

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

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ
КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

Направление: 03.03.02 Физика
Профиль: Физика

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

ИССЛЕДОВАНИЕ КОНЬЮГАТА ПИНАНОВОГО ТЕРПЕНОИДА С
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ МАРКЁРОМ В РАСТВОРЕ МЕТОДАМИ
СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

Студент 4 курса группы 06-711 (06-712)

«18» июня 2021 г.



(Холбоева К.В.)

Научный руководитель

д.х.н., профессор

«18» июня 2021 г.

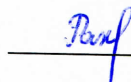


(Ключков В.В.)

Научный консультант

к.ф.-м.н., ассистент

«18» июня 2021 г.

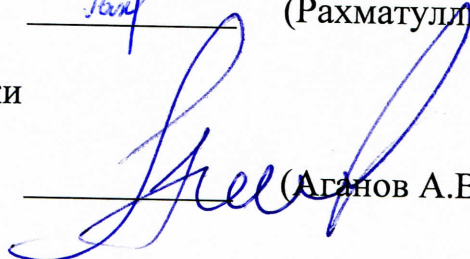


(Рахматуллин И.З.)

Заведующий кафедрой медицинской физики

д.х.н., профессор

«18» июня 2021 г.



(Аганов А.В.)

Содержание

ВВЕДЕНИЕ	3
1 ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.....	6
1.1 Ядерный магнитный резонанс	6
1.2.1 COSY ЯМР эксперимент.....	11
1.2.2 HSQC ЯМР эксперимент.....	12
1.2.3 HMBC ЯМР эксперимент.....	12
1.2 Терпеноиды.....	12
2 ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	16
2.2 ЯМР-исследование образца I (S15).....	16
2.3 ЯМР-исследование образца II (BODIPY).....	20
2.4 ЯМР-исследование конъюгатного образца III (S15Lum)	23
3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ. ... Ошибка! Закладка не определена.	
ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.....	
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	28

Введение

Одной из важнейших проблем современной науки является определение структуры молекул, взаимного расположения атомов в ней. Эффективным методом для решения этой задачи является метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Особенностью данного метода (ЯМР высокого разрешения (ВР)), является то, что по мультиплетности и положению резонансных линий в спектрах мы можем узнать о расположении отдельных атомов или групп атомов в молекулах. При применении специальных методик мы можем обнаружить различия даже для магнитно-эквивалентных атомов.

Информация, которую дает ЯМР метод выгодно отличается от конкурирующих с ним других аналитических методов. Это, в свою очередь, позволило сделать качественный скачок в области фармакологии, биомедицине и многих других областях науки.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) является одним из наиболее мощных инструментов, позволяющих устанавливать пространственную структуру соединений, что и необходимо знать при разработке медикаментов.

В настоящее время для установления структуры вещества вместе с одномерными спектрами ЯМР на различных ядрах используют спектры, позволяющие решать проблемы с перекрытием сигналов, - двумерные. Использование двумерных методик ЯМР спектроскопии привело к тому, что процесс определения химической и пространственной структуры исследуемого образца стал намного проще.

Образование тромба инициируется реорганизацией тромбоцитов, что приводит к их адгезии, агрегации и активации факторов свертывания крови. Поэтому в настоящее время ведётся поиск и разработка новых лекарственных соединений, способных ингибировать активность тромбоцитов. В рамках действующего проекта РНФ-20-112 «Новые подходы к снижению устойчивости микроорганизмов к антибиотикам при смешанных инфекциях: поиск новых антимикробных субстанций на основе полусинтетических тиотерпеноидов, характеристика молекулярных мишеней и механизмов действия, разработка

эффективной системы доставки антимикробных агентов и ее визуализация с помощью конъюгатов с BODIPY-люминофорами» в Казанском федеральном университете были синтезированы три соединения терпенового ряда, обладающих не только антиагрегационной и антикоагулянтной активностью, но также являющихся флуорофорами, т.е. они могут быть использованы разнообразными способами, чаще всего - в качестве метки. В целях разработки подходов к созданию новых лекарственных средств на их основе для лечения и профилактики атеросклероза требуется их исследование методами спектроскопии ЯМР высокого разрешения, куда входит установление их пространственного строения и механизма взаимодействия с модельными клеточными мембранами. Но начальным этапом всех ЯМР исследований стоит получение и обработка спектров и задача соотнесения сигналов в спектре к конкретным атомам молекулы. Нужно отметить, что эта задача хоть и самая простая по сравнению с последующими задачами с применением метода ЯМР, но в то же время и самая ответственная, поскольку от качества выполнения этой задачи зависят все остальные этапы исследования.

Химические структурные формулы исследуемых веществ:

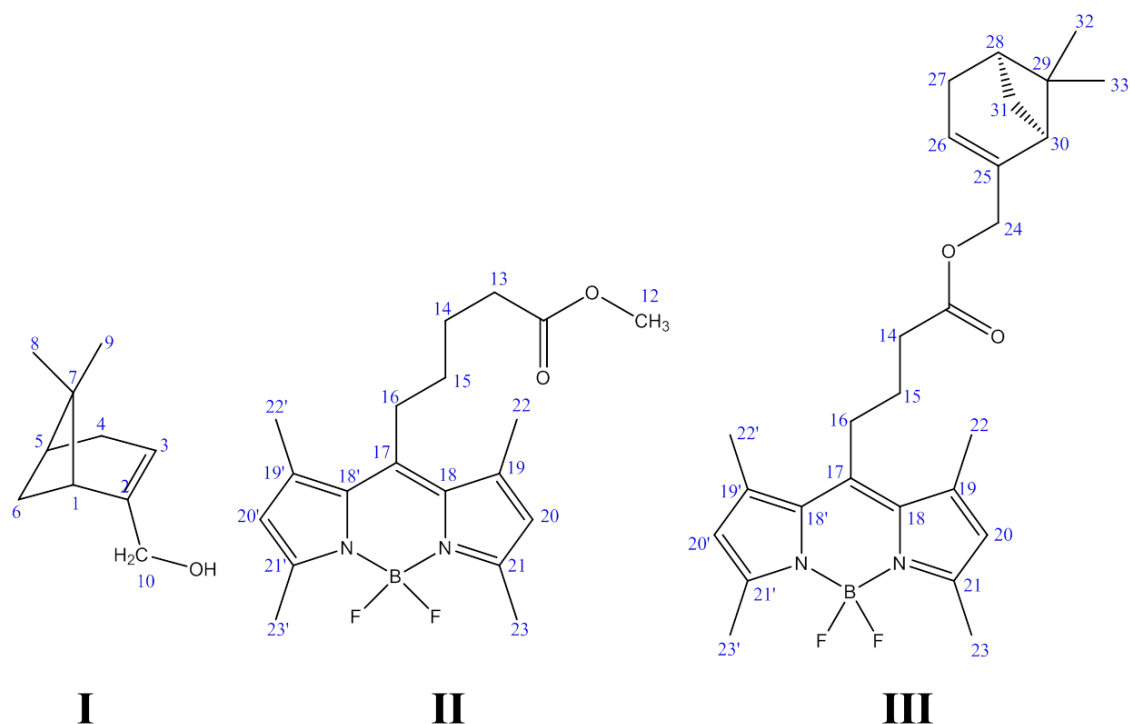


Рисунок 1 – Химические структуры исследуемых образцов:

S15 (I), BODIPY (флуоресцентный маркер) (II), S15Lum (конъюгат) (III)

Первое соединение монотерпеноид с пинановым циклом. Второе соединение - флуоресцентная молекула, относящаяся к важному классу красителей. Третье соединение – конъюгат монотерпеноида с BODIPY-люминофором, которое было химически синтезировано в нашем университете.

Целью работы являлось спектральное исследование трёх соединений терпенового ряда в растворе методами спектроскопии ЯМР высокого разрешения.

Задачами выпускной квалификационной работы являлись:

- Проведение литературного обзора для исследуемых соединений;
- Проведение экспериментов ЯМР (^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBSC) в растворе хлороформа при комнатной температуре для исследуемых соединений I-III; Все ЯМР эксперименты проводились в 5 мм ампулах на приборе фирмы Bruker с рабочей частотой 700 МГц на протонах.
- Анализ полученных результатов. Отнесение полученных спектров ЯМР ^1H , ^{13}C для исследуемых соединений I-III.

