

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

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ С
МОДЕЛЬНЫМИ БИОЛОГИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ
АНТИТРОМБОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ В РАСТВОРЕ МЕТОДАМИ
СПЕКТРОСКОПИИ ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

Студент 2 курса группы 06-819

«15» июня 2020 г.

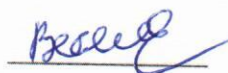


Тимерова А.Ф.

Научный руководитель

д.х.н., профессор

«15» июня 2020 г.



Ключков В.В.

Научный консультант

к.ф.-м.н., ассист.

«15» июня 2020 г.



Рахматуллин И.З.

Заведующий кафедрой медицинской физики

д.х.н., профессор

«15» июня 2020 г.



Аганов А.В.

Казань-2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1. МЕТОДЫ СПЕКТРОСКОПИИ ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА. 6	
1.1. Физические основы спектроскопии ядерного магнитного резонанса ... 6	
1.2. Двумерная спектроскопия ядерного магнитного резонанса..... 14	
1.2.1. Спектроскопия DOSY эксперимента	17
1.2.2. Эксперименты, основанные на ядерном эффекте Оверхаузера	21
Спектроскопия одномерного селективного NOESY эксперимента	22
Спектроскопия двумерного NOESY эксперимента	23
2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	26
2.1. Объекты исследования.....	26
2.2. Материалы и методы.....	27
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	31
3.1. Терпеноиды камфеновой серии	31
3.2. Терпеноиды борнановой серии	35
ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ	42
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	44

ВВЕДЕНИЕ

Артериальный тромбоз является наиболее важным фактором, ведущим к артериальным сердечно-сосудистым заболеваниям. Такие болезни являются причиной повышенной смертности во всем мире [1]. Адгезия, активация и агрегация тромбоцитов играют критическую роль в гемостазе и его патофизиологии в месте атеросклеротических поражений в коронарных артериях [2]. Поскольку преимущественно используемые лекарственные средства не гарантируют достаточной профилактики и лечения, представляет большой интерес исследование новых веществ, причем не только для использования в качестве лекарственного средства, но и в качестве инструментов для предоставления информации о функции тромбоцитов [3].

Одним из основных факторов, приводящих к образованию тромба, являются изменения в фосфолипидных мембранах тромбоцитов, что приводит к разрыхлению и увеличению текучести мембран. Предполагается, что действие терпеноидов (а также их серосодержащих синтетических аналогов – тиотерпеноидов) связано с их способностью «латать дыры» в мембранах путем погружения гидрофобной части молекулы в мембрану. Это может восстанавливать целостность мембран, что предотвращать процессы агрегации и коагуляции [4].

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) является одним из наиболее мощных инструментов, позволяющих устанавливать пространственную структуру соединений, что и необходимо знать при разработке медикаментов. Терпеноиды имеют широкий спектр биологического действия и поэтому представляют большой интерес для поиска новых лекарственных препаратов. Подобные соединения, помимо обладания антитромботической активностью, применяются при расстройствах почек и печени, мочекаменных болезнях, также как антисептики и болеутоляющие. Обладают противоопухолевой, противогрибковой, противоязвенной,

активностями, к тому же способствуют более быстрому заживлению ран [5 - 7]. Исследование взаимодействия тиотерпеноидов с клеточной мембраной, представленные в данной работе, может помочь объяснить некоторые его фармакологические свойства.

Исследования проводились с помощью спектроскопии ЯМР высокого разрешения в жидкой фазе. При проведении исследований особенностей пространственного строения и механизмов взаимодействия серосодержащих монотерпеноидов с моделями клеточной мембраны использовались современные методы одно- и двумерной гомо- и гетероядерной спектроскопии ЯМР, основанные на ядерном эффекте Оверхаузера (ЯЭО) и диффузионно-упорядоченной спектроскопии (DOSY, Diffusion ordered spectroscopy) в растворе. Метод ЯЭО позволяет изучать межмолекулярные взаимодействия, получать информацию о структуре молекулярного комплекса. Метод DOSY позволяет выделить спектры индивидуальных веществ из смесей в том случае, когда наблюдается достаточные отличия в коэффициентах диффузии. Применение методик ЯМР с импульсными градиентами магнитного поля позволяет измерять скорость диффузии ядерных спинов. Также могут быть исследованы следующие образования: диффузия ионов, молекул, межмолекулярных и органических комплексов, мицелл [8].

