенциальной энергии ядерной намагниченности [3] показывает, что существует равновесное значение M_0 для параллельной намагниченности M_z системы, при

$$M_0 = \frac{1}{4} \rho_0 \frac{\gamma^2 \hbar^2}{kT} B_0, \quad (7)$$

где ρ_0 – плотность протонов, k – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура. Скорость изменения M_z пропорциональна разности $M_0 - M_z$. Константа пропорциональности, определенная экспериментально, обратно пропорциональна временному масштабу скорости роста/распада. Таким образом, уравнение (5) заменяется уравнением

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{1}{T_1} (M_0 - M_z), \quad (8)$$

где T_1 — «время спин-решеточной релаксации». Значение T_1 для чистой воды составляет 2,51 с при температуре 20°C [1].

Решение уравнения (8) есть

$$M_z(t) = M_z(0) e^{-\frac{t}{T_1}} + M_0 \left(1 - e^{-\frac{t}{T_1}}\right). \quad (9)$$

После применения радиочастотного импульса $\bar{B}_1(t)$ параллельная намагниченность демонстрирует экспоненциальный рост от начального значения $M_z(0)$ до равновесного значения M_0 .

1.1.4 Спин-спиновая релаксация

В нашей макроскопической системе взаимодействующих протонов поперечная намагниченность $\bar{M}_\perp(t)$ спадает до нуля, но за счет другого процесса, при котором спины испытывают не только внешнее приложенное поле, но и свои статические локальные поля за счет спинов в их районе. Вариации локальных полей приводят к разным локальным частотам прецессии. В результате отдельные спины, которые изначально могли быть выровнены в плоскости $xу$, со временем будут «расходиться», тем самым уменьшая чистую поперечную намагниченность – сумму всех отдельных поперечных компонентов – в плоскости $xу$. Таким образом, такое расхождение спинов также известно как «расфазировка».

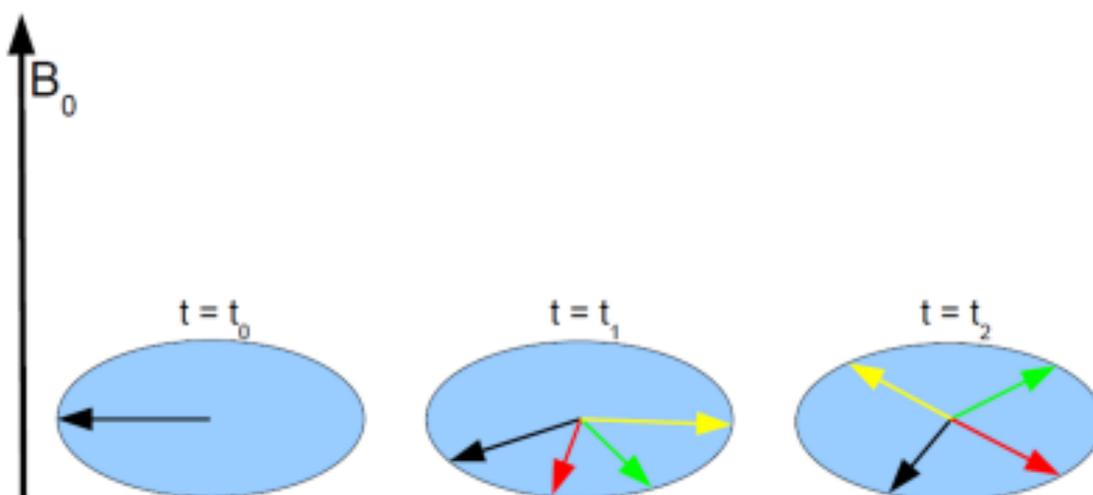


Рисунок 1 – Потеря фазовой когерентности протонов из-за различия [3] ларморовской частоты при наличии магнитных градиентов

Этот спад поперечной намагниченности приводит к введению еще одного экспериментального параметра – времени «спин-спиновой» релаксации T_2 . Если мы предположим, что спад экспоненциальный, то уравнение (6) можно записать в виде:

$$\frac{d\bar{M}_\perp}{dt} = \gamma\bar{M}_\perp \times \bar{B}_0 - \frac{1}{T_2}\bar{M}_\perp. \quad (10)$$

Решением этой системы будут уравнения:

$$M_x(t) = e^{\frac{-t}{T_2}} [M_x(0)\cos\omega_0 t + M_y(0)\sin\omega_0 t], \quad (11)$$

$$M_y(t) = e^{\frac{-t}{T_2}} [M_y(0)\sin\omega_0 t - M_x(0)\cos\omega_0 t]. \quad (12)$$

Скорости релаксации для спин-спиновых взаимодействий, при которых энергия не теряется, выше, чем для спин-решеточных взаимодействий. В результате $T_2 < T_1$. Значение T_2 для чистой воды составляет 2,02 с при температуре 20°C [3]. Значения T_2 очень малы для твердых тел (обычно порядка микросекунд) и гораздо длиннее для жидкостей (порядка секунд).

1.2 Основные методы 1D и 2D спектроскопии ЯМР

1.2.1 Одномерная спектроскопия ЯМР

Одно из визуальных представлений данных, наиболее часто встречающееся в повседневной жизни, представляет интенсивность (или изменение) параметра вдоль оси. Его простота позволяет легко и интуитивно интерпретировать данные, и примеры многочисленны: изменение стоимости акций в зависимости от рабочего времени в финансах, движение грунта в зависимости от времени во время землетрясений, как показано на сейсмографах, или изменение атмосферного давления в течение дня в прогнозах погоды. Эти графики можно найти повсюду в науке, и особенно в случае аналитических методов распространены одномерные (1D) представления. В случае ЯМР типичный одномерный спектр описывает зависимость интенсивности сигнала от резонансной частоты (в Гц или ppm) для наблюдаемых ядер, где интенсивность и форма сигналов ЯМР связаны со строением и подвижностью молекулы [4]. Положение (то есть химический сдвиг или частота) каждого резонанса определяется химическим окружением

ядер. Величина (интенсивность или интеграл) каждого из сигналов коррелирует с относительным содержанием ядра в исследуемой молекуле, а расщепление сигнала (или его отсутствие) является результатом химических связей ядер.

1.2.1.1 Последовательность спинового эха

Для измерения времен релаксаций T_2 используются импульсные последовательности, построенные на измерении спинового эха. Базовая последовательность спинового эха состоит из последовательности импульсов: 90_x – время задержки τ_1 – 180_x – время задержки τ_2 – спиновое эхо [5] (рисунок 2). После начального 90_x импульса, который ориентирует намагниченность \bar{M} по оси y , спиновая намагниченность прецессируя в плоскости xz начинает уменьшаться из-за расфазировки отдельных компонент \bar{M} по причине различного химического окружения каждого ядра и внутренних неоднородностей B_0 . Применение 180_x импульса переворачивает векторы намагниченности на другую сторону плоскости xz , и после временной задержки той же продолжительности, что и между импульсами, векторы снова будут выровнены вдоль y оси, где они могут быть зарегистрированы. Варьирование время задержки между импульсами производит измерение времени релаксации T_2 .

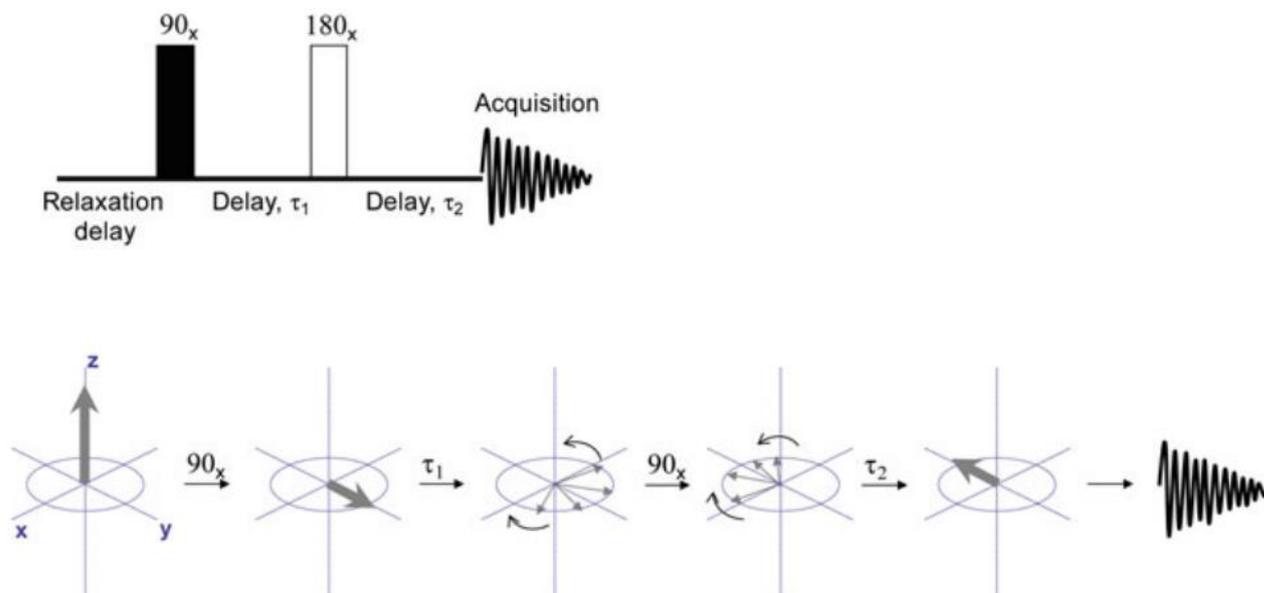


Рисунок 2 – Последовательность спинового эха. Наверху показана последовательность импульсов. Внизу показано графическое представление поведения спинов по векторной модели. Стрелки указывают спины, которые расщеплены из-за T_2 -эффектов; изогнутые стрелки вокруг этих вращений указывают на их круговое движение [5]

1.2.1.2 Последовательность Карра-Парселла-Мейбум-Гилла

Последовательности Карра-Парселла-Мейбум-Гилла (КПМГ) [6,7] с несколькими тысячами импульсов и коротким эквидистантным интервалом между импульсами (t_E) позволяют регистрировать затухающий сигнал, обеспечивая достаточное время регистрации и минимизируя процессы релаксации вызванные диффузией. Каждый из этих импульсов влияет на систему так, чтобы каждое эхо являлось измеряемым сигналом [8]. Таким образом, t_E называется интервалом эха в последовательности КПМГ.

Последовательность КПМГ состоит из 90° импульса возбуждения, который переворачивает ориентацию макроскопической намагниченности на 90° от направления z в плоскость xu , и нескольких 180° импульсов рефокусировки, которые переворачивают протоны на 180° в плоскость xu . После импульса возбуждения (90°) протоны теряют свою фазовую

когерентность из-за немного отличающихся ларморовских частот, вызванных магнитными градиентами. Через промежуток времени τ применяется импульс перефокусировки (180°), в результате которого вектора намагниченности ядер с более высокой скоростью прецессии начинают отставать от векторов намагниченности ядер с меньшей скоростью прецессии. За счет перефокусировки эхо нарастает и достигает своего максимума после $t_E = 2\tau$. Максимум эха отмечает точку максимальной когерентности протонов.

В общем, τ является постоянным для всей последовательности КПМГ и должно быть очень малым, чтобы гарантировать, что влияние диффузии будет пренебрежимо мало, иначе протоны не будут полностью перефокусированы, что приведет к уменьшению амплитуды эха. В лабораторных измерениях τ обычно устанавливается в пределах 100–300 мкс. Чтобы корректно прописать весь процесс затухания намагниченности, необходимо большое количество эхо-сигналов (N). Обычно в лабораторных измерениях выполняется несколько тысяч эхо-сигналов в рамках одной последовательности КПМГ. Максимум всех обнаруженных эхо-сигналов дает кривую релаксации для оценки времени релаксации T_2 . Классическая последовательность КПМГ показана на рисунке 3 (а). Заметим, что если при малом τ диффузией можно пренебречь, то для измерения диффузионных процессов можно провести ряд КПМГ с разными τ .