1 ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1.1 Ядерный магнитный резонанс

Явление ядерного магнитного резонанса (ЯМР) заключается в резонансном поглощении или испускании электромагнитной энергии системой спинов, помещенных во внешнее магнитное поле. Рассмотрим классическую модель, описывающую поведение магнитных моментов ядер μ_i со спинами $I_i=1/2$ в постоянном магнитном поле \mathbf{B}_0 . Далее введем лабораторную систему координат, в которой вектор \mathbf{B}_0 направлен по оси z лабораторной системы координат (Рисунок 1).

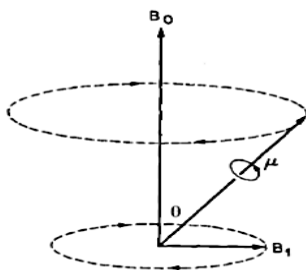


Рисунок 2 – Расположение полей \mathbf{B}_0 , и \mathbf{B}_1 в лабораторной системе координат и прецессия вектора μ_i в магнитном поле \mathbf{B}_0

Когда система спинов помещена в магнитное поле, то каждый спин принимает одно из двух возможных ориентаций относительно направления магнитного поля \mathbf{B}_0 с высокой энергией (μ_i антипараллелен \mathbf{B}_0) и низкой энергией (μ_i ориентирован по полю \mathbf{B}_0). Если воздействовать на такую систему радиочастотным полем \mathbf{B}_1 (вектор этого поля всегда локализуется в плоскости xy), с энергией кванта $h\nu_0 = \Delta E$ (где ν_0 – резонансная частота, ΔE – это разность энергий), то произойдет поглощение этого кванта. Таким образом осуществится переход системы с низкого энергетического уровня на более высокий и это поглощение может быть зарегистрировано. Это и составляет основу спектроскопии ЯМР.

Сумма всех векторов намагниченности всех спинов является макроскопической намагниченностью \mathbf{M} . Подбирая длительность воздействия поля \mathbf{B}_1 можно добиться отклонения \mathbf{M} на любой угол. При воздействии 90° -м радиочастотным импульсом (р.ч.) \mathbf{M} окажется перпендикулярным к направлению \mathbf{B}_0 . При этом в приемно-передающей

катушке возникнет напряжение (сигнал свободой индукции) с амплитудой A_0 . Амплитуда этого сигнала является убывающей функцией, так как \mathbf{M} в итоге релаксирует к своему первоначальному значению (Рисунок 3).

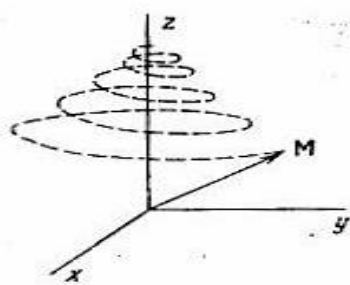


Рисунок 3 – Прецессия вектора \mathbf{M} при релаксации

Различают два вида релаксации. Первый вид: спин-решеточная релаксация, характеризующаяся временной константой T_1 – это релаксация продольной составляющей M_z к равновесному значению M_0 , в результате взаимодействия возбужденных ядерных спинов с его окружением (решеткой). Второй вид: спин-спиновая релаксация – изменение во времени поперечной составляющей \mathbf{M} за время T_2 из-за необратимой потери фазовой когерентности между векторами магнитных моментов ядер. Импульсные методы предоставляют возможность точного определения времен релаксаций.

Для измерения T_1 используется радиочастотная (р.ч.) последовательность $180^\circ - \tau - 90^\circ$ с разными τ (время между двумя последовательными импульсами). В результате можно найти скорость спада M_z . Количественно спад описывается уравнениями Блоха при $M_x = M_y = 0$:

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{-(M_z - M_0)}{T_1}, \text{ где } M_0 = M. \quad (1)$$

Интегрированием с начальными условиями $M_z = -M_0$ при $t=0$ получаем:

$$M_z = M_0[1 - 2\exp(-t/T_1)].$$

Но на практике это выражение обычно используется в виде:

$$A_\tau = A_\infty(1 - 2\exp(-\tau/T_1))$$

$$\ln(A_\infty - A_\tau) = \ln 2A_\infty - \tau/T_1,$$

где A_τ – начальная амплитуда индуцированного сигнала после 90-го импульса, приложенного в момент τ , а A_∞ – предельное значение A_τ при очень длительном интервале между 180 и 90 импульсами. Тогда T_1 определяется по

наклону графика зависимости $\ln(A_\infty - A_\tau)$ от τ .

Измерение же T_2 происходит методом спинового эхо. При действии 90-м р.ч. импульсом вектор \mathbf{M} поворачивается на 90 градусов относительно \mathbf{B}_0 , и его проекция на плоскость $xу$ становится равной M_{xy0} . Далее M_{xy0} начинает расфазировываться из-за того, что некоторые спины испытывают влияние величины магнитного поля, немного отличающейся от величины, испытываемой другими спинами и вектор намагниченности m_i этих спинов, вращается со своей собственной частотой. С увеличением прошедшего времени от начала расфазировки увеличивается и фазовая разница между m_i -ми. В момент времени τ прикладывается 180-й импульс, что приводит к принудительной фазировке всех m_i к моменту времени 2τ . Это обуславливает нарастание сигнала свободной индукции до максимума в этот момент времени. Однако все m_i спадают в течение времени 2τ из-за процессов поперечной релаксации с временным коэффициентом T_2 , а начальная величина поперечной намагниченности M_{xy0} меняется по экспоненциальному закону:

$$M_{xy} = M_{xy0} e^{-t/T_2}.$$

Запись спектра в ЯМР-спектрометрах происходит с помощью Фурье-преобразования спада сигнала свободно прецессирующих магнитных моментов ядер, после их возбуждения р.ч. импульсом. Фурье-преобразование – это математическая процедура разложения сигнала на частотные гармоники.

1.2 Химический сдвиг

Положения сигналов в спектрах ЯМР характеризуются химическим сдвигом их относительно эталонного сигнала.

Экспериментальные значения резонансных линий в ЯМР для ядер в атомах и молекулах отличаются от теоретического значения, рассчитанного для свободного ядра.

Это связано с эффектом экранирования, который обеспечивается влиянием локального магнитного поля. Оно, в свою очередь, создается внутри атома электронными токами, которые индуцируются внешним магнитным

полем.

Следствием вышесказанного является смещение резонансной частоты из-за химического окружения.

Это явление называется химическим сдвигом.

То есть, химический сдвиг - это явление смещения сигнала в экспериментах ЯМР ввиду разницы в константах экранирования.

Химический сдвиг выражается в миллионных долях (ppm) по частоте, и его можно описать следующей формулой:

$$\delta = \frac{\nu_{\text{обр}} - \nu_{\text{ст}}}{\nu_{\text{ст}}} * 10^6 \quad (??)$$

Химический сдвиг даёт нам представление о составе молекулы, химическом строении и динамических процессах внутри системы.

1.3 Общие принципы двумерной спектроскопии ЯМР

Результатом многомерного ЯМР эксперимента является спектр, в котором позиция спектральной линии, или пика, определяется двумя или более частотами. Существование таких пиков показывает, что участвующие спины связаны друг с другом посредством скалярного спин-спинового взаимодействия через химическую связь или дипольным-дипольным взаимодействием через пространство.

Основные принципы создания многомерного гомоядерного спектра, раскрывающего спин-спиновое взаимодействие, состоят в следующем.

Рассмотрим применение спектроскопии ЯМР к полипептидам - биополимерам, построенным из остатков аминокислот. Все протоны внутри аминокислотного остатка принадлежат одной группе скалярно связанных спинов, или спиновой системе. Исключение из этого правила составляют ароматические остатки, в которых протоны ароматического кольца формируют отдельную спиновую систему из-за слабой связи этих протонов с прочими ядрами боковой цепи данного остатка (такими, как протоны Н фенилаланина). Спины, принадлежащие одной спиновой системе, могут быть обнаружены с

помощью многомерной корреляционной спектроскопии. Определение типа остатка на основе свойств спиновой системы, таких, как число спинов и химический сдвиг, составляют важный шаг в соотнесении линий в белках.