Исследование актуально, поскольку может помочь решению фундаментальной проблемы, направленной на понимание основных механизмов взаимодействия биологически активных молекул с клеточной мембраной и течения сердечно-сосудистых заболеваний.

Решение этой проблемы позволит использовать тиотерпеноиды в качестве соединений, обладающих антиагрегационной и антикоагуляционной активностью, а также разработать подходы к созданию новых лекарственных средств для лечения и профилактики многих заболеваний, связанных с закупоркой кровеносных сосудов тромбом [9].

Целью выпускной квалификационной работы являлось установление особенностей взаимодействия ряда серосодержащих монотерпеноидов с моделью клеточной мембраны на основе данных спектроскопии ЯМР.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1) Проведение экспериментов ЯМР (^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBSC, ^1H - ^1H NOESY, DOSY) в изотропном растворе и в растворе, содержащем додецилфосфохолин (ДФХ);

2) Выявление изменений в химических сдвигах, ширине линий, мультиплетности сигналов исследуемых соединений при добавлении поверхностно-активного вещества (ПАВ);

3) Определение значений коэффициентов диффузий каждой компоненты в исследуемом образце;

4) Выявление наличия или отсутствия комплекса, а при наличии - особенностей комплексообразования серосодержащих монотерпеноидов с моделью клеточной мембраны на основе ДФХ в растворе методами одно- и двумерной спектроскопии ЯМР.

1. МЕТОДЫ СПЕКТРОСКОПИИ ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

1.1. Физические основы спектроскопии ядерного магнитного резонанса

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) - высокоинформативный, неразрушающий аналитический метод исследования, позволяющий получить подробную информацию о молекулярной структуре, динамических процессах и вести непосредственное наблюдение за химическими реакциями. Это также основной количественный метод, позволяющий определять концентрацию молекул даже в сложных смесях. В дополнение к общеизвестным наблюдениям за водородом, углеродом, фтором и фосфором его можно использовать для большого числа других элементов [10].

Спектроскопия ЯМР – это исследование молекулярной структуры путем измерения взаимодействия радиочастотного электромагнитного поля с магнитными ядрами, погруженными в сильное внешнее магнитное поле. Эти ядра являются частью атомов, которые, в свою очередь, образуют целые молекулы. Таким образом, спектр ЯМР может дать детальную информацию о молекулярной структуре и динамике [11].

В 1902 году физик П. Зееман получил Нобелевскую премию за открытие и объяснение расщепления спектральных линий ядер во внешнем магнитном поле [12]. А ровно через 50 лет физики Ф. Блох и Э. Парселл разделили Нобелевскую премию за практическое применение так называемого ядерного эффекта Зеемана при создании первого ЯМР спектрометра [13]. И в последующие годы метод ЯМР спектроскопии произвел полную революцию в химии и биохимии, а также оказал значительное влияние на целый ряд других областей. Ядерный магнитный резонанс стал, пожалуй, единственным наиболее

широко используемым методом для выяснения молекулярной структуры органических соединений.

Атом водорода встречается нам везде и всюду. Как уже всем известно, его ядро состоит из одной только элементарной частицы – протона. Этот протон является вращающейся заряженной ($Z = 1$) частицей, поэтому обладает магнитным моментом μ , у которого существует две возможные ориентации под воздействием внешнего магнитного поля B_0 (рисунок 1). Ядерные спиновые состояния обозначаются квантовым числом ядерного спина m . Таким образом, для протона m может принимать значения только $+(1/2)$ или $-(1/2)$ [14].