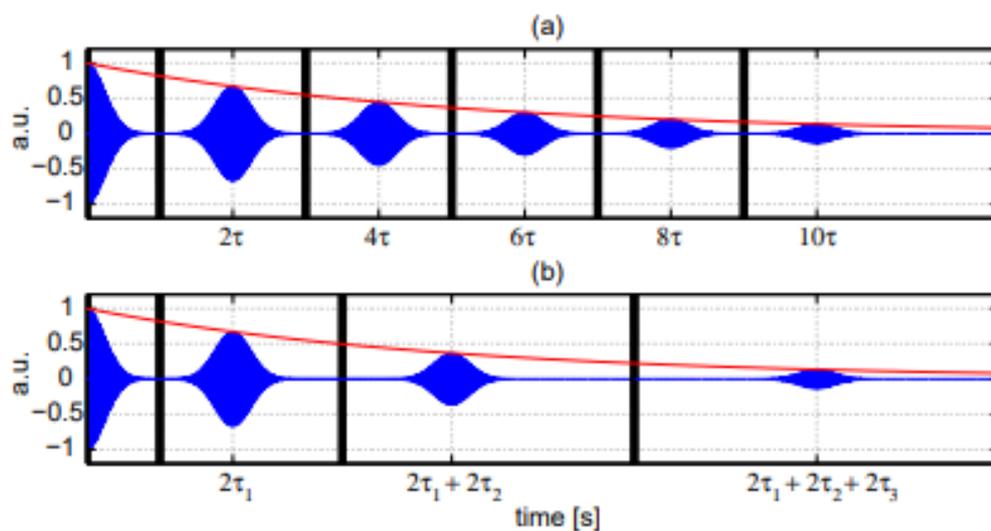


Рисунок 3 – (а) Классическая последовательность КПМГ с 90° импульсом возбуждения и несколькими 180° импульсами для рефокусировки. После каждого 180° импульса появляется эхо. Огибающая всех обнаруженных эхо-сигналов дает кривую затухания T_2 . (б) Первые импульсы и результирующие эхо-сигналы для последовательности КПМГ с переменным интервалом τ [9]

1.2.2 Основы двумерной спектроскопии ЯМР

Ранее были рассмотрены одномерные ЯМР спектры и порой при расшифровке полученных сигналов недостаточно информации, поэтому прибегают к двумерным ЯМР спектрам для полной уверенности в химической структуре объекта. Особенно это важно, когда молекулы увеличиваются в размерах и структурно усложняются, в одномерном спектре появляется больше резонансных сигналов, а поскольку диапазон химических сдвигов для ^1H ограничен, некоторое перекрытие будет неизбежным [10]. При этом меньшие сигналы исчезают под более интенсивными, что затрудняет прямой анализ химических сдвигов. В многомерных спектрах есть основное горизонтальное измерение, которое обычно занимает частотный диапазон ^1H , в то время как дополнительные измерения строятся из скалярных и дипольных взаимодействий между протонами и любыми другими ядрами внутри молекулы [11].

В каждом двумерном ЯМР эксперименте можно разделить последовательность импульсов на четыре временные области: подготовка, эволюция, смешивание и обнаружение:

Во время подготовительного периода состояние равновесия устанавливается в период задержки импульса, подается импульс, чтобы привести систему в исходное состояние.

В период эволюции системе позволено развиваться свободно. Этот период отвечает за предоставление информации, закодированной во второй частотной области.

Время смешивания предназначено для наблюдения за передачей когерентности, перекрестной релаксацией и химическим обменом.

Период регистрации свободен от каких-либо импульсов наблюдаемого ядра. Однако можно использовать развязывающий импульс для ядра, отличного от наблюдаемого ядра.

1.2.2.1 Ядерный эффект Оверхаузера

Существуют ЯМР эксперименты, основанные на взаимодействиях между спинами, происходящих в пространстве – дипольные взаимодействия. Ядерный эффект Оверхаузера (ЯЭО) является результатом таких дипольных взаимодействий и лежит в основе многих экспериментов ЯМР. Важность ЯЭО для выяснения структуры с помощью ЯМР уникальна, поскольку она дает информацию о трехмерной молекулярной геометрии. Существует два разных метода наблюдения ЯЭО: стационарный и неравновесный ЯЭО. Какой из них выбрать, будет зависеть от размера изучаемой молекулы [12].

1.2.2.2 Последовательность ^1H - ^1H NOESY и практические аспекты эксперимента

Двухмерный эксперимент NOESY обычно применяется к большим молекулам, таким как белки или нуклеиновые кислоты, и следует обычной схеме многомерного эксперимента. Время смешивания, в течение которого происходят переходные ядерные эффекты между спинами, обычно находится в диапазоне 50–300 мс, в зависимости от размера молекулы (как правило, чем больше молекула, тем короче время смешивания). Основными особенностями спектра в эксперименте NOESY являются кросс-пики, отражающие эффективность дипольного-дипольного взаимодействия между двумя ядрами, расположенные на расстоянии не более 5–6 Å. Хотя спиновая диффузия всегда присутствует и ее необходимо учитывать, интенсивности этих кросс-пиков можно соотнести с межъядерными расстояниями (r^{-6}), имея в виду, что в интенсивность пика ЯЭО вносят вклад все окружающие протоны, причем вклад ближайших в большей степени.

Время корреляции зависит от размера и формы молекулы, вязкости растворителя и температуры измерения, но существует реальный риск того, что в эксперименте NOESY не будут наблюдаться кросс-пики ЯЭО для

определенных молекул. В этих случаях рекомендуется использовать альтернативную последовательность ROESY (спектроскопия эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат) [13]. В этом эксперименте используется схема спинового лока (захвата), подобная той, что применяется в TOCSY, которая способна детектировать сигнал аналогичный эффекту Оверхаузера во вращающейся системе координат (ROE). В этих экспериментальных условиях ЯЭО/ROE всегда положителен.

1.3 Кинематика обменного процесса

Динамический ЯМР – это измерение спектров при различных температурах с последующим анализом наблюдающихся изменений формы и положения сигналов с целью получения информации о константах скоростей и равновесий химических процессов и их механизмах [14].

Простейшей моделью динамического процесса является двухпозиционный обмен между двумя состояниями ($A \leftrightarrow B$). Под эту модель могут попадать множество динамических процессов: например, белок-лигандное взаимодействие, обмен между мономером \leftrightarrow димером, обмен между протонированным \leftrightarrow депротонированным, или обмен между конформациями $A \leftrightarrow B$. Из-за своей простоты модель с двумя состояниями в первую очередь используется для интерпретации экспериментальных данных и часто бывает достаточной для анализа. С точки зрения ЯМР два состояния имеют резонансные частоты ν_A и ν_B и описывает разность химических сдвигов $\Delta\nu = |\nu_A - \nu_B|$. Важно отметить, что вид ЯМР спектра зависит от населенностей каждого из состояний P_A и P_B ($P_A + P_B = 1$), а также относительных значений скорости обмена $k_{ex} = k_A + k_B$ и разности химического сдвига $\Delta\nu$ [15].

В связи с этим выделяют три области обмена, обозначаемых областью медленного обмена ($k_{ex} \ll |\Delta\nu|$), промежуточного ($k_{ex} \approx |\Delta\nu|$) и быстрого ($k_{ex} \gg |\Delta\nu|$).

В режиме медленного обмена ($k_{ex} \ll |\Delta\nu|$) наблюдаются сигналы от обоих состояний, отражающие их различные химические сдвиги, интенсивности и ширину линий. Это связано с тем, что в течение периода регистрации сигнала ЯМР не происходит значительного перехода между состояниями $A \leftrightarrow B$. В этом пределе интенсивность каждого пика напрямую отражает населенность этого состояния (при условии достаточного времени восстановления между импульсами). Этот процесс непосредственно способствует экспоненциальному спаду интенсивности ССИ и может быть

количественно определен увеличением скорости поперечной релаксации через $R_{2Obs} = R_{20} + k$, где R_{20} - скорость релаксации в отсутствие обмена.

При быстром обмене наблюдается один сигнал с химическим сдвигом, определяемым средневзвешенным значением по заселенностям состояний, $\delta_{Obs} = P_A\delta_A + P_B\delta_B$ и скоростью релаксации $R_{2Obs} = P_AR_{2A} + P_BR_{2B}$. Это связано с тем, что происходит быстрый переход между состояниями $A \leftrightarrow B$ и, следовательно, усреднение в течение периода регистрации сигнала ЯМР.

При промежуточном обмене или коалесценции наблюдается один сигнал при химическом сдвиге расположенном между δ_A и δ_B . Важно отметить, что ширина линии этого пика «обменно уширена» из-за переходов между состояниями $A \leftrightarrow B$ в течение периода обнаружения. Это дополнительное уширение обозначается R_{ex} , так что $R_{2Obs} = R_{20} + R_{ex}$, где R_{20} - скорость релаксации в отсутствие обмена. Это явление принципиально отличается от эффекта $R_{2Obs} = R_{20} + k$ от медленного обмена, поскольку k усиливает релаксацию строго за счет потери популяции без влияния во время записи ССИ. Аномальное уширение пиков (т.е. $R_{ex} > 0$) является отличительной чертой динамики в режиме промежуточного обмена и широко используется при релаксационной дисперсии.

Эти три режима обмена отражают упрощающие предельных случаев химического обмена.

Наблюдение динамических процессов в спектрах ЯМР позволяет получить активационные параметры обменного процесса [16]. Энергию активации такого процесса можно рассчитать по уравнению Арениуса:

$$E_a = -RT \ln K^\ddagger, \quad (13)$$

где K^\ddagger - константа равновесия, используемая для описания образования комплекса.

Зависимость константы скорости от температуры описывается уравнением Эйринга:

$$k = \chi \frac{kT}{h} e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}}. \quad (14)$$

Теория термодинамики утверждает, что

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger, \quad (15)$$

так что

$$k = \chi \frac{kT}{h} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}} e^{-\frac{\Delta S^\ddagger}{R}}, \quad (16)$$

где χ – коэффициент передачи, учитывающий вероятность образования переходного состояния, k – постоянная Больцмана, R – универсальная газовая постоянная, T – температура, h – постоянная Планка, ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger – энтальпия и энтропия активации.

Таким образом, зная k при различных температурах, можно оценить все три кинетических параметра перехода из одного состояния в другое.

График зависимости $\ln(k/T)$ от $1/T$ дает линию с наклоном $(-\Delta H^\ddagger/R)$ и смещением $(23,76 + (-\Delta S^\ddagger/R))$.

В режиме промежуточного обмена, когда скорость обмена примерно равна разнице резонансных частот двух обмененных состояний ($k_{ex} \approx \Delta\nu$), измерение релаксационной дисперсии с использованием импульсной последовательности Карра-Парселла-Мейбума-Гилла дает информация о минорных молекулярных конформациях, которые не наблюдаются напрямую. Что касается конформационного изменения одной макромолекулы, связывающие взаимодействия также могут быть количественно проанализированы посредством обмена между связанными и свободными состояниями с использованием метода релаксационной дисперсии.

1.4 Метод Карра-Парселла-Мейбум-Гилла

Многие биологические процессы, такие как сворачивание белков и конформационные изменения, происходят в медленной временной шкале от мкс до мс, и поэтому динамика белков в этом временном окне представляет общий интерес для понимания функции белков. Динамику в масштабе времени от мкс до мс можно охарактеризовать с точки зрения обменного вклада R_{ex} в наблюдаемую скорость поперечной релаксации R_{2Obs} , используя следующие выражения:

$$R_{2Obs} = R_{ex} + R_{20} \quad (17)$$

$$R_{20} = -\frac{1}{T_{CPMG}} \ln \frac{I}{I_0} \quad (18)$$

где R_{20} – собственная скорость релаксации исследуемых ядер, T_{CPMG} – временная задержка релаксации, I – интегральная интенсивность сигнала, I_0 – интегральная интенсивность сигнала при $T_{CPMG} = 0$. Стоит отметить, что R_{ex} зависит от населенности состояний (P_A, P_B), разницы химических сдвигов ($\Delta\nu$), константы скорости обмена ($k_{ex} = k_{np} + k_{об}$, где k_{np} и $k_{об}$ – прямая и обратная константы скорости химического обмена) и частоты следования импульсов (ν_{cp}). В условиях свободной прецессии зависящая от времени эволюция намагниченности может быть описана уравнениями МакКоннелла. Последовательности 180-градусных радиочастотных импульсов, выполняемых с частотой $\nu_{cp} = 1/4\tau_{cp}$, известны как последовательности импульсов КПМГ и позволяют обнаруживать динамические процессы, происходящие во временной шкале от мкс до мс. Если 180-градусные импульсы повторять с необходимой частотой, это может перевести обмен из медленного в быстрый режим. Учитывая, что R_{ex} имеет максимум при медленном обмене и $R_{ex} = 0$ при быстром обмене, R_{20} уменьшается с увеличением ν_{cp} .