Константа спин-спинового взаимодействия, которую можно извлечь из данных спектров, несет информацию о двугранных углах в молекуле.

Многомерные ЯМР эксперименты состоят из чередующихся комбинаций периодов кодирования химического сдвига и периодов смешивания, или переноса намагниченности. Периоды смешивания служат для переноса информации о химическом сдвиге с одного спина к другому, связанному с ним. Например, в двумерной спектроскопии ЯМР, описываемой схемой A – B, намагниченность берет начало на спине A, частотно закодированном с химическим сдвигом A, а затем переносится в течение периода смешивания на спин B. Спад намагниченности на спине B регистрируется обычным образом, как сигнал в приемной катушке. Итоговый регистрируемый сигнал теперь зависит от двух временных областей: первая внесла зависимость от ω^a , а вторая от частоты - ω^b .

Двукратное Фурье-преобразование этого сигнала даст двумерный спектр, который содержит два пика в позиции (ω^a, ω^b) и (ω^b, ω^a) . Этот тип пика называется кросс-пиком, потому что две частоты, определяющие положение пика, различны. В некоторых случаях, в частности в двумерных протонных экспериментах, существуют пики, имеющие одинаковые частоты в двух измерениях. Эти пики называются собственными, или диагональными, и представляют собой намагниченность, которая не была перенесена на другой спин в течение эксперимента.

Общая схема двумерного эксперимента приведена на рисунке 3. Любой двумерный ЯМР эксперимент состоит из четырех частей: подготовки, эволюции, смешивания и регистрации.

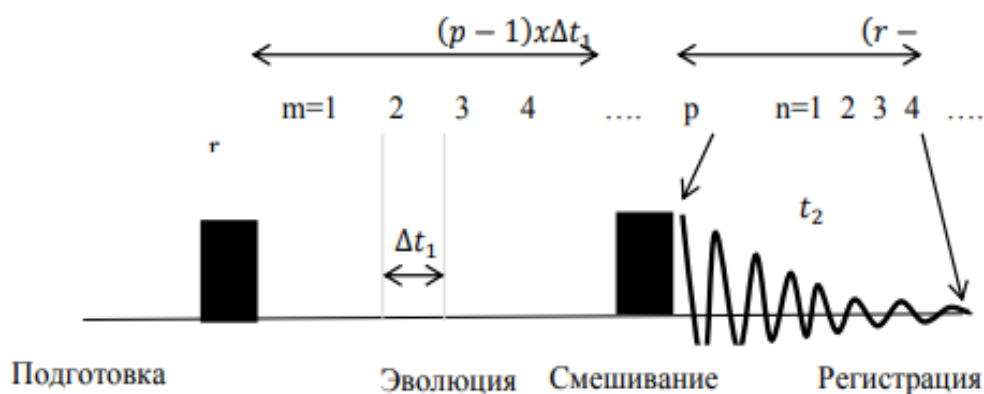


Рисунок 4 – Схема двумерного эксперимента ЯМР

Формирование поперечной намагниченности происходит в период подготовки, который обычно состоит из 90° -ного импульса. В свою очередь поперечная компонента намагниченности изменяется на протяжении времени эволюции. Во время периода смешивания происходит перенос поляризации между компонентами поперечной намагниченности. Во время регистрации, иначе говоря, детектирования сигналы фиксируются через равные промежутки времени.

1.3.1 COSY ЯМР эксперимент

Спектры данного эксперимента являются простой разновидностью гомоядерной двумерной спектроскопии ЯМР, используемой для определения корреляций химических сдвигов ^1H ядер, связанных между собой спин-спиновым взаимодействием.

Спектры, получаемые в результате эксперимента корреляционной спектроскопии, показывают частоты единичного изотопа, чаще всего водорода, по обоим осям.

Спектры COSY показывают два вида пиков:

1. Диагональные пики, выстраиваемые по диагонали спектра и обладающие одинаковой частотной координатой на каждой оси;
2. Кросс-пики, или недиагональные пики, находятся вне диагональной линии и обладают разным значением для каждой частотной координаты.

1.3.2 HSQC ЯМР эксперимент

HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) – гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия ЯМР.

Гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия ЯМР дает нам информацию о корреляции между атомными ядрами двух разных типов, разделенных одной связью. Данный метод дает один пик для пары связанных ядер, чьи две координаты — это химические сдвиги двух связанных атомов.

Связи проявляются в виде кросс-пиков, недиагональных пиков, которые располагаются на перпендикулярах, проведенных через сигналы в одномерных спектрах.

Данный метод дает возможность соотнесения сигналов всех связанных с протонами атомов углерода.

1.3.3 HMBC ЯМР эксперимент

Так как ^1H - ^{13}C HSQC эксперименту не удастся решить проблему соотнесения сигналов углерода, которые не связаны непосредственно с протонами, используется другой метод, в котором спин-спиновое взаимодействие выявляется иначе.

Для полного анализа наиболее сложной части углеродного спектра – области метиленовых атомов углерода – был проведен эксперимент по гетероядерной протон-углеродной корреляции HMBC, где пары кросс-пиков характеризуют спин-спиновое взаимодействие протонов с ядрами углерода через 2-4 связи.

Анализируя данные, полученные с помощью HMBC метода, можно определить скелет органических молекул.

1.4 Терпеноиды

Терпеноиды – удивительная группа вторичных метаболитов высших растений, которая не имеет аналогов по разнообразию структурных типов и

биологической роли в регуляции процессов жизнедеятельности живых организмов. Эта многочисленная группа веществ, насчитывающая более 23 тысяч соединений с установленным химическим строением, превосходит по числу представителей все другие классы природных соединений.

Так же терпеноидами можно назвать соединения, которые состоят из нескольких изопреновых единиц. Благодаря радикалам, изопреноиды могут иметь число атомов углерода в молекуле не кратное 5. Существует такое понятие, как политерпены, примерами которых является каучук и гутта.

Так как изопреноиды – соединения, характерные растениям, они находятся в хлоропластах, в мембранах. Они способны защищать растения от бактерий, животных и насекомых, также принимают участие в световой фазе фотосинтеза, тем самым защищают хлорофилл от фотоокисления; являются гормонами.

Широко применяются в медицине как лекарственные препараты (сердечные гликозиды витамин А (ретинол, необходим для нормального эмбрионального развития, играет большую роль в фотохимических процессах зрения), ментол), в изготовлении парфюмерии.

Отдельное место в изопреноидах представляют каротиноиды – растительные пигменты, выполняющие функции витаминов, участвующие в процессе фотосинтеза.

Как уже говорилось выше, терпеноиды имеют широкий спектр биологического действия и поэтому представляют большой интерес для поиска новых лекарственных препаратов. Подобные соединения применяются в качестве лекарств при расстройствах печени, почек, при мочекаменных болезнях, обладают противогрибковой активностью, противоязвенной активностью, антитромботической активностью, противоопухолевой активностью, способствуют более быстрому заживлению ран, применяются как антисептики и болеутоляющие.

Терпеноиды (изопреноиды) образуются во всех частях растений. Наибольшим местом их образования являются листья, цветки, плоды и корни лекарственных растений. К одному из основных источников получения

терпеноидов относятся хвойные деревья семейства Pinaceae (сосна, лиственница, пихта, кедр, ель), доминирующие на территории Сибири и Дальнего Востока.

Терпеновые соединения из хвойных деревьев, представленные моно-, сескви-, ди- и тритерпеноидами, по количественному содержанию и качественному составу многократно превосходят все другие виды растений, широко распространенных в мире. Эти вещества защищают растения от болезней и вредителей, а также многих неблагоприятных факторов окружающей среды (перегрева, охлаждения, повреждений и т.д.).

Терпены – это ключевые соединения из группы углеводов, представленных изопренильным фрагментом, состава $(C_5H_8)_n$, где $n \geq 2$. Терпены объединены в большой класс природных веществ под названием терпеноиды или изопреноиды. В лекарственных растениях они, в своем большинстве, представлены монотерпенами ($C_{10}H_{16}$), сесквитерпенами ($C_{15}H_{24}$), дитерпенами ($C_{20}H_{32}$) и тритерпенами ($C_{30}H_{48}$).