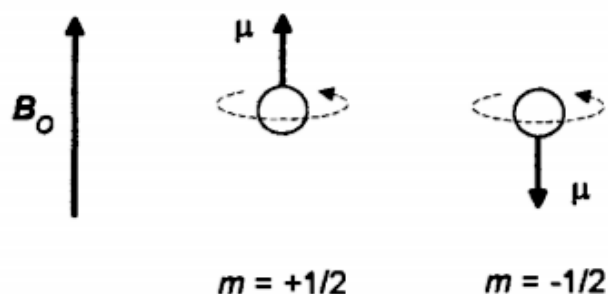


Рисунок 1 – Две возможные ориентации магнитного момента μ протона во внешнем магнитном поле B_0 [11]

Ядра ^1H (то есть протоны) имеют две возможные магнитные спиновые ориентации, как уже сказано выше. А как насчет других изотопов? Как уже известно, П. Зееман обнаружил то, что только некоторые изотопы обладают ядерными спиновыми состояниями при наличии внешнего магнитного поля [15]. Это происходит потому, что только изотопы с нечетным числом протонов (Z) и/или нечетным числом нейтронов (N) обладают ненулевым ядерным спином. Ядра с нулевым ядерным спином (с четными Z и N) имеют нулевой ядерный магнитный момент и не могут быть обнаружены методами ЯМР. Вот причина, по которой четность (нечетное или четное число) протонов и

нейтронов так важна: спин протона может только спариваться с другим спином протона, но не со спином нейтрона, и наоборот.

Обозначение спинового числа – I . У ядер, обладающих магнитным моментом, спин ядра I не равняется нулю. Из практически важных элементов спиновым числом $I = 1/2$ обладают следующие ядра: ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P , ^{15}N . Ядра ^2H и ^{14}N имеют $I = 1$; ядра ^{11}B , ^{35}Cl , ^{37}Cl , ^{79}Br и ^{81}Br имеют $I = 3/2$ [16]. Ядро углерода ^{12}C не имеет магнитного момента. Оно является важным для органической химии и его распространенность в природе составляет 98,892% [17]. Поэтому методом ЯМР исследуют изотоп ^{13}C , природное содержание которого составляет всего лишь 1,108% [17]. Спин ядра определяет число разрешенных ориентаций магнитного момента ядра в постоянном магнитном поле [18].

Ядро с ядерным спином I принимает $2I + 1$ невырожденных спиновых состояний в магнитном поле [14]. Состояния отличаются по энергии, причем наибольшее положительное значение m соответствует самому низкому энергетическому (наиболее стабильному) состоянию.

Энергия i -го спинового состояния (E_i) прямо пропорциональна величине m_i и напряженности магнитного поля B_0 (то есть энергия квантована в единицах $\frac{\gamma h B_0}{2\pi}$):

$$E_i = -m_i \frac{\gamma h B_0}{2\pi}, \quad (1)$$

где γ – гиромагнитное отношение, h – постоянная Планка, m_i – магнитное квантовое число.

На рисунке 2 графически показано изменение энергии спинового состояния в зависимости от напряженности магнитного поля для двух различных ядер с $I = 1/2$ и $I = 1$. По мере увеличения напряженности поля разница в энергии (ΔE) между любыми двумя спиновыми состояниями также возрастает.