Люз и Мейбум [15] представили решение для обменного процесса с двумя участками, предполагающего быстрый обмен ($(k_{ex} / \Delta v) \rightarrow \infty$) между состояниями a и b :

$$R_2 = R_{20} + \frac{P_A P_B \Delta v^2}{k_{ex}} \left(1 - \frac{4v_{cp}}{k_{ex}} th \left(\frac{k_{ex}}{4v_{cp}} \right) \right) \quad (19)$$

Как отмечалось выше, эксперименты по релаксационной дисперсии позволяют извлекать кинетические (константы скорости), термодинамические и структурные (химические сдвиги) параметры для системы, подвергающейся обмену во временном масштабе от мкс до мс. Эти параметры количественно оцениваются путем подгонки аналитических или численных решений уравнений Блоха-МакКоннелла к наблюдаемым данным. Наиболее часто используемой моделью обмена является модель с двумя состояниями. Однако очевидно, что в большинстве случаев модель с двумя состояниями будет представлять собой значительное упрощение системы, подвергающейся обмену. С другой стороны, предположение о двух состояниях важно, и его использование позволило описать различные динамические процессы в реальных системах.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

В качестве объекта исследования выбрано соединение декааммониевой соли 4,8,14,18,23,26,28,31,32,35-дека(карбоксиметокси) - пиллар[5]арена (далее пиллар[5]арен). Соединение синтезировано на кафедре органической химии Института химии им. Бутлерова Казанского федерального университета в группе проф. Стойкова И.И.

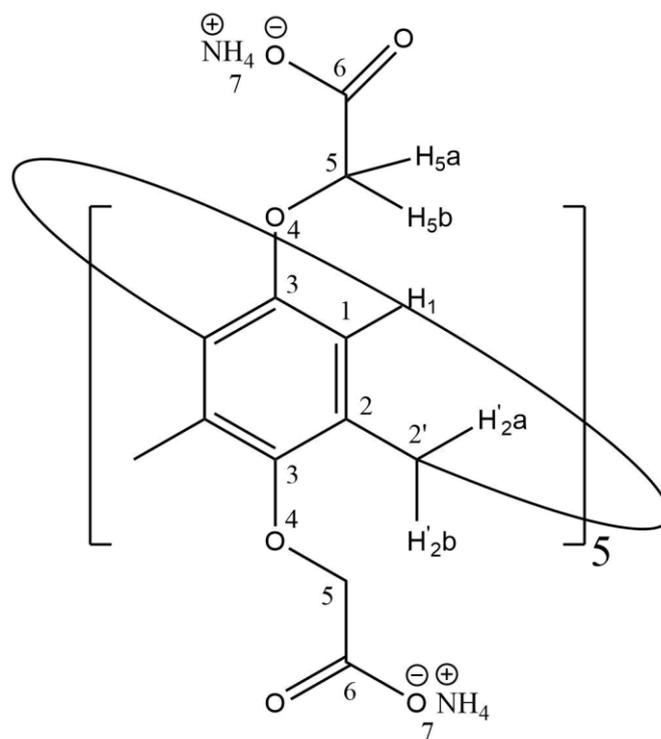


Рисунок 4 – Структурная формула исследуемого пиллар[5]арена

Пиллар[5]арены – это особые циклические олигомеры с полой полостью известные как эффективные комплексообразующие реагенты для органических и неорганических соединений [17]. Макроциклическая полость пиллар[5]арена состоит из повторяющихся фенольных субъединиц, обладает богатой электронами полостью и более жесткой химической структурой. Это обуславливает их уникальные физико-химические свойства, такие как

плоская хиральность, а также способность к распознаванию нейтральных и электронно-дефицитных гостей. Полость пиллар[5]аренов имеет размер, сопоставимый с полостью циклодекстринов и каликсаренов, которые хорошо известны как эффективные комплексообразующие реагенты для органических и неорганических соединений [18]. Их повторяющиеся звенья соединены метиленовыми мостиками в пара-позициях, образуя особую жесткую колоннообразную архитектуру. Уникальная структура и легкая функционализация пиллар[5]аренов позволяют синтезировать новые макроциклы, способные избирательно связывать различные виды гостей, и является перспективной платформой для создания различных интересных супрамолекулярных систем.

Альфа-липоевая кислота (ЛК) – кофермент, который регулирует аэробные процессы энергообразования в клетке, связанные с окислением углеводов и жиров. ЛК влияет на перекисное окисление липидов в митохондриях и микросомах, в виде дигидролипоевой кислоты участвует в каскаде восстановления антиоксидантов (аскорбиновая кислота, глутатион, коэнзим Q10 и витамин E) с использованием ионов железа и меди.

Введении α -липоевой кислоты восстанавливает антиоксидантный потенциал, ускоряет окисление глюкозы, ее фосфорилирование, гликолиз. Уникальность ЛК в том, что она может существовать как в окисленной, так и в восстановленной форме, проявляя как липофильные (липоевая кислота), так и гидрофильные (дегидролипоевая кислота) свойства. Синтезированная ЛК представляет собой смесь сферических R(+) и S(-) изомеров, хорошо растворяющихся как в воде, так и в липофильных растворителях. При поступлении в организм ЛК восстанавливается в основном из R(+)-изоформы до дигидролипоевой кислоты, которая и обеспечивает основные терапевтические эффекты. Дигидролипоевая кислота не используется в качестве лекарственного препарата, т. к. при хранении легко окисляется. Липофильность обеспечивает проникновение ЛК через биологические

мембраны и гистиогематические барьеры, в первую очередь, гематоэнцефалический барьер.

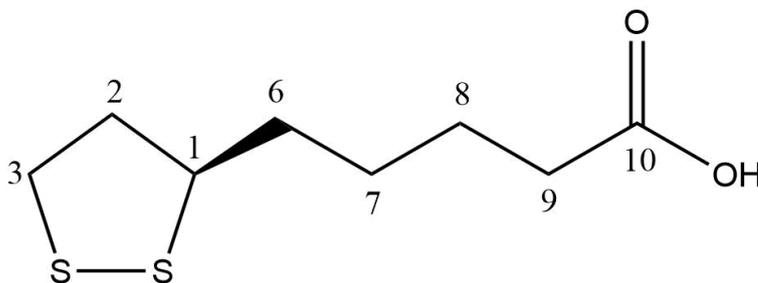


Рисунок 5 – Структурная формула α -липоевой кислоты

2.2 Методика приготовления образцов

Для записи спектров ЯМР готовился водный раствор объемом 600 мкл (99,95% D_2O) с концентрацией пиллар[5]арена 1 мМ.

Для исследования влияния кислотности среды на внутримолекулярную динамику пиллар[5]арена приготавливались образцы в ацетатном и фосфатном буферных растворах, при этом рН среды варьировалась в диапазоне от 4,6 до 8,1.

Na-ацетатный буфер: для приготовления буфера (0,1 М) использовались уксусно-кислый натрий (136,09 г/моль) и раствор уксусной кислоты (0,2 М раствор, содержащий 12,22 г/л уксусной кислоты). Варьируя соотношение компонент, добивались необходимого рН раствора (4,6 – 6,2).

Na-фосфатный буфер: для приготовления буфера (0,1 М) использовались Na_2HPO_4 (141,96 г/моль) и NaH_2PO_4 (119,98 г/моль). Варьируя соотношением Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 добивались необходимого рН раствора (7,2 – 8,1).

Далее готовился 10 мМ стоковый буфер по данной методике: брали 900 мкл D_2O и добавляли 100 мкл Na-ацетатный или Na-фосфатный буфера для получения необходимой концентрации раствора. Образец 1 мМ пиллар[5]арена готовили, разбавляя 300 мкл 2 мМ раствора пиллар[5]арена в

выбранном стоковом буфере добавлением данного буфера до объема 600 мкл.

Комплекс пиллар[5]арена с α -липоевой кислотой готовили по следующей методике. Вначале из исходного раствора тиоктовой кислоты с концентрацией 30 мг/мл брали аликвоту 33 мкл и добавляли к 567 мкл D₂O. Затем 225 мкл полученного 8 мМ раствора α -липоевая кислоты смешивали с 300 мкл 2 мМ раствора пиллар[5]арена в воде (D₂O) и доводили полученный объем до 600 мкл добавлением D₂O. Образец 1 мМ пиллар[5]арена готовили, разбавляя 300 мкл 2 мМ раствора пиллар[5]арена в воде (D₂O) добавлением D₂O до объема 600 мкл.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Эксперименты по измерению и регистрации спектров ядерного магнитного резонанса выполнялись на ЯМР-спектрометре Bruker AVANCE III 600 в лаборатории биофизической химии наносистем КИББ ФИЦ КазНЦ РАН, с использованием 5 мм датчиком TXI и блоком контроля температуры VCU 05. Все измерения проводились в температурном диапазоне от 277 К до 305 К без вращения образцов. Использована последовательность импульсов Карра-Парселла-Мейбум-Гилла из библиотеки последовательностей импульсов ЯМР Bruker (cpmg_esgp2d). Спектры КПМГ получены при температуре 277 К для смеси пиллар[5]арена 1 мМ и тиоктовой кислоты 3 мМ в D₂O. Калибровку по температуре проводили с помощью эталона температуры (метанол-d₄) [12]. Были использованы следующие частоты повторения f_{cp} 180°-импульсов в последовательности КПМГ ($f_{cp} = 1/(4\tau_{cp})$): 25, 50, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000 Гц. Обработка данных и анализ выполнялись с использованием программного обеспечения Bruker Topspin 4.1.1.

3.1 ¹H ЯМР спектр пиллар[5]арена

Спектроскопия ЯМР позволяет получить сведения о строении и составе пиллар[5]аренов и их комплексов в растворе. Для соотнесения ЯМР спектров был записан одномерный протонный спектр пиллар[5]арена в водном растворе при температуре 287 К. Для калибровки шкалы спектров ЯМР применялось соединение ТСП (3-триметилсилилпропионовая-2,2,3,3-d₄-кислота, натриевая соль).

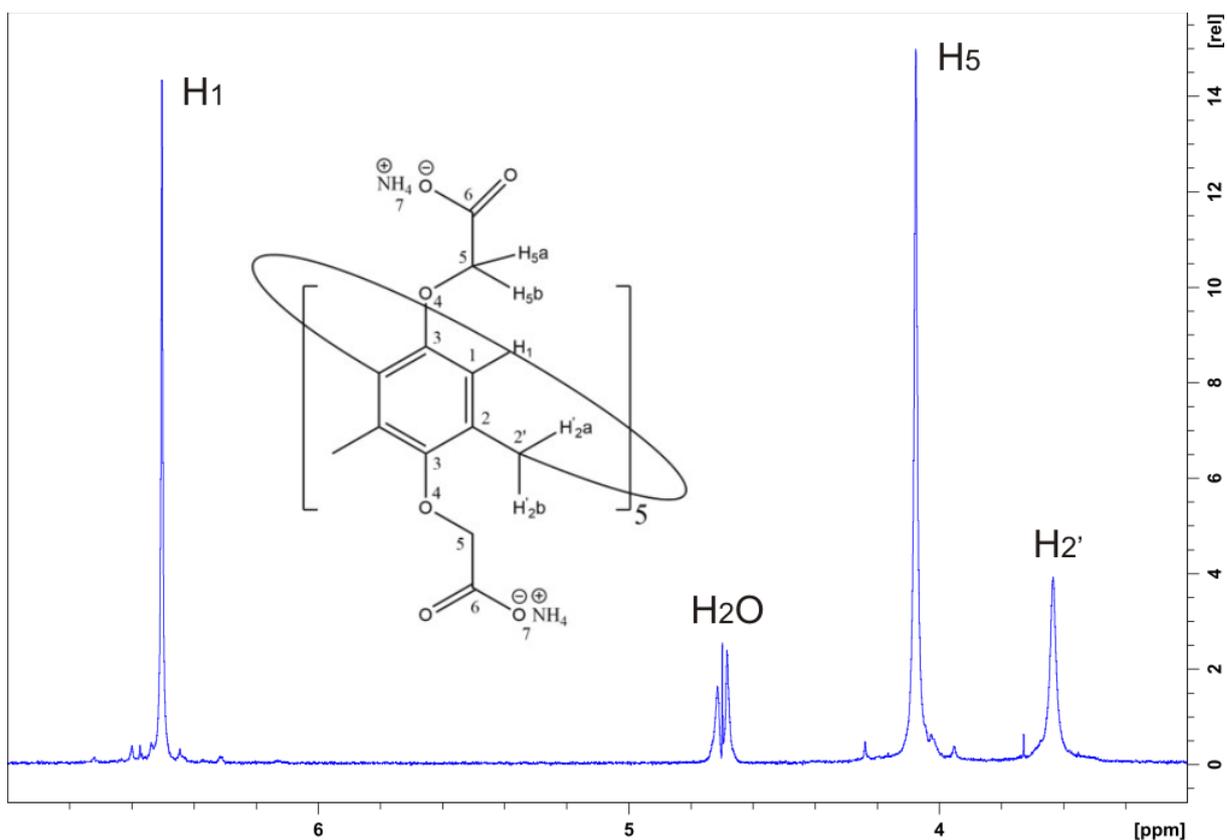


Рисунок 6 – ^1H ЯМР спектр пиллар[5]арена в водном растворе при температуре 287 К

На ^1H ЯМР спектре пиллар[5]арена присутствуют резонансные сигналы протонов гидрохиноновых фрагментов (H_1), метильной группы ($\text{H}_{2'}$), ацетаммониевых заместителей (H_5), а также сигнал от воды. В соединении определили, что для каждой группы протонов соответствуют спектральным линия с химическими сдвигами для H_1 δ 6,47 м.д., $\text{H}_{2'}$ δ 4,08 м.д., H_5 δ 3,62 м.д. и H_2O δ 4,7 м.д. Стоит обратить внимание на то, что все сигнальные линии от протонов пиллар[5]арена являются синглетными. Это может быть объяснено тем, что молекула находится в состоянии быстрого химического обмена.