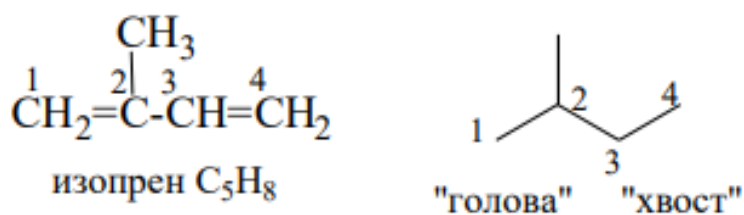


Рисунок 5 – Углеродный скелет изопрена

Терпеноиды строятся согласно «изопреновому правилу» Ружичка (швейцарский химик): соединение отдельных частей проходит по принципу «голова» одного звена к «хвосту» следующего. Этот принцип встречается у изопренов очень часто. Но существует и другой принцип – «хвост» к «хвосту».

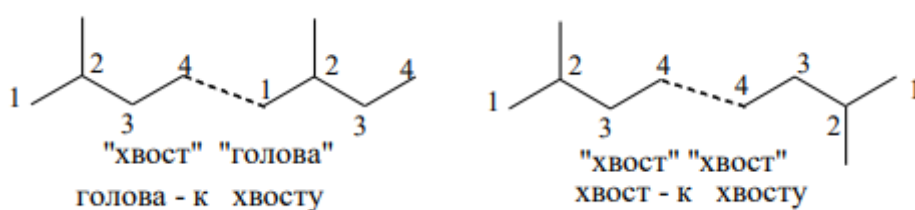


Рисунок 6 – Сочленения изопреновых звеньев

Разработка флуоресцентных маркеров для различных биообъектов - перспективное направление современной науки. За последние десятилетия семейство бордипиррометеновых (BODIPY) флуорофоров привлекло значительное внимание благодаря своим уникальным свойствам, таким как высокий молярный коэффициент экстинкции, превосходный квантовый выход (часто более 0,8), относительно небольшой стоксовый сдвиг (обычно порядка 10 – 20 нм) и т.д. Все эти особенности, а также его большая способность к структурной модификации обуславливают широкое использование этого класса красителей для мечения биомолекул.

Довольно новой обнадешивающей областью в химии BODIPY является получение конъюгатов с некоторыми биомолекулами. Таким образом, конъюгаты различных веществ и BODIPY являются одним из наиболее интересных объектов исследования.

В кристаллической твердой форме ядро BODIPY почти, но не полностью, является плоским и симметричным; за исключением двух атомов фтора, которые лежат на перпендикулярной биссектрисе. Его связь можно объяснить, предположив формальный отрицательный заряд на атоме бора и формальный положительный заряд на одном из атомов азота.

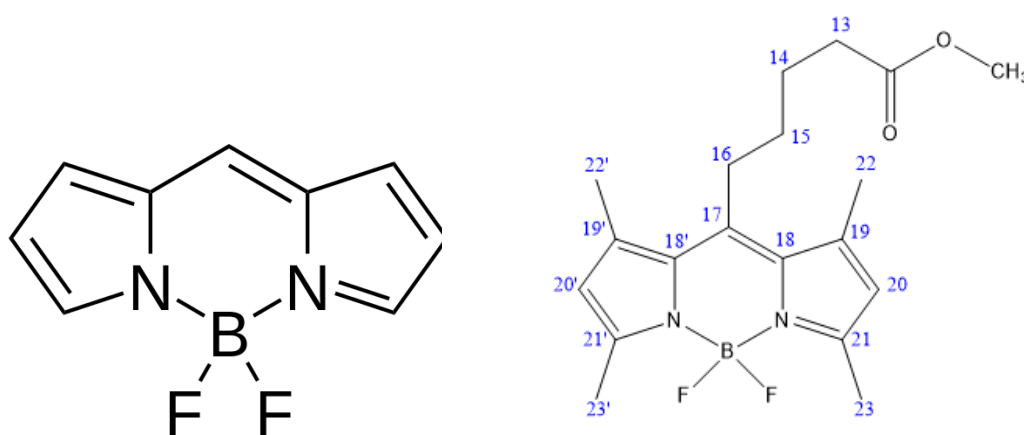


Рисунок 7 – BODIPY (флуоресцентный маркер)

2 ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

2.1 1. ЯМР-исследование образца I

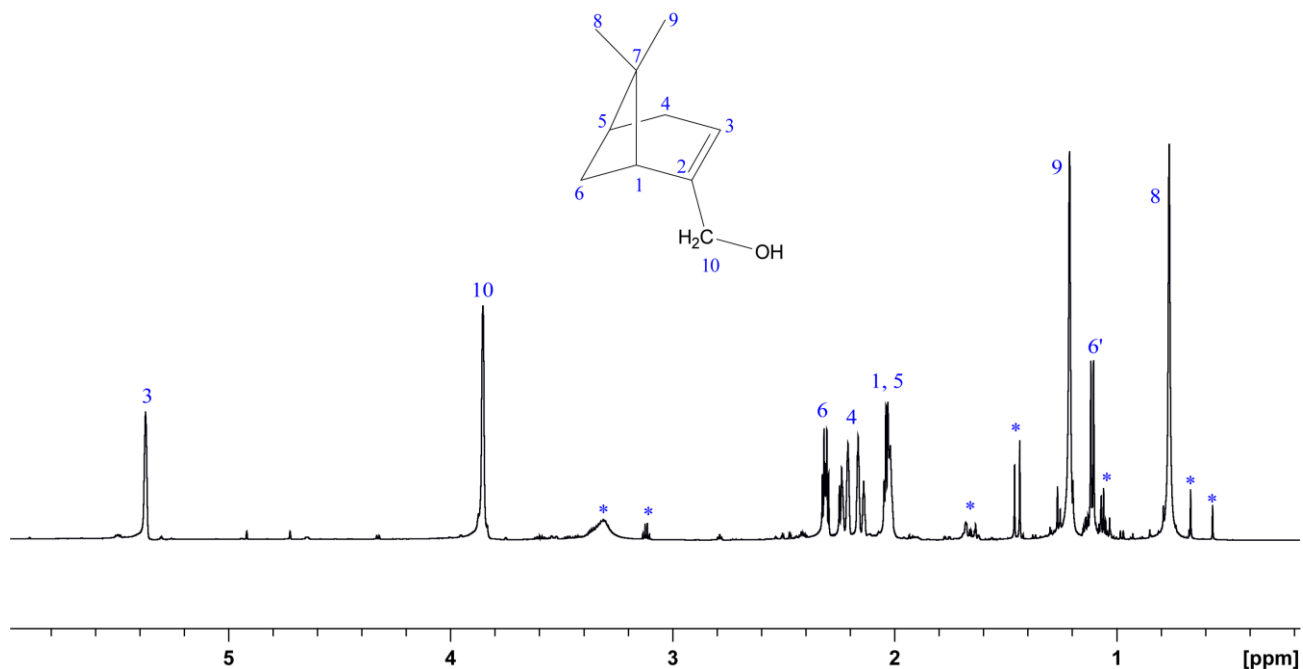


Рисунок 8 – ^1H ЯМР спектр соединения I в растворе CDCl_3 при $T = 303 \text{ K}$, * – сигналы примесей

На рисунке представлен протонный спектр первого из исследованных соединений. Для подтверждения химической структуры данного соединения были получены такие спектры, как 1D ^1H и ^{13}C , а также были проведены 2D ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC и ^1H - ^{13}C HMBC ЯМР эксперименты.

В ^1H ЯМР спектре соединения I протоны 8, 9 (метильные группы) наблюдаются в высоких полях, с высокой интенсивностью с химическими сдвигами 0,77 и 1,23 м.д., соответственно. Сигналы от четвертичных углеродов 2, 7 в протонном спектре не наблюдаются. Протон 3 резонирует в слабых полях, так как он расположен вблизи двойной связи. Протон 4, резонирующий в форме мультиплета, испытывает спин-спиновое взаимодействие со стороны соседних протонов 5 и 3. Сигналы примесей отмечены звездочкой (*).

Исходя из данных экспериментов ^1H - ^1H COSY и ^1H - ^{13}C HSQC определены сигналы протонов, которые связаны между собой, а также

химические сдвиги сигналов углерода, связанных с соответствующими протонами. Также определено, что протоны метиленовой группы $\text{CH}_2\text{-6}$ (H_6 и H_6') являются неэквивалентными, поскольку они расположены по-разному (в аксиальном и экваториальном) положении по отношению к циклу.