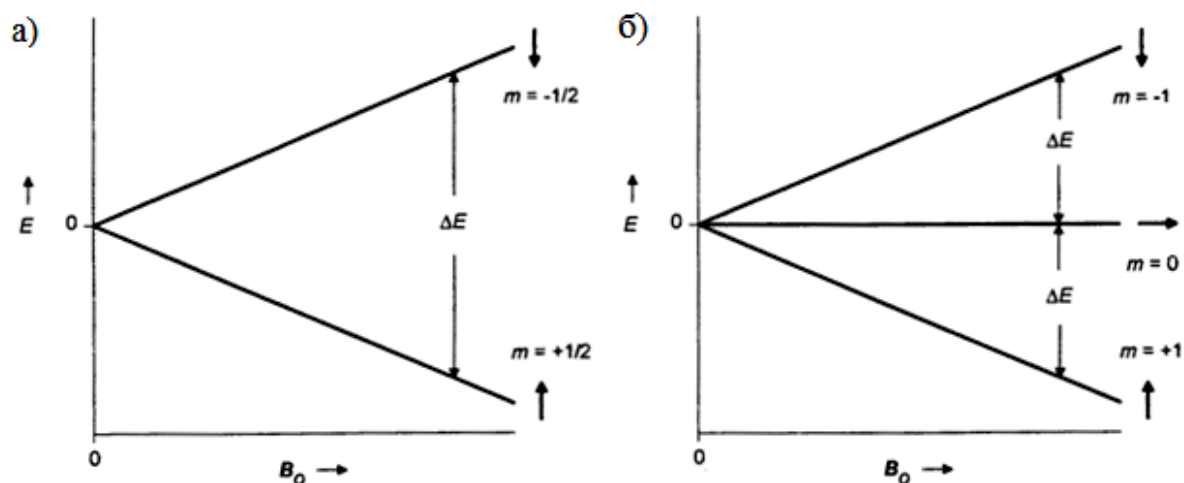


Рисунок 2 – Ядерный эффект Зеемана для ядра с $I = 1/2$ (а) и с $I = 1$ (б).
Стрелка рядом с каждой линией спинового состояния указывает на ориентацию магнитного момента в магнитном поле [11]

В реальной системе ядра находятся в окружении своих электронных оболочек и соседних атомов. Если бы мы могли получить ЯМР сигнал для "свободного" ядра ^1H , т.е. протона, свободного от всех электронов и других соседних молекул, его сигнал оказался бы в области низких полей – с более высокой частотой. На рисунке 3 приведено сравнение для двух ядер с различным окружением. Свободный протон испытывает полную величину внешнего поля B_0 , экранированное ядро испытывает так называемое эффективное поле $B_{\text{эфф}}$, которое определяется по следующему уравнению:

$$B_{\text{эфф}} = B_0 - B_j, \quad (2)$$

где B_j – магнитное поле, создаваемое электронной оболочкой ядра [11].

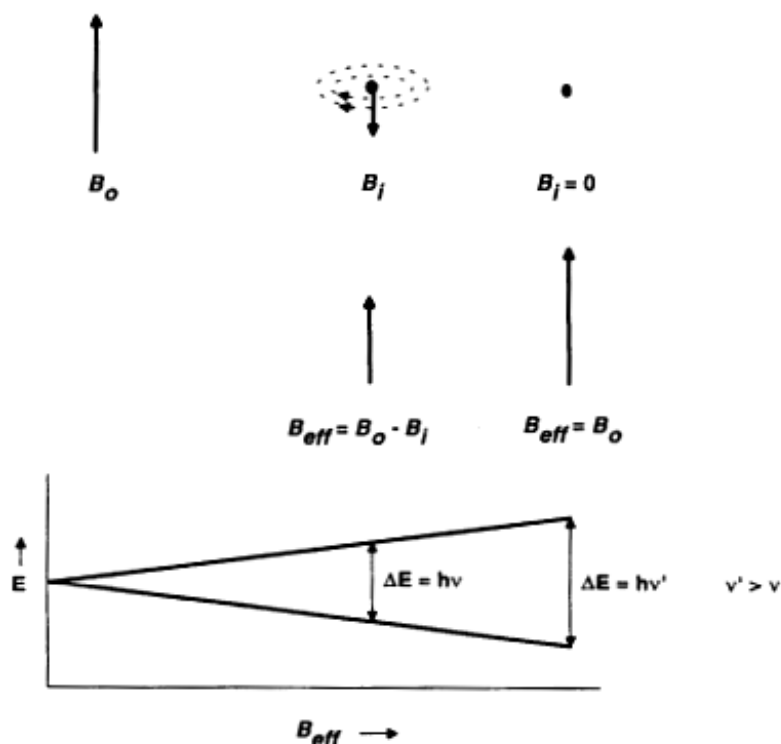


Рисунок 3 – Эффект диамагнитного экранирования. Пунктиром представлено движение электронов по своим орбиталам под влиянием B_0 [11]

Переходы между этими (рисунок 2 и 3) энергетическими уровнями и является физической основой спектроскопии ЯМР, при котором поглощается электромагнитное излучение ядрами образца, помещенного в постоянное магнитное поле.