3.2 Внутримолекулярная подвижность

ЯМР-спектроскопия является чувствительным методом изучения внутримолекулярной подвижности. Процесс инверсии гидрохиноновых

звеньев приводит к уширению спектральных линий в спектрах ЯМР ^1H пиллар[5]арена. Это можно интерпретировать как наличие быстрого процесса химического обмена во временной шкале ЯМР. Метод полного анализа формы линии сигнала ЯМР является общепринятой практикой для изучения динамических процессов. Для чего необходимо понизить температуру раствора так, чтобы достичь области медленного (по шкале времени ЯМР) обмена [19, 20]. Для нашего случая такой подход неприемлем, поскольку исследуемый пиллар[5]арен оказался растворимым в воде, что не позволяет температуре опуститься ниже нуля градусов Цельсия. Одним из широко используемых методов исследования динамических процессов в режиме быстрого обмена в масштабе времени ЯМР является релаксационно-дисперсионный подход, основанный на импульсной последовательности КПМГ [21].

Для исследования внутримолекулярной динамики была использована одномерная последовательность Карра-Парселла-Мейбум-Гилла. Для выполнения поставленной задачи подготовлены образцы пиллар[5]арена с концентрацией 1 ммоль в ацетатном и фосфатном буферных растворах. ЯМР сигнал от протона H_1 пиллар[5]арена оказался удобным для изучения подвижности гидрохиноновых звеньев, так как не перекрывается с другими сигналами в спектрах ЯМР и не испытывает сильного скалярного спин-спинового взаимодействия с другими протонами.

Регистрация ^1H ЯМР КПМГ спектров проводилась в температурном диапазоне от 277 К до 305 К для протонов H_1 пиллар[5]арена, а также при различных рН среды (4,6 – 8,1). Ширина спектра выбиралась 16 м.д с 52226 количеством точек. Величина рециркуляции равнялась $d_1 = 5$ с. Калибровка 90-градусных импульсов последовательности КПМГ проводилась в диапазоне $8,33 \div 8,95$ мкс, частота несущей ^1H совпадала с резонансной частотой воды. Период действия $T_{\text{КПМГ}}$ варьировался в диапазоне 280 - 600 мс.

Для определения константы химического обмена k_{ex} записывалась серия спектров КПМГ. Зависимость наблюдаемой скорости поперечной релаксации R_2 от частоты повторения 180-градусных импульсов f_{cp} описывается выражением:

$$R_2(f_{cp}) = R_{2,0} + R_{ex} = R_2(f_{cp} \rightarrow \infty) + \frac{F_{ex}}{k_{ex}} \left[1 - \frac{4f_{cp}}{k_{ex}} \tanh\left(\frac{k_{ex}}{4f_{cp}}\right) \right]. \quad (20)$$

В результате были получены зависимости наблюдаемой скорости поперечной релаксации R_2 от частоты следования 180-градусных импульсов f_{cp} для групп протонов H1 (рисунок 7). можно получить дисперсионные зависимости наблюдаемой скорости поперечной релаксации R_2 в зависимости от f_{cp} .

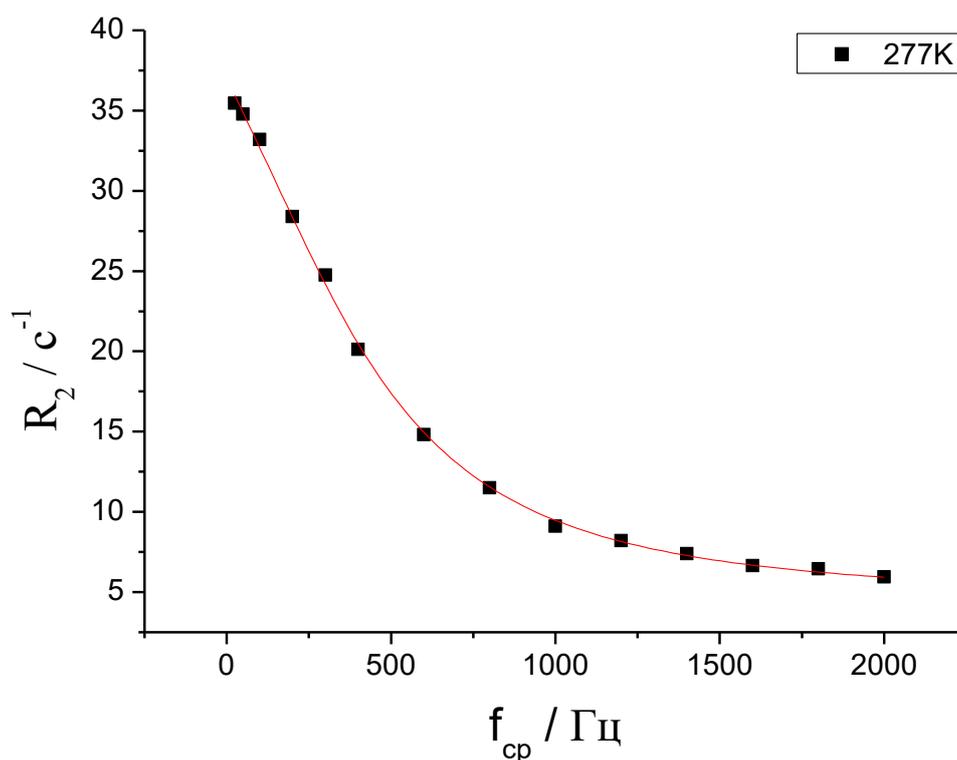


Рисунок 7 – Пример полученных зависимостей скорости поперечной релаксации от частоты следования 180° импульсов в последовательности КПМГ для протонов H1 пиллар[5]арена при температуре 277 К и 7,9 рН

Таблица 1 – Значения констант скоростей химического обмена для спектральной линии Н₁ при разных температурах и рН среды

рН	Т, °С	287	293	299	305
5,7	k_{ex}, c^{-1}	499±18	550±30	600±20	710±30
	Т, °С	277	281	287	293
7,9	k_{ex}, c^{-1}	3000±200	4580±180	6000±140	6900±200

Результат константы скорости химического обмена $7000 c^{-1}$ находится на границе значений, измеренных методом релаксационной дисперсии КПМГ. Тем не менее, было получено значительное изменение констант скорости химического обмена при варьировании таких параметров как температура и рН среды.

Для определения термодинамических параметров конформационного обмена пиллар[5]арена использованы значения констант химического обмена.

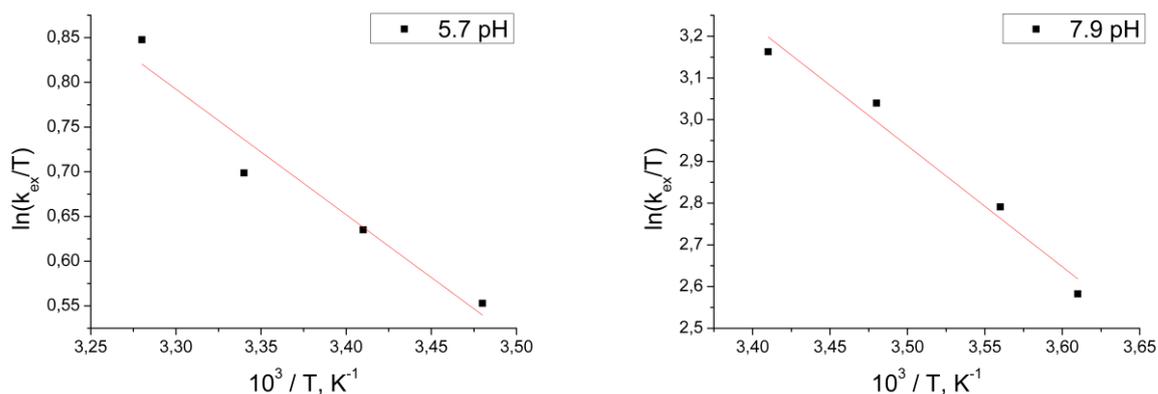


Рисунок 8 – Зависимости $\ln(k_{ex}/T)$ от $1/T$ для спектральных линий, соответствующим протонам Н₁, где 5,7 рН (а) и 7,9 рН (б) раствора

Из зависимостей $\ln(k_{ex}/T)$ от $1/T$ сделаны выводы, что поведение системы довольно сильно зависит от выбранного раствора. Как было сказано

ранее, пиллар[5]арены обладают повышенной растворимостью в воде и образуют комплексы «гость-хозяин» [22]. Тем самым, стоит учитывать, что скорость высвобождения инкапсулированного лекарственного препарата из макроциклического соединения коррелирует с рН средой. С увеличением концентрации H^+ ослабевают водородные связи и изменяется электростатические взаимодействия, лежащие в основе сродства во многих системах «гость-хозяин», тем самым ослабляя это сродство и способствуя диссоциации комплекса [23].

Таблица 2 – Значения констант скоростей химического обмена для спектральной линии H_1 при температуре 277 К и различном рН раствора

Ацетатный буфер		Фосфатный буфер	
рН	k_{ex}, c^{-1}	рН	k_{ex}, c^{-1}
4,6	1930±160	7,2	6680±110
4,9	1550±120	7,4	5700±100
5,3	900±100	7,8	4000±300
5,7	450±50	7,9	3000±200
6,2	280±20	8,1	2390±130

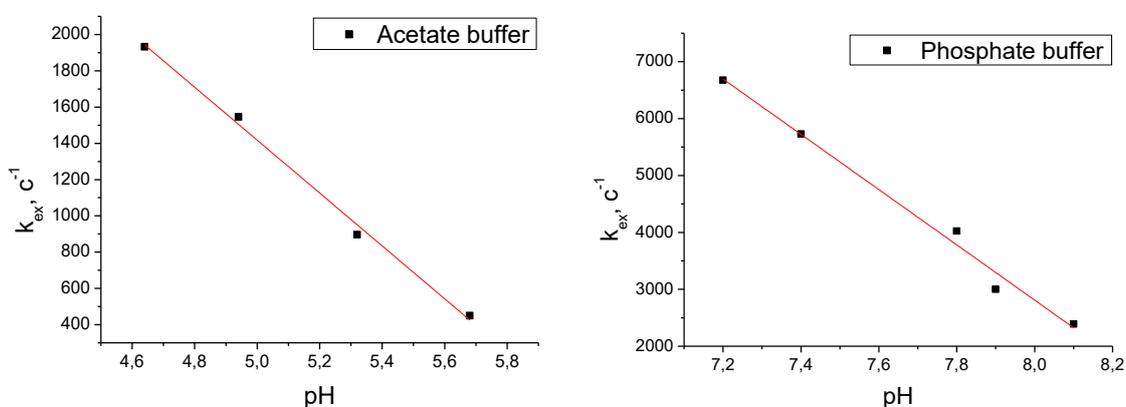


Рисунок 9 – Зависимости обменного параметра k_{ex} от рН для ацетатного и фосфатного буферов в результате обработки температурных спектров КППМГ

Анализируя зависимости $\ln(k_{ex}/T)$ от $1/T$ по формуле Эйринга получили активационные значения термодинамических параметров (энтальпии (ΔH^\ddagger), энтропии (ΔS^\ddagger) и свободной энергии Гиббса (ΔG^\ddagger)) подвижности гидрохинонового фрагмента пиллар[5]арена при температуре 277 К для 5,7 и 7,9 рН раствора:

$$\ln\left(\frac{k_{ex}}{T}\right) = -\frac{\Delta H^\ddagger}{RT} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} + \ln\left(\frac{k_b}{h}\right). \quad (21)$$

Таблица 3 – Активационные значения термодинамических параметров

рН раствора	ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , Дж/Кмоль	ΔG^\ddagger_{277} , кДж/моль
5,7	12±1	-152±8	54±3
7,9	24±3	-89±5	49±2

Термодинамические параметры конформационного обмена протона Н₁ в гидрохиноновом фрагменте пиллар[5]арена определены по температурной зависимости константы скорости химического обмена. На основании экспериментальных данных, а именно энергии Гиббса равной 54 кДж/моль, полученных группой исследователей, которые изучали близкого по структуре пергдроксилированного пиллар[5]арена [24], можно сделать вывод, что исследуемый нами пиллар[5]арен участвует в конформационном обмене.