Так же были получены значения химических сдвигов, результаты которых приведены в таблице 1.

Таблица 1 – ^1H и ^{13}C ЯМР химические сдвиги (δ , м.д.) соединения **I** при температуре 303 К

Атомы	в растворе CDCl_3	
	$\delta ^1\text{H}$, м.д.	$\delta ^{13}\text{C}$, м.д.
1	2,04	43,2
2	-	147,8
3	5,38	117,1
4	2,19	31,0
5	2,04	41,0
6	2,31	31,5
6'	1,12	-
7	-	37,8
8	0,77	21,0
9	1,23	26,2
10	3,85	65,1

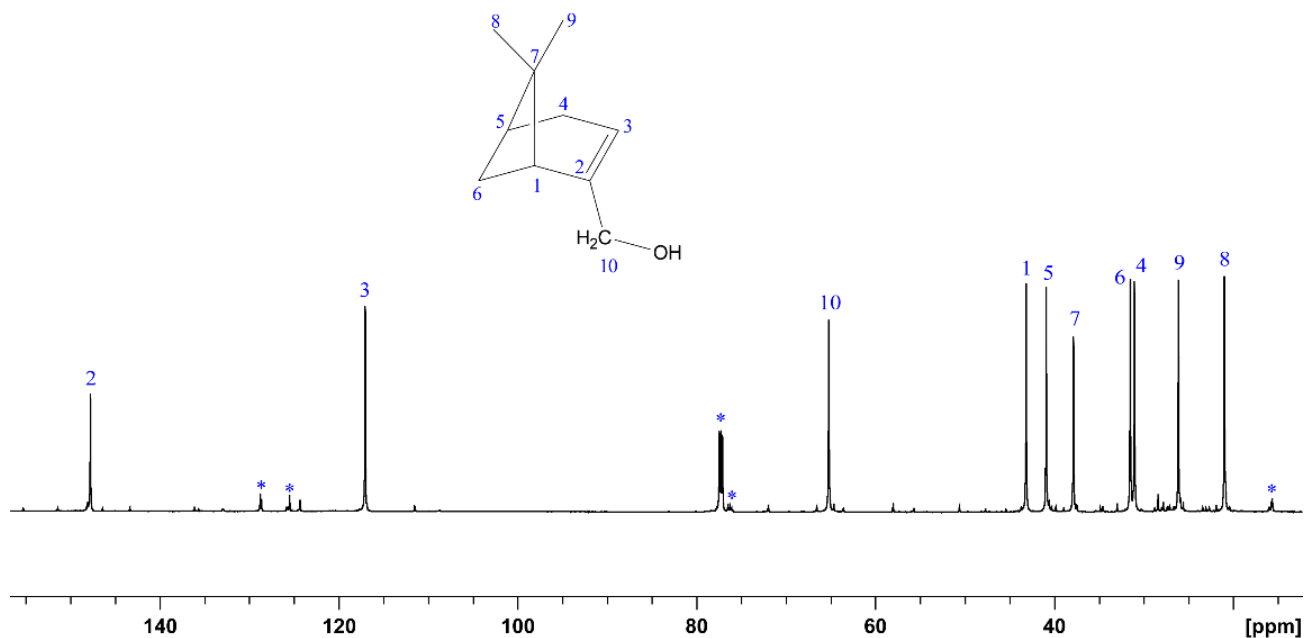


Рисунок 9 – ¹³C ЯМР спектр соединения **I** в растворе CDCl₃ при T= 303 К, * – сигналы растворителя и примесей

На данном рисунке представлен углеродный спектр первого соединения в растворе хлороформа. Он также был полностью соотнесен с помощью двумерного ¹H-¹³C HSQC ЯМР эксперимента. То есть были определены связанные с протонами углероды групп CH, CH₂, CH₃, а четвертичные углероды (C) под норами 2 и 7 были определены с помощью двумерного ¹H-¹³C HMBSC ЯМР эксперимента.

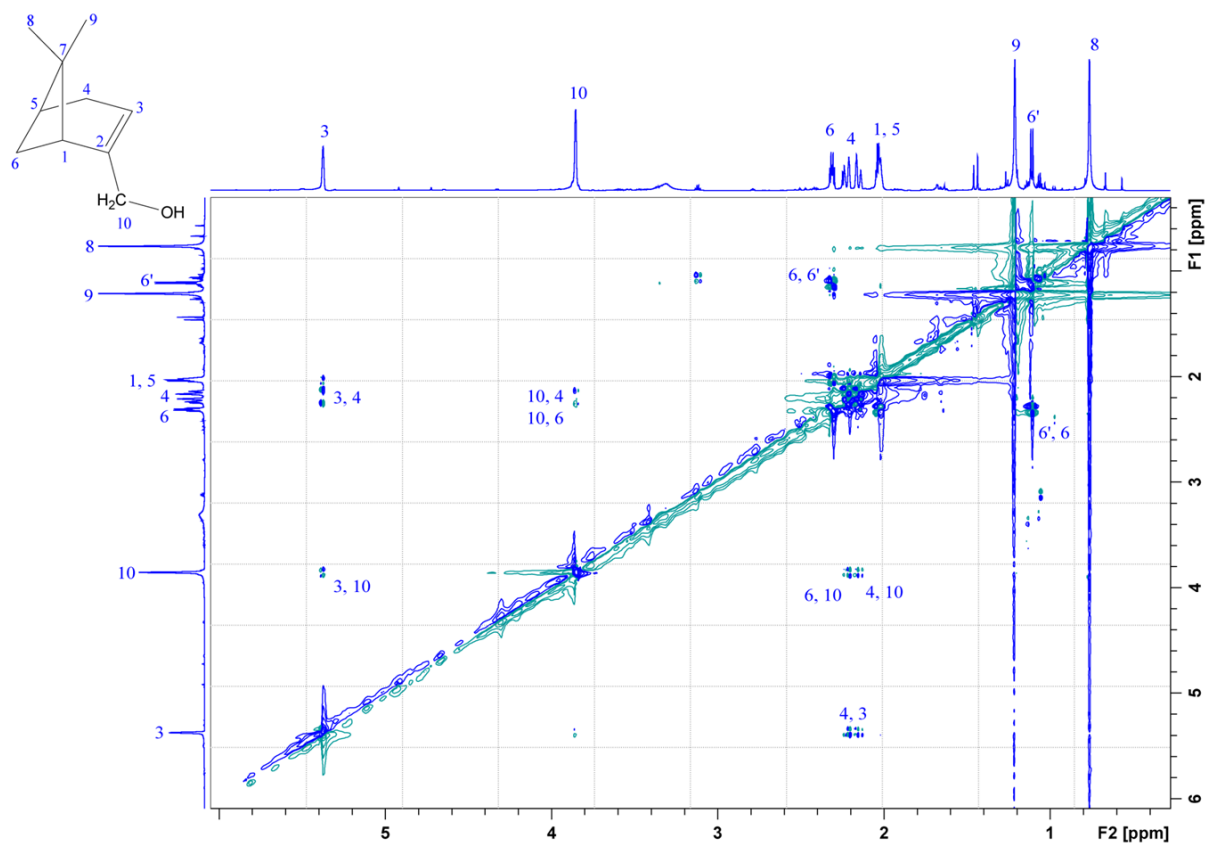


Рисунок 10 – ^1H - ^1H COSY ЯМР спектр соединения монотерпеноида с пинановым циклом в растворе CDCl_3

^1H - ^1H COSY ЯМР спектра соединения монотерпеноида с пинановым циклом в растворе CDCl_3 . Спектр, находящиеся вдоль каждой из двух осей — обычный одномерный спектр ^1H ЯМР. Нагромождение пиков видно по диагонали, в то время как кросс-пики располагаются симметрично над и под диагональю.