Вектор магнитного момента ядра в магнитном поле прецессирует с характерной угловой частотой, называемой частотой Лармора (ω), которая является функцией только γ и B_0 :

$$\omega = \gamma B_0. \quad (3)$$

Угловая частота Лармора (рад/с) может быть преобразована в линейную частоту ϑ (1/с или Гц) путем деления на 2π :

$$\vartheta = \frac{\omega}{2\pi} = \frac{\gamma B_0}{2\pi}. \quad (4)$$

На рисунке 4 показана прецессия векторов магнитных моментов двух ядер. Отметим также, что частота прецессии не зависит от m , прецессия спинов

данного ядра протекают с одинаковой частотой в определенном магнитном поле.

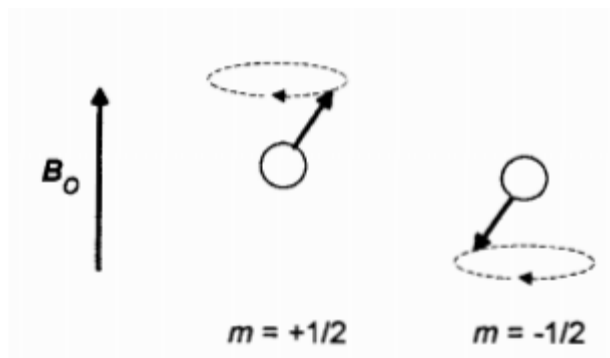


Рисунок 4 – Прецессия магнитных моментов в двух возможных спиновых состояниях ядер с $I = 1/2$ во внешнем магнитном поле B_0 [11]

Уравнение (3) и является условием резонанса для рассматриваемой системы [10].

Как уже говорилось, с помощью внешнего радиочастотного (РЧ) излучения вызываются переходы между собственными состояниями ядра на диаграмме энергетических уровней [10, 14]. Поглощение энергии можно записать как спектральную линию или резонансный сигнал. Различным протонам в молекуле соответствуют разные сигналы в ^1H ЯМР спектре. Значение резонансной частоты определенного ядра зависит от молекулярной структуры. Это эффект вызван различным химическим окружением протонов, его называют химическим сдвигом. По его значению можно сказать о том, в каком химическом окружении находится ядро, дающее данный резонансный сигнал. Величина химического сдвига безразмерна, но его "размерность" часто выражается в м. д. (миллионные доли, ppm) как следствие коэффициента 10^6 в следующем уравнении [11]:

$$\delta_i = \frac{10^6 \cdot (\nu_i - \nu_{\text{эталон}})}{\nu_0} \quad (5)$$

где ν_i – резонансная частота ядра i , $\nu_{\text{эталон}}$ – резонансная частота опорного сигнала – тетраметилсилана (TMS), ν_0 – рабочая частота спектрометра. Эта система, которая дает одинаковую числовую шкалу положения резонансной линии независимо от напряженности поля спектрометра или рабочей частоты.

Сигналы в спектре имеют разные интенсивности. Площадь под резонансным сигналом пропорциональна количеству магнитных ядер, образующих этот сигнал. Поэтому, если в молекуле содержится несколько групп эквивалентных магнитных ядер, то отношение суммарной площади всех компонентов каждого мультиплета под отдельными сигналами будет отвечать отношению количества ядер, которые дают эти сигналы. Ее можно измерить интегрированием спектра с помощью специального программного обеспечения самого спектрометра, и таким образом появляется возможность сделать выводы об относительных количествах ядер, дающих сигналы. Такой анализ интегральной кривой очень важен при изучении спектров ЯМР сложных соединений [19].