3.3 Вращательные процессы в системе

Опираясь на литературные данные, обнаружено, что стерические затруднения и внутримолекулярные водородные связи оказывают решающее влияние на вращательные барьеры гидрохиноновых звеньев в пиллар[5]аренах [25, 26]. Тем не менее кинетическое управление вращением

пиллар[5]аренов и, в частности, поведение переключаемых вращательных движений в них до сих пор не исследовано.

Группа исследователей для изучения влияния противоионов на вращение гидрохиноновых звеньев в анионных пиллар[5]аренах выбрала карбоксилатные пиллар[5]арены с различными одновалентными противоионами [27]. Ими был получен результат, свидетельствующий о влиянии различных катионов пилла[5]арена на вращательные барьеры гидрохиноновых колец в объекте, что коррелирует с их радиусами (рисунок 10). Также были сделаны выводы, что тенденция к снижению вращательных барьеров может быть интерпретирована следующим образом: в вращательном процессе имело место сильное электронное отталкивание между карбоксилат-анионами в ободах и богатой электронами полости пиллар[5]аренов. Кроме того, хотя радиусы NH_4^+ и K^+ были одинаковыми (1,43 Å и 1,38 Å соответственно), пиллар[5]арен- NH_4 имел самый низкий вращательный барьер, что объясняется дополнительной водородной связью между ионом аммония и карбоксилатным кислородом.

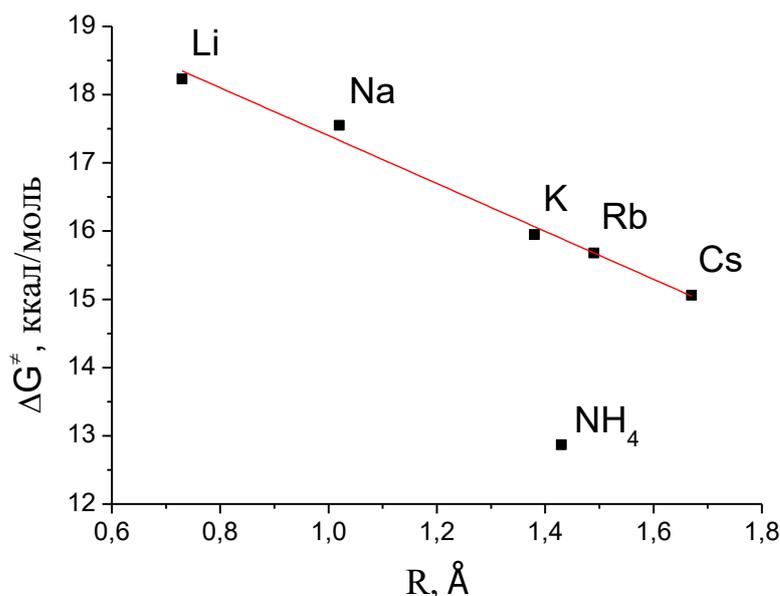


Рисунок 10 – Зависимость свободной энергии Гиббса ΔG^\ddagger от катионного радиуса

Для подтверждения данной теории нами смоделирована пространственная структура пиллар[5]арен-NH₄. Оптимизация пространственной геометрии образца проводилась в ПО Hyperchem. Расчет выполнялся без учета растворителя (т.е. в вакууме). Общий заряд молекулы пиллар[5]арена равен -10, энергия после оптимизаций равнялась -13263 ккал/моль, а общий заряд пиллар[5]арен-NH₄ равен 0, теплота образования - 20133 ккал/моль, расстояние между карбоксильным кислородом и ионом аммония около 1.7 Å (рисунок 11).

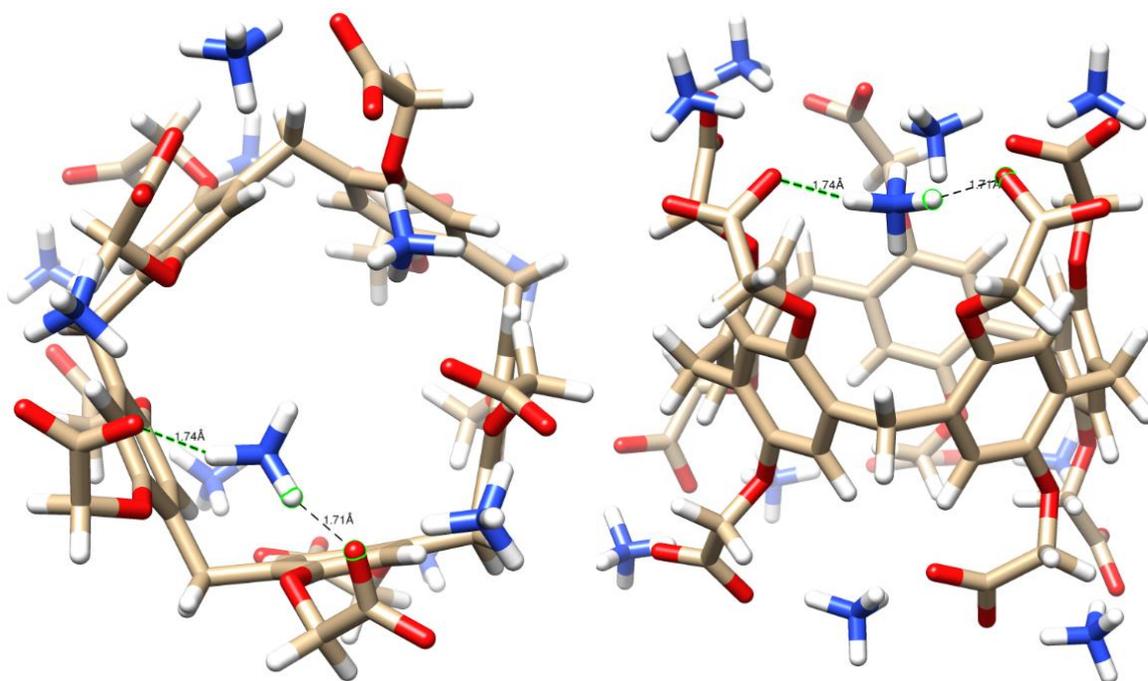


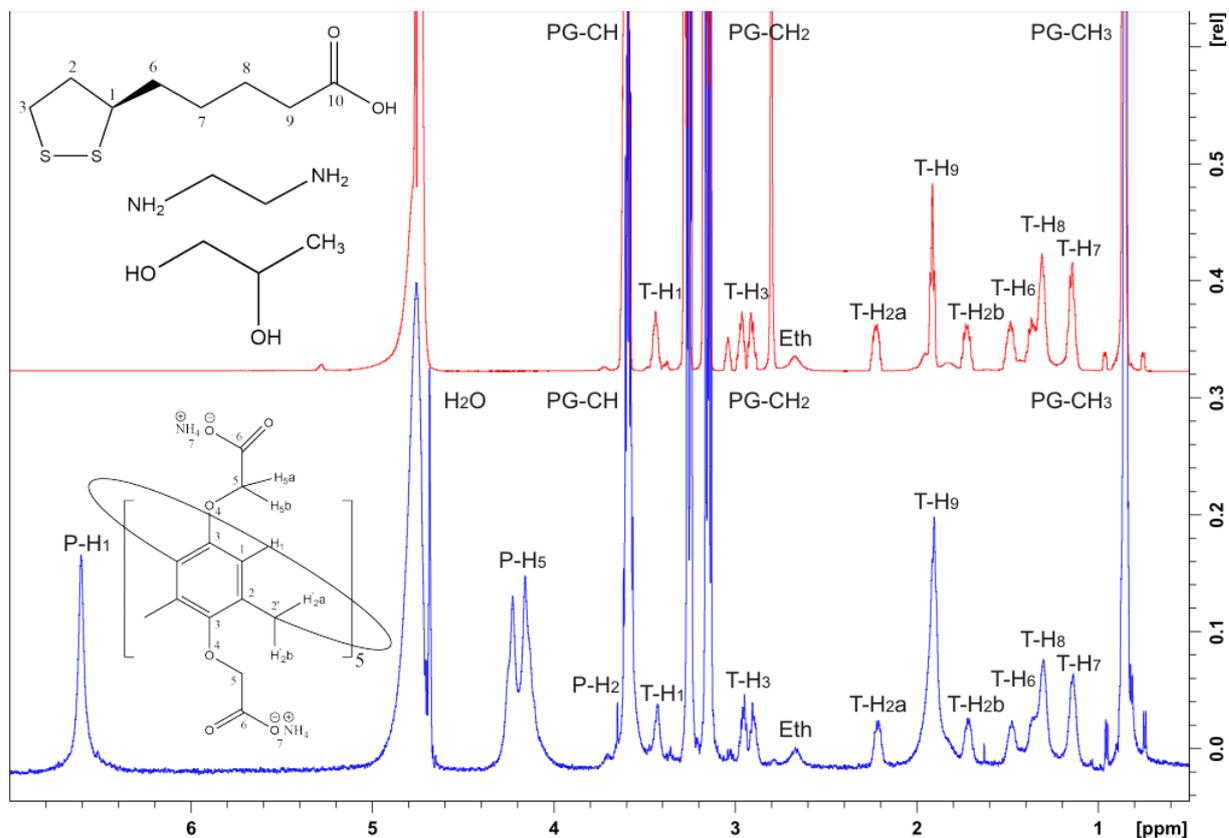
Рисунок 11 – Предполагаемая молекулярная модель пиллар[5]арен-NH₄

На основании полученных результатов с помощью моделирования получен вывод, что у пиллар[5]арен-NH₄ присутствуют водородные связи между ионом аммония и карбоксилатным кислородом.

3.4 Пространственная структура комплекса

По литературным данным известно, что пиллар[5]арены претерпевают конформационную инверсию гидрохиноновых звеньев [28, 29]. По-видимому, инкапсуляция гостевой молекулы в полость пиллар[5]арена должна заморозить процесс инверсии кольца. В работе использовалась α -липовая кислота в качестве гостя, чтобы проверить это.

Для соотнесения спектральных линий ЯМР спектров были записаны одномерные спектры α -липовой кислоты в водном растворе ($\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O} / 90\% + 10\%$) и комплекса пиллар[5]арена с α -липовой кислотой в растворе D_2O и в водном растворе ($\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O} / 90\% + 10\%$) при температуре 281 К. Для калибровки спектра использовали соединение ТСП (3-триметилсилилпропионовая-2,2,3,3-d4-кислота, натриевая соль).