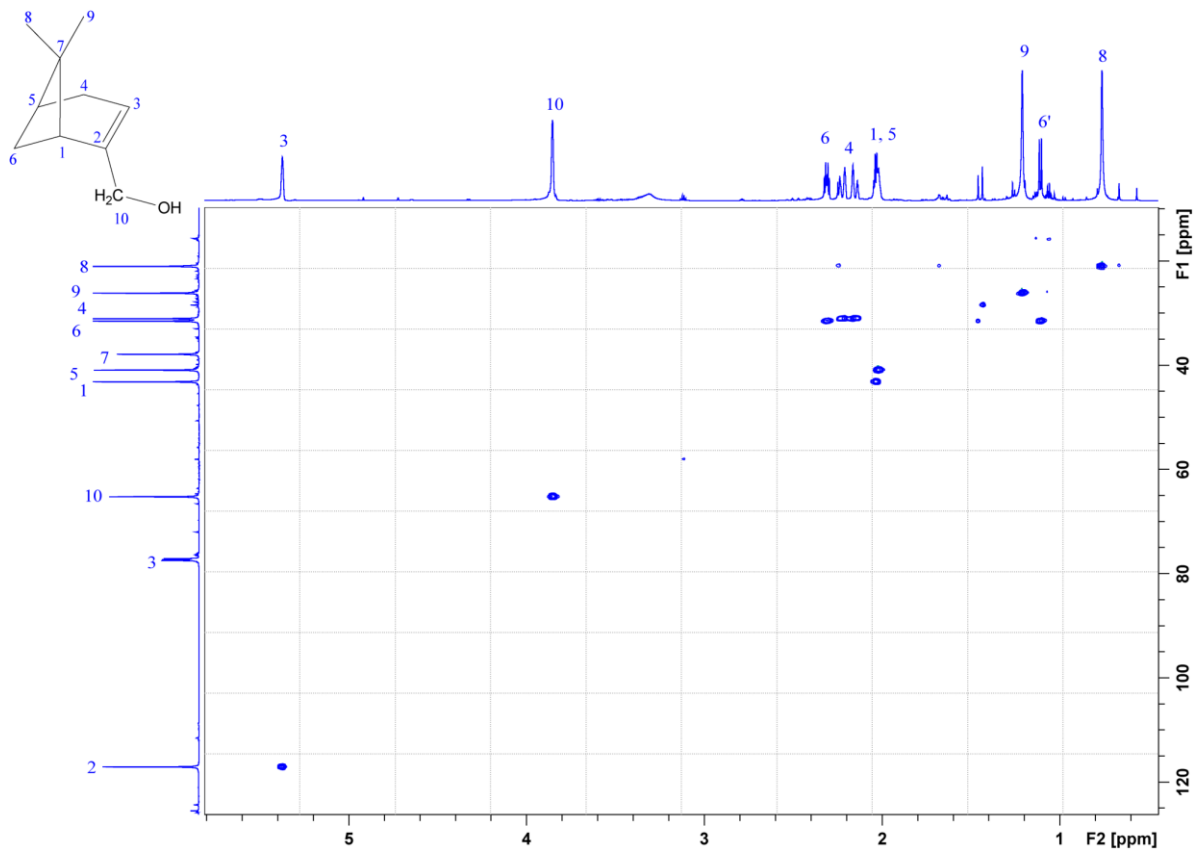


Рисунок 11 – ^1H - ^{13}C HSQC ЯМР спектр соединения I в растворе CDCl_3

2.2 ЯМР-исследование образца II

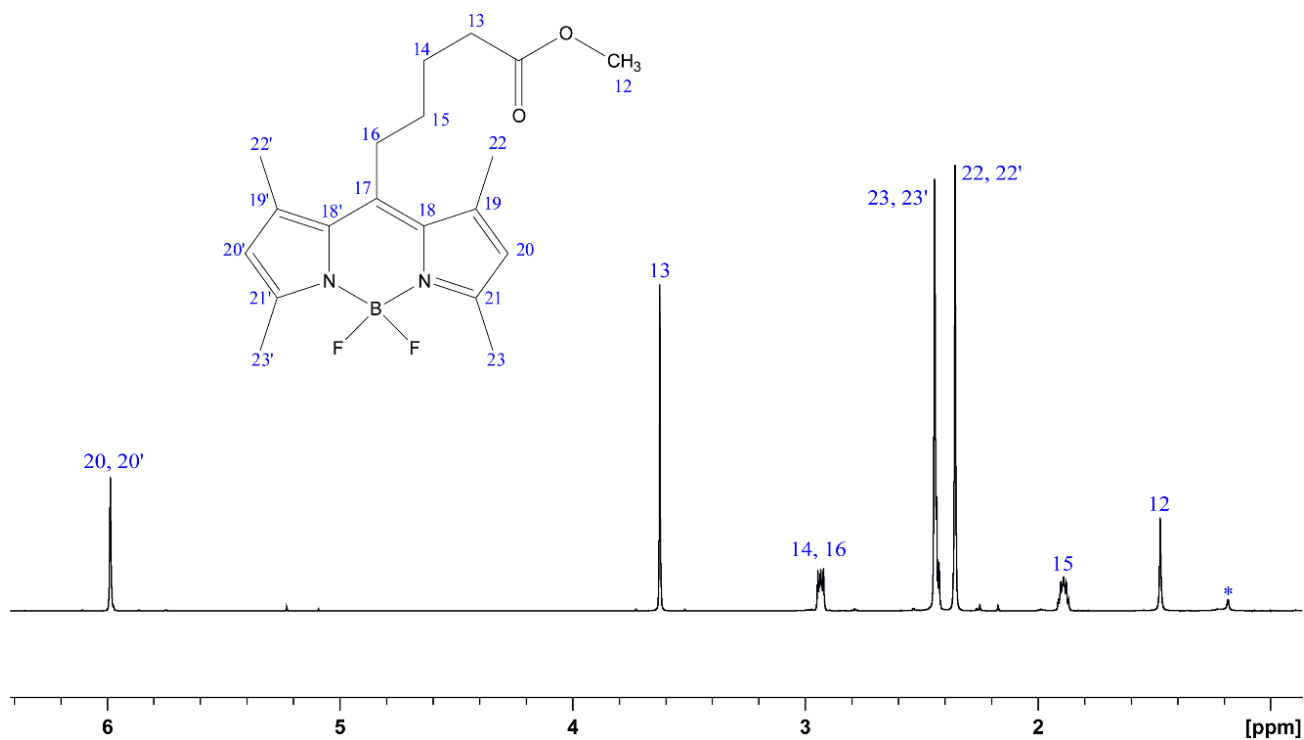


Рисунок 12 – ^1H ЯМР спектр соединения II в растворе CDCl_3 при $T = 303 \text{ K}$, * – сигналы примесей

На рисунке 13 представлен протонный спектр люминофорной молекулы. В спектре наблюдаются характерные сигналы метильных (12, 22, 22', 23, 23'), метиленовых (13, 14, 15), а также метиновых (20, 20') групп. По рисунку видим, что 14 и 16 друг друга перекрывают.

В качестве подтверждения проведения правильного процесса синтез данного соединения были получены такие спектры, как 1D ^1H и ^{13}C ЯМР, а также были проведены 2D ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC и ^1H - ^{13}C HMBC ЯМР эксперименты.