Еще не все спектральные линии являются синглетами, то есть не имеют простую форму. Для некоторых сигналов наблюдается характерное расщепление, приводящее к образованию мультиплетов. Дублетом называется сигнал, который расщеплен на две компоненты, триплетом – на три, квартетом – на четыре и т.д. Это расщепление является следствием спин-спинового взаимодействия — магнитного взаимодействия между отдельными соседними ядрами в молекуле, которое передается через электроны химических связей, косвенно соединяющих эти ядра. Для примера рассмотрим два соседних ядра A и B , которые имеют разные значения химического сдвига на спектре. На рисунке 5 схематически представлена диаграмма энергетических уровней ядра A при различных случаях.

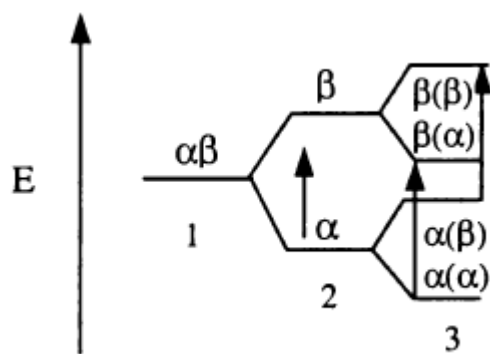


Рисунок 5 – Энергетическая диаграмма ядра A при разных обстоятельствах. α – состояние, соответствующее низкой энергии, β – состояние, соответствующее высокому энергетическому положению [11]

В общем случае, наличие соседнего спина приводит к расщеплению сигнала ядра A. На рисунке 5 область 1 соответствует ситуации, при котором отсутствует внешнее магнитное поле, когда энергии состояний α и β совпадают. А область 2 – эта ситуация, которая возникает во внешнем магнитном поле при отсутствии ядра B, здесь наблюдается расщепление энергетических уровней. Область 3 – ситуация в присутствии соседнего ядра B.

Для ядра B можно также прийти к такому соображению. Такое взаимодействие дает возможность определить положения ядер относительно друг друга, т. к. константа спин-спинового взаимодействия (КССВ, J), зависит от числа и типа связей, разделяющих ядра. КССВ отображает расстояние между соседними компонентами в каждом из мультиплетов и не зависит от рабочей частоты спектрометра [19]. Вместе с тем, мультиплетности резонансных сигналов и распределение интенсивностей внутри этих мультиплетов в простых случаях строго определяются числом ядер в соседних группировках [16, 18].

1.2. Двумерная спектроскопия ядерного магнитного резонанса

Как уже говорилось, ЯМР спектроскопия является устоявшимся методом для структурного анализа различных веществ. Как правило, одномерные ^1H и ^{13}C ЯМР спектры интегрируются и разделяются на несколько различных диапазонов химического сдвига, каждый из которых соответствует определенному набору химических сред. В одномерных ЯМР спектрах определяются химические сдвиги, характеризующие химическое окружение различных ядер. Но никакой информации о пространственной среде между наблюдаемыми ядрами таким образом получить не удастся. Введение второй частотной переменной дает возможность связать спины относительно их парных взаимодействий. Между системами ядерных спинов существуют следующие взаимодействия: скалярное спин-спиновое взаимодействие, вызванное электронами ядер (J -связь), и магнитное диполь-дипольное взаимодействие через пространство. Оба взаимодействия могут быть использованы для передачи когерентности между спинами, и этот перенос является ключевым условием для получения двумерных ЯМР спектров [20].

Двумерная ЯМР спектроскопия позволяет получить более детальную информацию путем введения второй независимой переменной частоты. Вторая частотная область предоставляет информацию о пространственных или напрямую связующих взаимодействиях между парами атомов. Существующие электронные связи взаимодействия между ядрами дают информацию о связности атомов. Диполь-дипольная связь между пространственно близкими ядрами приводит к переносу намагниченности за счет ядерного эффекта Оверхаузера.