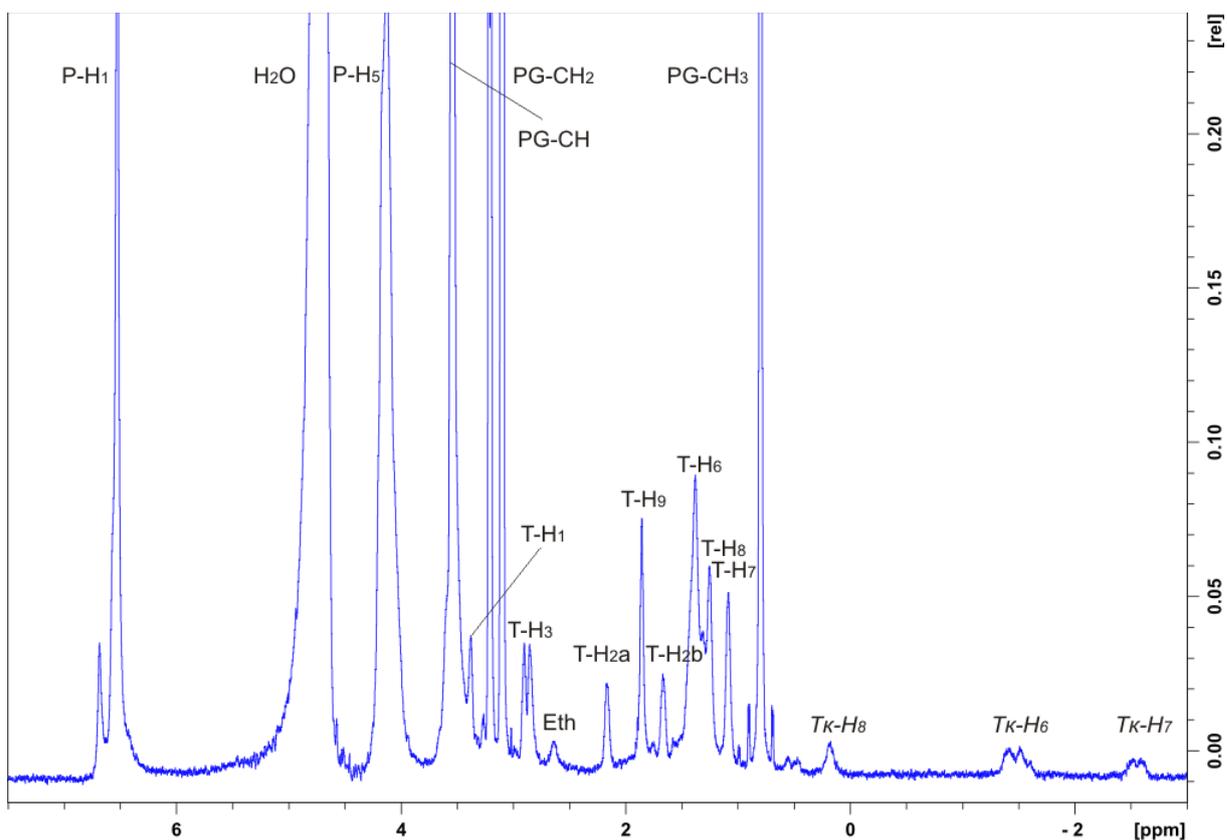


Рисунок 12 – Спектры ^1H ЯМР: а) смеси α -липоевой кислоты, этилендиамина и пропиленгликоля; б) фрагмент спектра комплекса пиллар[5]арена с α -липоевой кислотой и этилендиамином в растворе D_2O ; в) полный спектр комплекса пиллар[5]арена 1 с α -липоевой кислотой и этилендиамином в растворе смеси $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ (v/v 10%/90%), видны сигналы инкапсулированной α -липоевой кислоты в сильных полях

Для более подробного анализа пространственной структуры комплекса пиллар[5]арена с α -липоевой кислотой рассмотрим рисунок 12 б, в. На представленных спектрах наблюдаются резонансные сигналы от групп протонов пиллар[5]арена: P-H₁ (протоны гидрохиноновых фрагментов), P-H₂ (протоны метильной группы), P-H₅ (протоны ацетаммониевых заместителей); α -липоевой кислоты (T-H₁ – T-H₉, Tk-H₆ – Tk-H₈); пропиленгликоля (PG-CH, PG-CH₂, PG-CH₃); этилендиамина (Eth) и остаточный сигнал от воды с химическим сдвигом 4,7 м.д. Стоит обратить внимание на сигнал от этилендиамина, у него наблюдается уширение спектральной линии и изменение положения химического сдвига в определенном диапазоне, тем

самым, можно сделать предположение, что молекула находится в быстром химическом обмене.

С помощью ЯМР-спектра 2D ^1H - ^1H -NOESY были выявлены межмолекулярные сигналы между пиллар[5]ареном и α -липоевой кислотой. Также стоит отметить, что сигналы α -липоевой кислоты удвоились и сместились в область сильных полей, что говорит о инкапсуляции данной кислоты в полость пиллар[5]арена. Сигналы ЯМР α -липоевой кислоты в спектре NOESY соединены кросс-пиками, что указывает на пути медленного химического обмена между обмениваемыми протонами. Эти перекрестные пики использовались для отнесения сигналов инкапсулированной α -липоевой кислоты. Также в спектре NOESY наблюдались межмолекулярные кросс-пики между H6 α -липоевой кислотой и протонами H1 и H5 пиллар[5]арена (отмечены красными кружками на рисунок 13). Это доказывает, что часть α -липоевой кислоты была инкапсулирована во внутреннюю полость пиллар[5]арена.

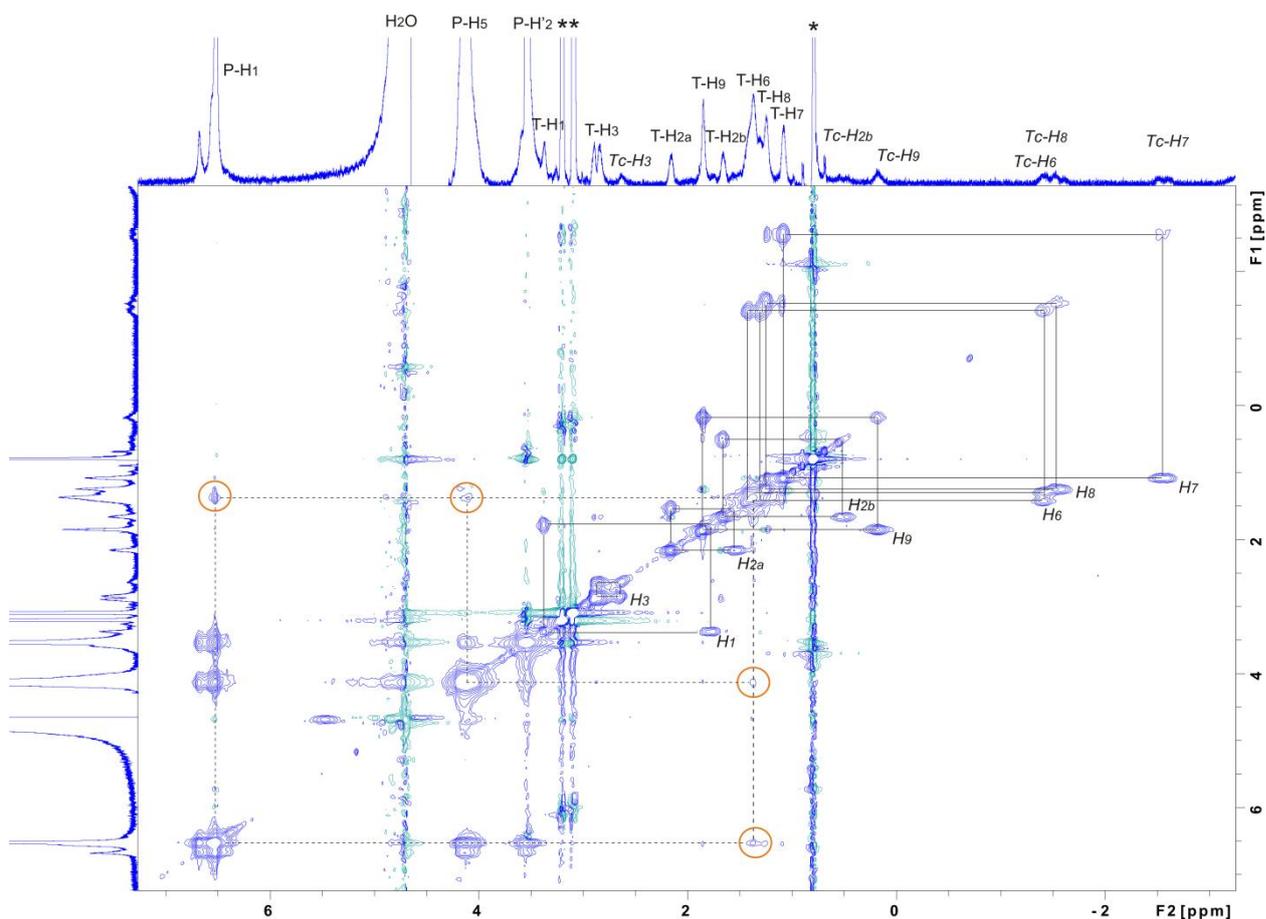


Рисунок 13 – ^1H - ^1H -NOESY спектр комплекса пиллар[5]арена с α -липоевой кислотой (1:1, 1 мМ) в водном растворе при температуре 277 К, время смешивания 0,5 с. Сигналы, образованные за счет межмолекулярного ЯЭО обведены красными кружками. Они являются доказательством образования комплекса включения

На основании анализа полученных спектров, сделан вывод об образовании комплекса пиллар[5]арена с α -липоевой кислотой, построена их предполагаемая молекулярная модель. Оптимизация пространственной геометрии комплекса проводилась в ПО Hyperchem. Расчет выполнялся без учета растворителя (т.е. в вакууме). Общий заряд молекулы пиллар[5]арена равен -10, энергия образования комплекса 1098011 ккал/моль, расстояние между протонами группы T-H₆ α -липоевой кислоты и P-H₁ пиллар[5]арена около 3.3 Å.

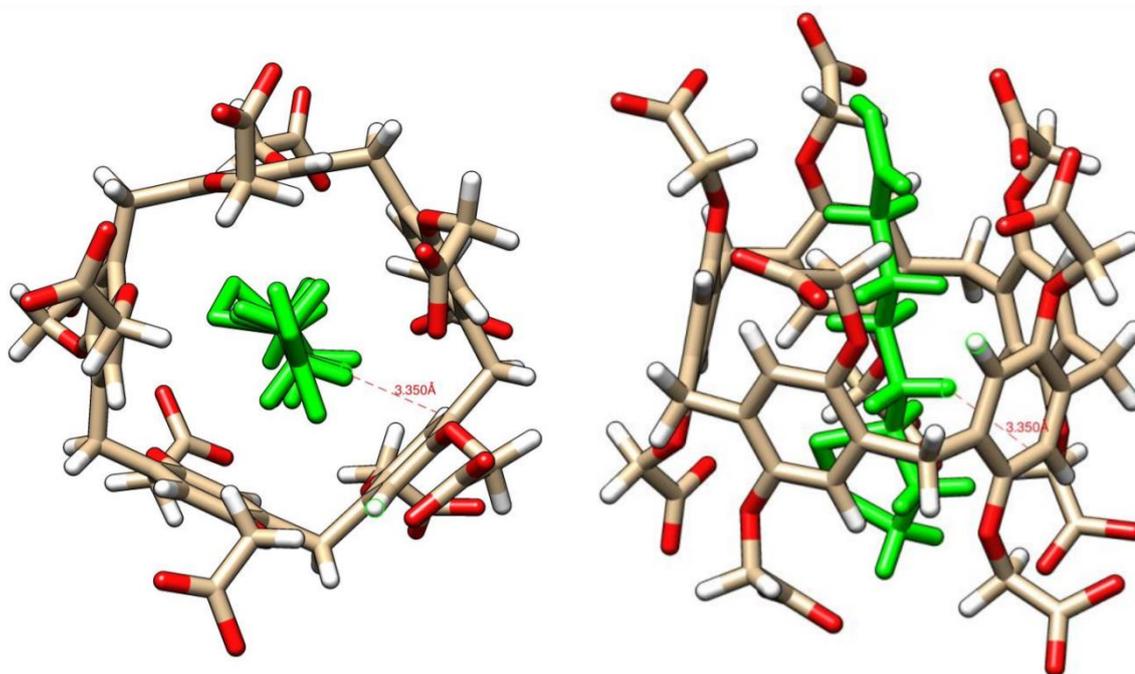


Рисунок 14 – Предполагаемая молекулярная модель, показывающая образование комплекса между α -липоевой кислотой и пиллар[5]ареном

3.5 Исследование внутримолекулярной динамики комплекса

Для исследования внутримолекулярной динамики была использована одномерная последовательность КПМГ. Для выполнения поставленной задачи были подготовлены образцы комплекса пиллар[5]арена с концентрацией 1 ммоль с α -липоевой кислотой, концентрация которых была в избытке (3 мМ, А случай) и в недостатке (0,1 мМ, Б случай) в растворе 100% D₂O.

¹H ЯМР КПМГ спектры регистрировались в температурном диапазоне от 275 К до 297 К для протонов H₁ пиллар[5]арена. В качестве внешнего эталона калибровки температуры использовался образец метанола. Ширина 90-градусных импульсов последовательности КПМГ калибровалась в диапазоне 8,33 ÷ 8,95 мкс, частота несущей ¹H совпадала с резонансной частотой воды. Период действия T_{КПМГ} = 60 мс.