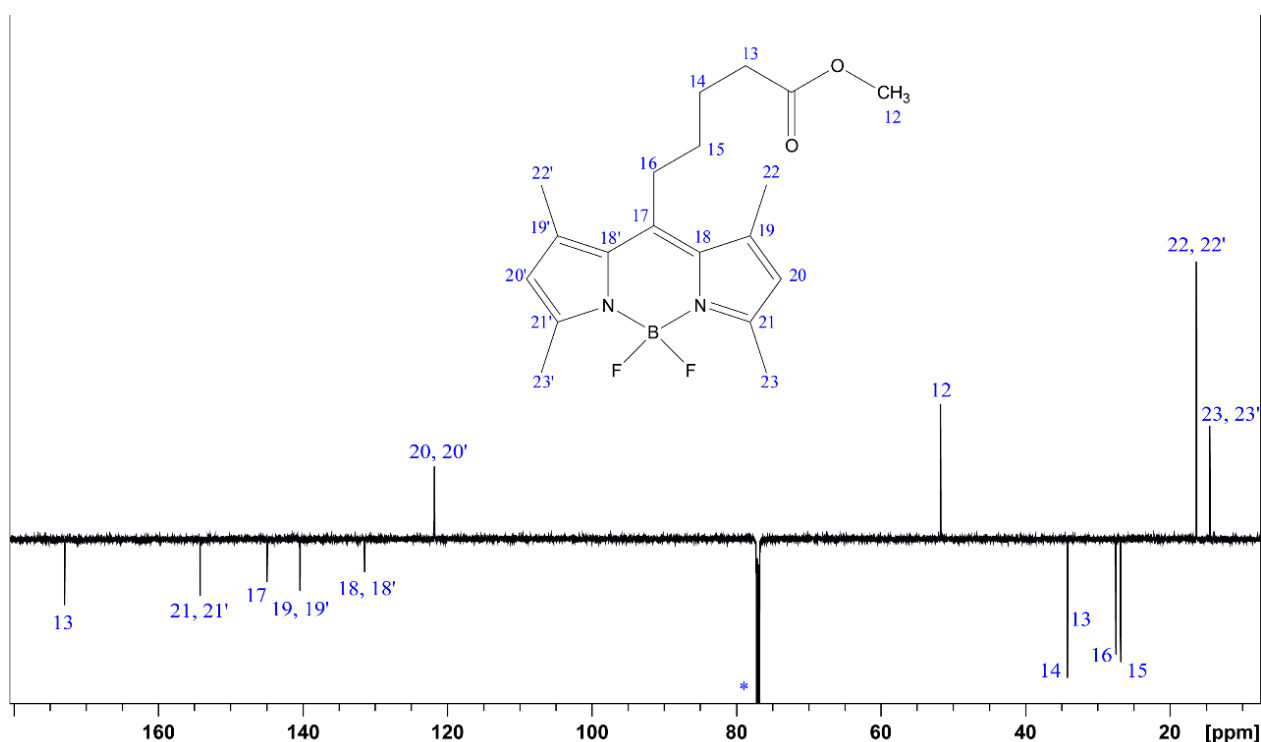


Рисунок 13 – ^{13}C ЯМР спектр соединения **II** в растворе CDCl_3 при $T = 303 \text{ K}$, * – сигнал растворителя

Аналогично для второго соединения были определены химические сдвиги атомов углерода. Для этого в купе с данными HSQC ЯМР эксперимента, был проведен углеродный эксперимент с переносом поляризации, который позволяет разделить сигналы углеродов с чётным количеством протонов (вторичные углероды) или вовсе отсутствующими протонами (четвертичные углероды) – они наблюдаются в спектре в виде отрицательных сигналов; и также, с другой стороны от базовой линии в виде положительных резонансных

пиков представлены сигналы первичных и третичных углеродов.

Так же были получены значения химических сдвигов, результаты которых приведены в таблице 2.

Таблица 2 – ^1H и ^{13}C ЯМР химические сдвиги (δ , м.д.) соединения 2 при температуре 303 К

Атомы	в растворе CDCl_3	
	$\delta ^1\text{H}$, м.д.	$\delta ^{13}\text{C}$, м.д.
10	-	-
11	-	-
12	1,48	52,1
13	3,63	173,2
14	2,95	34,2
15	1,89	27,0
16	2,93	27,6
17	-	145,0
18	-	131,6
18`	-	131,6
19	-	140,5
19`	-	140,5
20	5,99	122,1
20`	5,99	122,1
21	-	154,4
21`	-	154,4
22	2,36	16,5
22`	2,36	16,5
23	2,45	14,6
23`	2,45	14,6

2.3 ЯМР-исследование конъюгатного образца III

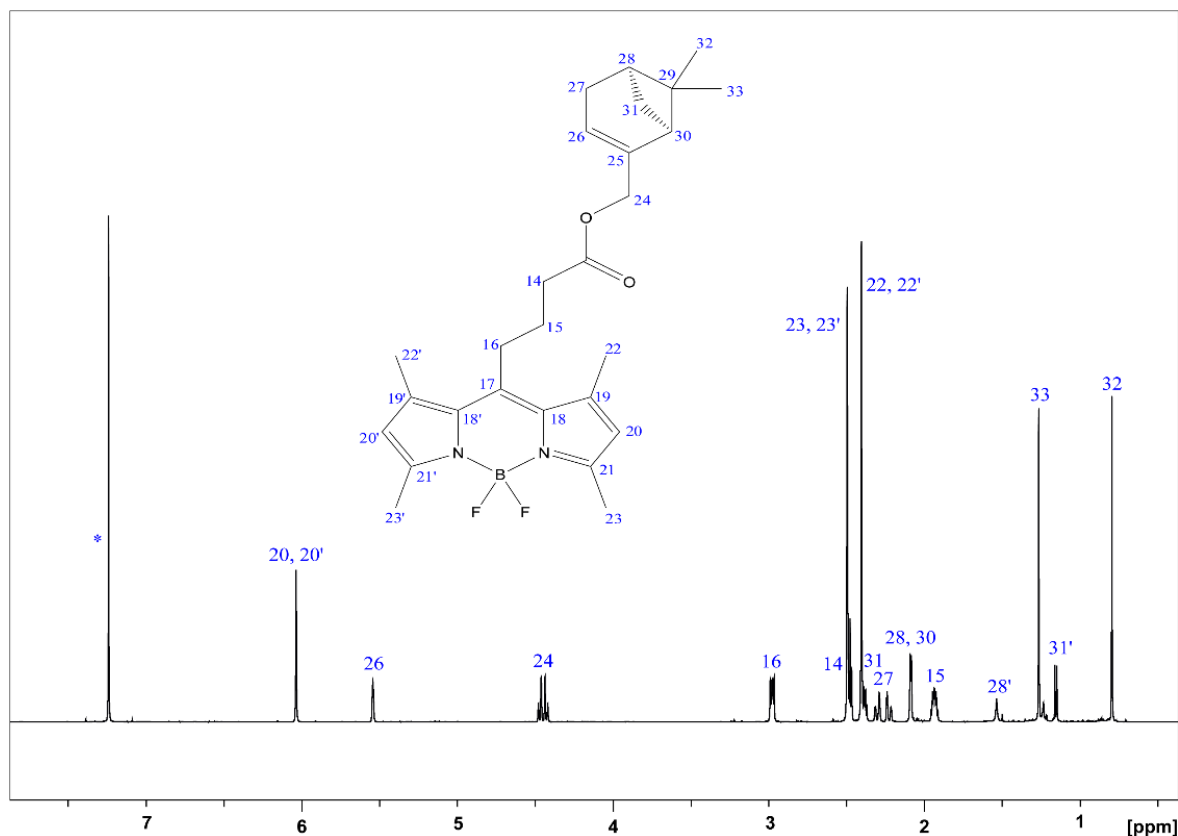


Рисунок 14 – ^1H ЯМР спектр соединения III в растворе CDCl_3 при $T = 303 \text{ K}$, * – сигнал растворителя

Конечной задачей было исследование конъюгатного образца, полученного путём синтеза двух рассмотренных молекул (соединения 1 и 2) – пинанового терпеноида и BODIPY-люминофора. На рисунке 12 представлен его протонный спектр.

Так же наблюдаем пики высокой интенсивности (23, 23', 22, 22', 32, 33). Видим, что 27 и 31 перекрывают друг друга.

С полным отнесением резонансных сигналов соединения III проблем не возникло, поскольку образец достаточно чистый, примесей нет, с хорошей концентрацией (примерно 2 миллимоли). Были выполнены двумерные ЯМР эксперименты аналогично первым двум соединениям. Также при обработке спектра третьего соединения опирались на результаты ЯМР экспериментов первых двух молекул.

Исходя из полученных данных были получены значения химических сдвигов, результаты которых приведены в таблице 3.