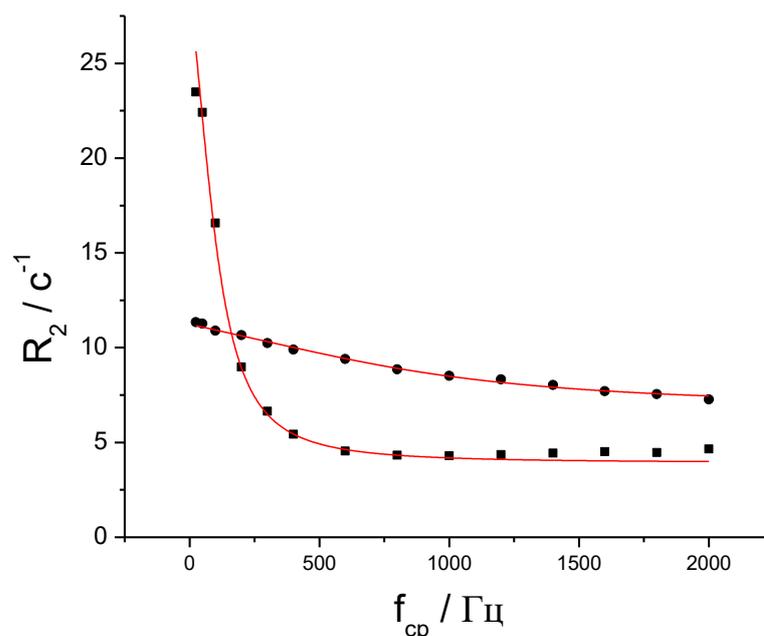


Рисунок 15 – Зависимость скорости поперечной релаксации от частоты следования (f_{cp}) 180° импульсов в последовательности КПМГ при температуре 277 К

Сравнивая значения константы скорости химического обмена протонов H_1 пиллар[5]арена в «свободном» состоянии $5700 \pm 400 \text{ c}^{-1}$ и в комплексе с α -липоевой кислотой $700 \pm 40 \text{ c}^{-1}$, можно сделать выводы, что инкапсуляция молекулы гостя в полость пиллар[5]арена затормаживает процесс инверсии гидрохинонового кольца.

Таблица 4 – Значения констант скоростей химического обмена для спектральной линии P- H_1 при разных температурах

(А) T, К	275	281	285	289	293	297
k_{ex}, c^{-1}	773 ± 16	990 ± 30	1167 ± 14	1520 ± 50	1810 ± 20	2070 ± 30
(Б) T, К	275	281	285	289	293	297

k_{ex}, c^{-1}	2600±30	1930±40	1441±15	1160±20	798±12	800±20
------------------	---------	---------	---------	---------	--------	--------

Используя полученные значения констант химического обмена, были найдены термодинамические параметры конформационного равновесия комплекса пиллар[5]арена с α -липоевой кислотой.

Из зависимостей $\ln(k_{ex}/T)$ от $1/T$ можно рассчитать активационные параметры: энтальпию активации, энтропию активации и энергию Гиббса.

Рассмотрим случай А, когда в растворе концентрация лигандов больше концентрации пиллар[5]арена. Если зависимость константы скорости химического обмена от обратной температуры (б) можно аппроксимировать линейно в пределах экспериментальной ошибки, то смотря на зависимость обменного параметра от обратной температуры (а) четко видны 2 интервала. Тогда возвращаясь к предыдущей зависимости, в действительности присутствует небольшой перегиб при температуре 283 К, что говорит нам о наличии двух различных процессов в системе. Было предположено, что это обусловлено конкурентным взаимодействием α -липоевой кислоты и этилендиамина в комплексе с пиллар[5]ареном.

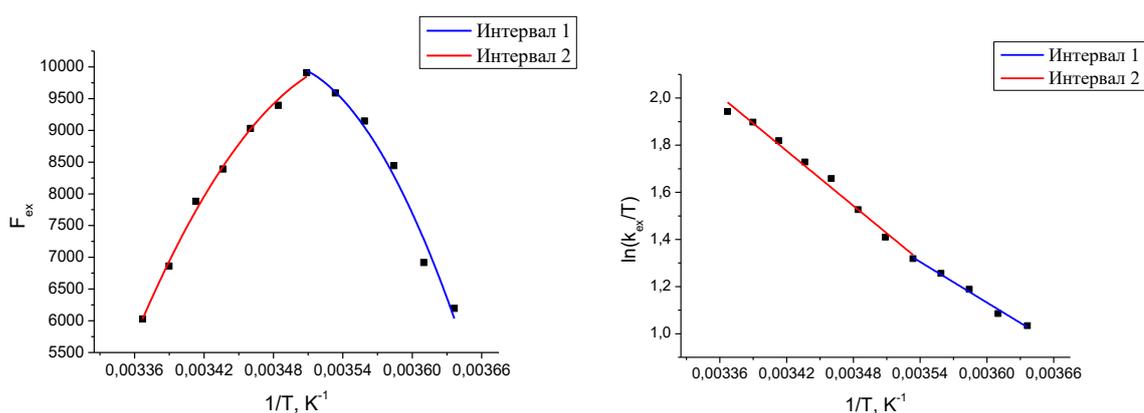


Рисунок 16 – Зависимости F_{ex} (а) и $\ln(k_{ex}/T)$ (б) от $1/T$, где $F_{ex} = p_a p_b (w_a - w_b)^2$ - обменный параметр, в котором p_a и p_b – заселенность состояний а и b, а w_a и w_b резонансные частоты

Значения термодинамических параметров, полученных в результате аппроксимации данных по формуле Эйринга при температуре 279 К приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Значения термодинамических параметров в случае А

	Интервал 1	Интервал 2
ΔH^\ddagger , кДж/моль	24±3	32±5
ΔS^\ddagger , Дж/Кмоль	-102±6	-72±7
ΔG^\ddagger_{279} , кДж/моль	52±3	53±4

При рассмотрении случая Б (лиганд находится в недостатке) система ведет себя более сложным образом. В данном случае наблюдаемая константа скорости химического обмена находится, как сумма констант скорости химического обмена в областях, где пиллар[5]арен не связан с лигандом (k_{ex1}), связан с α -липоевой кислотой (k_{ex2}) и взаимодействует с этилендиамином (k_{ex3}):

$$k_{ex} = p_1 k_{ex1} + p_2 k_{ex2} + p_3 k_{ex3} \quad (22)$$

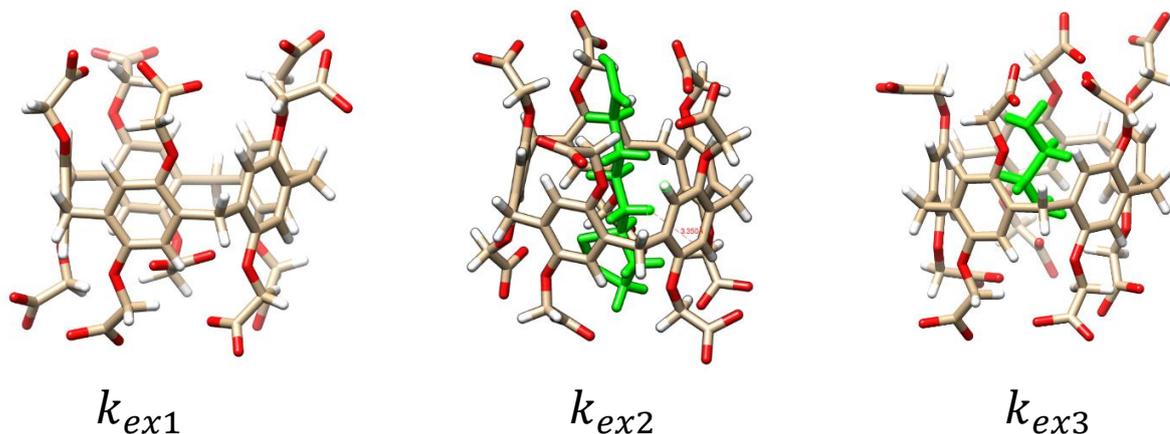


Рисунок 17 – Константа скорости химического обмена в областях, где пиллар[5]арен не связан с лигандом (k_{ex1}), связан с α -липоевой кислотой (k_{ex2}) и с этилендиамином (k_{ex3})

На зависимости константы скорости химического обмена от обратной температуры при низких температурах видно, что все лиганды инкапсулированы в полость пиллар[5]арена. С возрастанием температуры один из лигандов покидает полость. При этом, если выполняется условие, что скорость химического обмена покинутого лиганда куда превышает скорости «свободного» пиллар[5]арена, то при увеличении температуры доля свободного пиллар[5]арена будет также увеличиваться, при этом скорость второго лиганда изменяется медленно, тем самым наблюдаемая результирующая скорость обмена будет уменьшаться. Далее происходит некий переходной процесс. После чего с увеличением температуры также высвобождается и второй лиганд, тогда с увеличением температуры наблюдаемая константа скорости химического обмена будет возрастать.

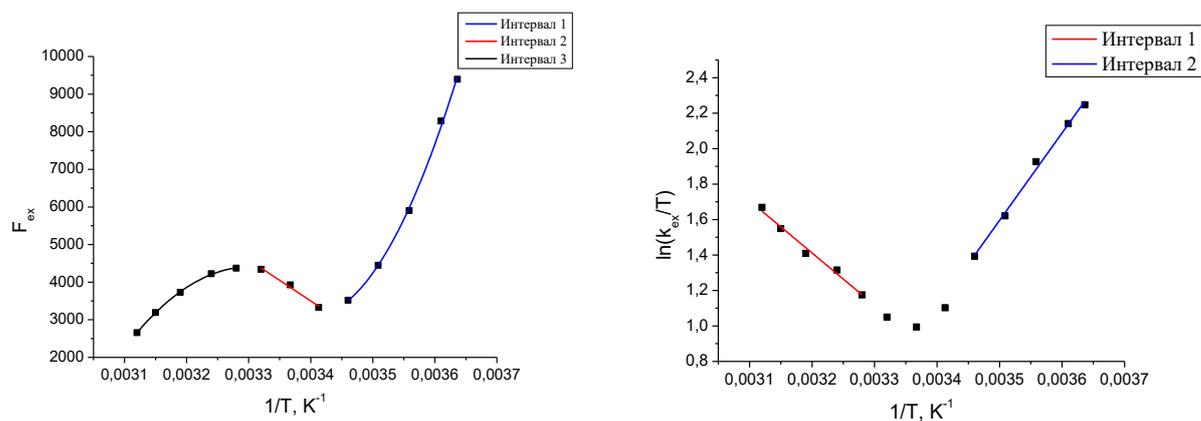


Рисунок 18 – Зависимости F_{ex} (а) и $\ln(k_{ex}/T)$ (б) от $1/T$

Таблица 6 – Полученные значения термодинамических параметров в случае Б

	Интервал 1	Интервал 2
ΔH^\ddagger , кДж/моль	-43 ± 5	23 ± 2
ΔS^\ddagger , Дж/Кмоль	-334 ± 9	-112 ± 5
ΔG^\ddagger_{279} , кДж/моль	50 ± 4	54 ± 2

На основании полученных результатов при рассмотрении различных случаев комплексообразования пиллар[5]арена с α -липоевой кислотой можно сделать выводы, что при малой концентрации лиганда в растворе происходит полное связывание с пиллар[5]ареном, межмолекулярный обмен при этом замедлится. При избытке α -липоевой кислоты по отношению к пиллар[5]арену, лигандов в свободной форме больше, соответственно, в конечном счете обмен между компонентами увеличится.

Недостатком метода ЯМР-спектроскопии является то, что из простого измерения КПМГ нельзя сделать вывод о характеристике движения протона Н1. Согласно литературным данным, А1/А2-дигидроксипиллар[5]арен

испытывает кислородное вращение всех пяти гидрохиноновых колец с энергетическим барьером 11,9 ккал/моль [29]. Полагаем, что вращение гидрохиноновых колец также имеет место для свободного пиллар[5]арена. Можно предположить, что это вращение будет заморожено при инкапсулировании избыточной тиоктовой кислоты во внутреннюю полость пиллар[5]арена. Но по полученным измерениям протон H_1 гидрохинонового кольца пиллар[5]арена в комплексе с α -липоевой кислотой все еще обладает подвижностью.

Заключение

В представленной работе методами ядерного магнитного резонанса высокого разрешения охарактеризована внутримолекулярная подвижность как «свободного» пиллар[5]арена, так и в комплексе с α -липоевой кислотой. На основании полученных результатов, сделаны следующие выводы:

1. Показано, что запись одномерных спектров ЯМР пиллар[5]арена с использованием импульсной последовательности Карра-Парселла-Мейбума-Гилла при различных значениях температуры и рН раствора с последующим анализом наблюдающихся изменений интегральных интенсивностей сигнала применима для получения информации о константе скорости химического обмена динамического процесса.

2. Доказано непосредственное влияние параметров внешних условий окружающей среды, такие как температура и значение рН раствора, на внутримолекулярную динамику процессов, происходящих в пиллар[5]арене. Увеличение рН раствора приводит к уменьшению константы скорости химического обмена.