Таблица 3 – ^1H и ^{13}C ЯМР химические сдвиги (δ , м.д.) соединения 3 при температуре 303 К

Атомы	в растворе CDCl_3	
	$\delta ^1\text{H}$, м.д.	$\delta ^{13}\text{C}$, м.д.
13	-	172,7
14	2,50	34,6
15	1,94	27,1
16	2,98	27,8
17	-	145,2
18	-	131,7
18		131,7
19	-	140,7
9	-	140,7
20	6,04	122,0
20	6,04	122,0
21	-	154,5
21	-	154,5
22	2,40	16,6
22	2,40	16,6
23	2,50	14,8
23	22,50	14,8
24	4,45	67,5
25	-	143,0
26	5,55	122,0
27	2,26	31,7
28	2,08	40,9
28	1,54	-
29	-	383
30	2,08	-

Продолжение таблицы 3

Атомы	в растворе CDCl ₃	
	δ ¹ H, м.д.	δ ¹³ C, м.д.
31	2,40	31,7
31	1,16	-
32	0,80	21,3
33	1,26	26,4
* (хлороформ)	7,24	-

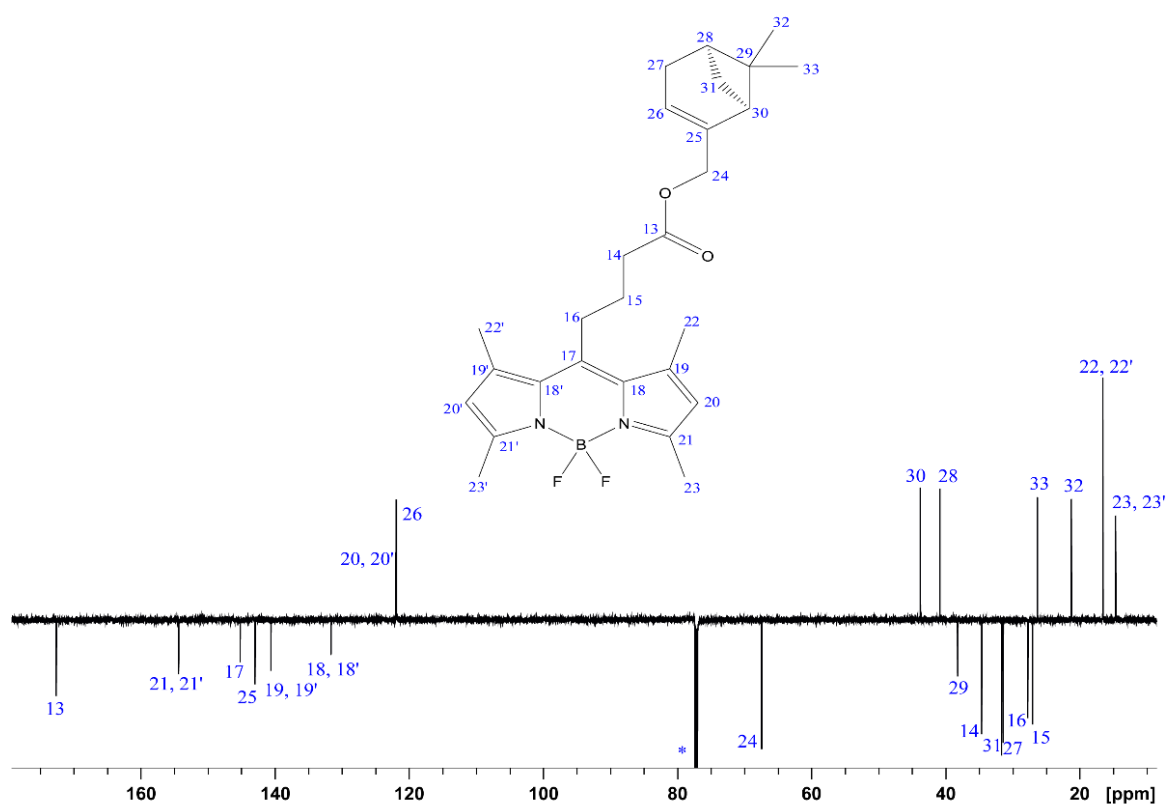


Рисунок 15 – ¹³C АРТ ЯМР спектр соединения **III** в растворе CDCl₃ при T= 303 К, * – сигнал растворителя

На рисунке 13 представлен углеродный АРТ спектр, соотнесенный благодаря двумерным HSQC и HMBC ЯМР экспериментам. Таким образом, были охарактеризованы все три молекулы, которые важны с биологической и медицинской точки зрения.

3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все спектры были записаны на многофункциональном импульсном ЯМР спектрометре с Фурье-преобразованием AVANCE III 700 фирмы «Bruker» (Германия), с рабочей частотой 700 МГц на ядрах ^1H и 175 МГц на ядрах ^{13}C . Точность определения химических сдвигов составляла $\pm 0,01$ м.д. Стабилизация магнитного поля осуществлялась по сигналам ядер ^1H растворителя. Запись одно- и двумерных спектров производилась с использованием рекомендаций, описанных в руководстве по эксплуатации спектрометра. Обработка всех спектров проводилась в рамках программных пакетов TopSpin 3.6.1 фирмы Bruker и ACD/NMR Processor Academic Edition.

Температура, при которой проводились эксперименты, 303 К. Для приготовления образцов в качестве растворителя использовался хлороформ.



Рисунок 16 – Спектрометр "AVANCE III - 700" – спектрометр со сверхпроводящим магнитом

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

- Освоены методы спектроскопии ЯМР высокого разрешения ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC.
- Проведена регистрация и обработка ЯМР спектров для трёх соединений терпенового ряда, включая конъюгат пинанового терпеноида с BODIPY-люминофором в растворе хлороформа при комнатной температуре; получена таблица химических сдвигов ^1H и ^{13}C ядер исследуемых молекул.
- На основании полученных мной результатов в рамках действующего проекта РФФИ планируется дальнейшее исследование данных соединений методами ЯМР спектроскопии на предмет образования устойчивых комплексов с моделью биологической мембраны.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каратаева, Ф.Х. Спектроскопия ЯМР в органической химии. Часть I. Общая теория ЯМР. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C . Учебное пособие / Ф.Х. Каратаева, В.В. Ключков. – Казань: Казанский федеральный университет, 2013. – 129 с. – Текст : непосредственный.
2. Меалле-Рено, Р. Синтез новых препаратов BODIPY из стерически затрудненных пирролов и изучение их фотофизического поведения в растворе, в наночастицах полистирола и в твердой фазе / Р. Меалле-Рено, Ж. Клавье, С. Дюма-Верд, С. Бадре, Е.Ю. Шмидт, А.И. Михалева, Ш. Лапран, Р. Пансю, П. Одебер, Б.А. Трофимов // Рос. хим. журнал – 2008. - Т.12, №1 – С. 91-99.
3. Ksenofontova, K.V. Novel BODIPY-conjugated amino acids: Synthesis and spectral properties [Text] / K.V. Ksenofontova, A.A. Ksenofontov, I.A. Khodov, E.V. Rumyantsev // Journal of Molecular Liquids. – 2019. – V. 283. – P. 695–703.
4. Guseva, G.B. Meso-substituted-BODIPY based fluorescent biomarker: Spectral characteristics, photostability and possibilities for practical application [Text] / G.B. Guseva, E.V. Antina, M.B. Berezin, R.S. Pavelyev, A.R. Kayumov, I.S. Sharafutdinov, S.A. Lisovskaya, O.A. Lodochnikova, D.R. Islamov, K.S. Usachev, S.V. Boichuk, L.E. Nikitina // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. – 2020. – V. 401. – P. 112783.
5. Guseva, G. Spectroscopic and in vitro investigations of boron(III) complex with meso-4-methoxycarbonylpropylsubstituted dipyrromethene for fluorescence bioimaging applications [Text] / G. Guseva, E. Antina, M. Berezin, S. Lisovskaya, R. Pavelyev, A. Kayumov, O. Lodochnikova, D. Islamov, K. Usachev, S. Boichuk, L. Nikitina // Molecules. – 2020. – 25. – 4541.
6. Эрнст Р. ЯМР в одном и двух измерениях / Р. Эрнст, Дж. Боденхаузен, А. Вокаун. - М.: Мир, 1990. –709 с.
7. Дэроум, Э. Современные методы ЯМР для химических исследований

- [Текст] / Э.Дэроум. - М.:Мир,1992. – 403 с.
8. Бакс, Э. Двумерный ядерный магнитный резонанс в жидкостях [Текст] / Э. Бакс. - Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1989. - 160 с.
 9. Эмсли, Дж. Спектроскопия ЯМР высокого разрешения [Текст] / Дж. Эмсли, Дж. Финей, Л. Сатклиф – М.: Мир, 1968. – 630с
 10. Berger, S., Braun, S. 200 and More NMR Experiments. [Text]/ S. Berger, S. Braun // Wiley-VCH, Weinheim, 2004. — 810 p.