3. Предложено, что внутримолекулярные водородные связи между ионом аммония и карбоксилатным кислородом оказывают решающее влияние на вращательные барьеры гидрохиноновых звеньев в пиллар[5]аренах.

4. С помощью двумерного ЯМР-спектра ^1H - ^1H -NOESY выявлено инкапсулирование α -липоевой кислотой во внутреннюю полость пиллар[5]арена, что подтверждает образование комплекса включения.

5. Измерения константы скорости химического обмена протонов H_1 пиллар[5]арена выполненные на основе импульсной последовательности КПМГ показали, что инкапсуляция α -липоевой кислоты в полость пиллар[5]арена приводит к уменьшению подвижности гидрохиноновых звеньев.

Список публикаций автора по теме выпускной квалификационной работы

Статьи и работы:

Sharipova, L.V. Application of Carr-Purcell-Meiboom-Gill pulse sequence to determine intramolecular mobility of pillar[5]arene in complex with thioctic acid / L.V. Sharipova, I.I. Stoikov, Y.F. Zuev, B.I. Khairutdinov. – Текст: непосредственный // *Reviews and Advances in Chemistry*. – 2022. – Vol. 12. – P. 131–135.

Публикации в сборниках:

1. Применение импульсной последовательности Carr-Purcell-Meiboom-Gill для определения внутримолекулярной подвижности комплекса пиллар[5]арена с тиоктовой кислотой / Л.В. Шарипова, Б.И. Хайрутдинов, Ю.Ф. Зуев. – Текст: непосредственный // Сборник тезисов Школы-конференции для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (с международным участием) / Изд-во «ИОФХ им. А.Е. Арбузова ФГБУН «ФИЦ КазНЦ РАН». – Казань. – 2021. – С. 149.

2. Sharipova, L.V. Intermolecular Mobility of Pillar[5]arene – α -Lipoic Acid Complex by NMR Spectroscopy Data / L.V. Sharipova, E.A. Ermakova, A.N. Turanov, B.I. Khayrutdinov, Y.F. Zuev. – Текст: непосредственный // *Modern development of magnetic resonance. Abstracts of the international conference*. – Kazan. – 2021 – P. 225.

3. Шарипова, Л.В. Исследование внутримолекулярной подвижности комплекса пиллар[5]арена с тиоктовой кислотой / Л.В. Шарипова. – Текст: непосредственный // Итоговая научно-образовательная конференция студентов Казанского федерального университета 2022 года: сб. тезисов. – Казань. – 2022. – С. 213–214.

4. Шарипова, Л.В. Внутримолекулярная динамика комплекса пиллар[5]арена с тиоктовой кислотой / Л.В. Шарипова. – Текст: непосредственный // IX Международный молодежный научный медицинский форум «Белые цветы» [Электронный ресурс]: сборник статей по итогам конференции. – Казань: под общей редакцией проректора Казанского ГМУ д.м.н., проф. Д.И. Абдулганиевой. – Казань. – 2022. – С. 272–273.

5. L.V. Sharipova, Internal mobility of hydroquinone pillar[5]arene fragment in a inclusion complex according to NMR spectroscopy data / L.V. Sharipova, B.I. Khayrutdinov, D.N. Shurpik, I.I. Stoikov, Y.F. Zuev. – Текст: непосредственный // 19th International School-Conference "Magnetic resonance and its application", Abstracts of the international conference. – Kazan. – 2022. – P. 242.

6. Шарипова, Л.В. Межмолекулярная подвижность комплекса пиллар[5]арена с тиоктовой кислотой по данным ЯМР спектроскопии / Л.В. Шарипова, Б.И. Хайрутдинов, Ю.Ф. Зуев. – Текст: непосредственный // Всероссийская научно-практическая конференции с международным участием "Интеграция наук: междисциплинарность в медицине". – Якутск. – 2022. – С. 187.

7. L.V. Sharipova, Mobility of the pillar[5]arene complex with thioctic acid according to NMR-data / L.V. Sharipova, B.I. Khayrutdinov, D.N. Shurpik, I.I. Stoikov, Yu.F. Zuev. – Текст: непосредственный // VIII Euro-Asian Symposium "Trends in Magnetism". – Kazan. – 2022. – P. 291.

8. L.V. Sharipova, Influence of environment parameters on the internal mobility of pillar[5]arene according to NMR spectroscopy data / L.V. Sharipova, A.N. Turanov, B.I. Khayrutdinov, Y.F. Zuev. – Текст: непосредственный // Modern development of magnetic resonance. Abstracts of the international conference. – Kazan. – 2022. – P. 196.

9. Шарипова, Л.В. Зависимость внутримолекулярной динамики пиллар[5]арена от кислотности среды / Л.В. Шарипова, Б.И. Хайрутдинов,

Ю.Ф. Зуев // IX Всероссийский молодежный научный форум с международным участием "Open Science 2022". – Гатчина. – 2022. – С. 114.

10. L.V. Sharipova, The environment effect on the intramolecular mobility of pillar[5]arene / L.V. Sharipova, B.I. Khayrutdinov, Yu.F. Zuev. – Текст: непосредственный // 20th International School-Conference "Magnetic resonance and its application". – Kazan. – 2023. – P. 232.

Список литературы

1. Гюнтер Х. Введение в курс спектроскопии ЯМР / Х. Гюнтер. Пер. с англ. – М.: Мир. – 1984. – 478 с. – Текст: непосредственный.
2. Дероум, Э. Современные методы ЯМР для химических исследований / Э. Дероум. Пер. с англ. – М.: Мир. – 1992. – 401 с. – Текст: непосредственный.
3. Нааске, Е. М. Magnetic resonance imaging: physical principles and sequence design / Е. М. Нааске, R. W. Brown, Y. C. N. Cheng, M. R. Thompson, R. Venkatesan. – Текст: непосредственный // John Wiley. – 2014. – P. 976.
4. Bain, A. D. Chemical exchange in NMR / A. D. Bain. – Текст: непосредственный // Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy. – 2003. – Vol. 43. – No. 3. – P. 63–104.
5. Derome, A. E. Modern NMR techniques for chemistry research / A. E. Derome. – Текст: непосредственный // Elsevier. – 2013. – P. 299.
6. Claridge, T. D. W. Techniques in organic chemistry / T. D. W. Claridge. – Текст: непосредственный // Tetrahedron Organic Chemistry Series. – 1999. – Vol. 19. – P. 87–94.
7. Carr, H. Y. Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments / H. Y. Carr, E. M. Purcell. – Текст: непосредственный // Physical review. – 1954. – Vol. 94. – No. 3. – P. 630–638.
8. Hahn, E. L. Spin echoes / E. L. Hahn. – Текст: непосредственный // Physical review. – 1950. – Vol. 80. – No. 4. – P. 580.
9. Meiboom, S. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times / S. Meiboom, D. Gill. – Текст: непосредственный // Review of scientific instruments. – 1958. – Vol. 29. – No. 8. – P. 688–691.
10. Findeisen, M. A ^1H -NMR thermometer suitable for cryoprobes / M. Findeisen, T. Brand, S. Berger. – Текст: непосредственный // Magnetic Resonance in Chemistry. – 2007. – Vol. 45. – No. 2. – P. 175–178.

11. Keeler, J. *Understanding NMR Spectroscopy* / J. Keeler. – Текст: непосредственный // – Cambridge. – 2002. – P. 4–38.
12. Neuhaus, D. *The nuclear Overhauser effect in structural and conformational analysis* / D. Neuhaus, M.P. Williamson. – Текст: непосредственный // VCH Publishers. – New York. – 2000. – P. 656.
13. Friebolin, H. *Basic one-and two-dimensional NMR spectroscopy* / H. Friebolin, J. K. Beconsall. – Текст: непосредственный // Weinheim: Wiley-vch. – 2005. – Vol. 7. – P. 442.
14. Palmer III, A. G. *NMR characterization of the dynamics of biomacromolecules* / A. G. Palmer III. – Текст: непосредственный // *Chemical reviews*. – 2004. – Vol. 104. – No. 8. – P. 3623–3640.
15. Luz, Z. *Nuclear magnetic resonance study of the protolysis of trimethylammonium ion in aqueous solution—order of the reaction with respect to solvent* / Z. Luz, S. Meiboom. – Текст: непосредственный // *The Journal of Chemical Physics*. – 1963. – Vol. 39. – No. 2. – P. 366–370.
16. Strutt, N. L. *Stereochemical inversion in difunctionalised pillar [5]arenes* / N. L. Strutt, S. T. Schneebeli, J. F. Stoddart. – Текст: непосредственный // *Supramolecular Chemistry*. – 2013. – Vol. 25. – No. 9-11. – P. 596–608.
17. Ogoshi, T. *Synthesis and conformational characteristics of alkyl-substituted pillar[5]arenes* / T. Ogoshi, K. Kitajima, T. Aoki. – Текст: непосредственный // *The Journal of Organic Chemistry*. – 2010. – Vol. 75. – No. 10. – P. 3268–3273.
18. Ogoši, T. *Para-Bridged symmetrical pillar[5]arenes: their Lewis acid catalyzed synthesis and host-guest property* / T. Ogoši, S. Kanai, S. Fujinami, T. A. Yamagishi, Y. Nakamoto. – Текст: непосредственный // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – V.130. – No. 15. – P. 5022–5023.
19. Cremer, P. S. *Collaborative routes to clarifying the murky waters of aqueous supramolecular chemistry* / P. S. Cremer, A. H. Flood, B. C. Gibb, D. L. Mobley. – Текст: непосредственный // *Nature chemistry*. – 2018. – Vol. 10. – No. 1. – P. 8–16.

20. Waugh, J. S. Approach to high-resolution NMR in solids / J. S. Waugh, L. M. Huber, U. Haeberlen. – Текст: непосредственный // *Physical Review Letters*. – 1968. – Vol. 20. – No. 5. – P. 180.
21. Ronczka, M. Optimization of CPMG sequences to measure NMR transverse relaxation time T_2 in borehole applications / M. Ronczka, M. Müller-Petke. – Текст: непосредственный // *Geoscientific Instrumentation, Methods and Data Systems*. – 2012. – Vol. 1. – No. 2. – P. 197–208.
22. Xue, M. Pillararenes, a new class of macrocycles for supramolecular chemistry / M. Xue, Y. Yang, X. Chi, Z. Zhang, F. Huang. – Текст: непосредственный // *Acc. Chem. Res.* – 2012. – Vol. 45. – P. 1294–1308.
23. Kaizerman-Kane, D. pH-Responsive Pillar[6]arene-based Water-Soluble Supramolecular Hexagonal / D. Kaizerman-Kane, M. Hadar, N. Tal, R. Dobrovetsky, Y. Zafrani, Y. Cohen. – Текст: непосредственный // *Angewandte Chemie*. – 2019. – Vol. 131. – No. 16. – P. 5356–5360.
24. Wittenberg, J. B. Supramolecular chemistry: from molecules to nanomaterials / J. B. Wittenberg, L. Issacs. – Текст: непосредственный // *Steed*. – 2012. – Vol. 1. – P. 25–43.
25. Murray, J. The aqueous supramolecular chemistry of cucurbit[n]urils, pillar[n]arenes and deep-cavity cavitands / J. Murray, K. Kim, T. Ogoshi, W. Yao, B. C. Gibb. – Текст: непосредственный // *Chemical Society Reviews*. – 2017. – Vol. 46. – No. 9. – P. 2479–2496.
26. Ogoshi, T. Pillar-shaped macrocyclic hosts pillar[n]arenes: new key players for supramolecular chemistry / T. Ogoshi, T. A. Yamagishi, Y. Nakamoto. – Текст: непосредственный // *Chemical reviews*. – 2016. – Vol. 116. – No. 14. – P. 7937–8002.
27. Zheng, H. Cation Grease/Brake Rotation in Anionic Pillar[5]arenes and Its Application for Fluorescence Switch / H. Zheng, L. Fu. – Текст: непосредственный // *Research Square*. – 2022. – P. 1–19.
28. Yang, K. Recent advances in pillar[n]arenes: synthesis and applications based on host–guest interactions / K. Yang, Y. Pei, J. Wen, Z. Pei. –

Текст: непосредственный // *Chemical Communications*. – 2016. – Vol. 52. – No. 60. – P. 9316–9326.

29. Strutt, N. L. Stereochemical inversion in difunctionalised pillar [5] arenes / N. L. Strutt, S. T. Schneebeli, J. F. Stoddart. – Текст: непосредственный // *Supramolecular Chemistry*. – 2013. – Vol. 25. – No. 9-11. – P. 596–608.