Как уже говорилось, одномерные ЯМР спектры представляют собой графики зависимости интенсивности от частоты; а в двумерной спектроскопии интенсивность строится как функция двух частот, обозначаемых как F_1 и F_2 [20]. И двумя этими величинами определяется положение каждого пика.

На рисунке 6 схематично представлен спектр одной молекулы, содержащей всего два протона, A и B , которые взаимодействуют между собой какой-то определенной связью. Одномерные спектры построены по осям F_1 и F_2 . δ_A и δ_B обозначение химических сдвигов протонов A и B соответственно.

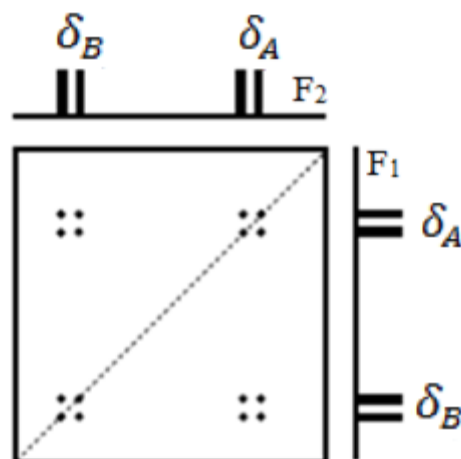


Рисунок 6 – Схематический спектр для двух связанных спинов (A и B)

[20]

В одномерном спектре скалярные связи порождают мультиплеты в спектре. В двумерном спектре сигналы бывают двух типов: диагональные, которые центрируются вокруг одних и тех же F_1 и F_2 частотных координат и кросс-пики, которые центрируются вокруг разных F_1 и F_2 координат. Таким образом, в схеме спектра существует два диагональных пика с центром в $F_1 = F_2 = \delta_A$ и $F_1 = F_2 = \delta_B$, первый кросс-пик – мультиплет с центром в $F_1 = \delta_A$ и $F_2 = \delta_B$, а второй кросс-пик наблюдается при $F_1 = \delta_B$ и $F_2 = \delta_A$.

Появление в спектре кросс-пигов указывает на то, что два протона при значениях химического сдвига δ_A и δ_B имеют связь между собой. Именно эта простота является большим преимуществом таких спектров. Из одного такого спектра можно проследить всю сеть связей в молекуле.

Сигнал в двумерном ЯМР эксперименте записывается как функция двух временных переменных, t_1 и t_2 . Чтобы получить спектр, проводится двумерное

Фурье-преобразование. Основная схема двумерной спектроскопии представлена на рисунке 7. Его можно разделить во временной области на 4 этапа [21]:

- 1) Подготовка;
- 2) Эволюция t_1 ;
- 3) Смешивание;
- 4) Детектирование t_2 ;

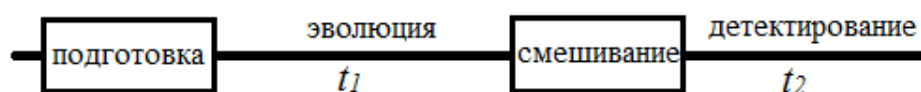


Рисунок 7 – Схематическое временное представление двумерного ЯМР эксперимента

Период подготовки состоит из 90° импульса. Под его действием формируется поперечная намагниченность. И эта компонента изменяется на протяжении времени эволюции t_1 . Во время периода смешивания происходит перенос поляризации между компонентами поперечной намагниченности, которые связаны между собой различными взаимодействиями. Во время детектирования сигналы регистрируются через равные промежутки времени t_2 , после проводится двумерное Фурье-преобразование [19].

Существует огромное количество экспериментальных импульсных последовательностей, используемых в двумерной спектроскопии ЯМР. Это расширило область применения ЯМР для изучения сложных молекул, включая природные продукты, пептиды, белки и другие биополимеры. В настоящее время почти все ЯМР исследования биологических макромолекул в значительной степени зависят от методов 2D ЯМР.

Применение гомоядерной 2D ЯМР спектроскопии зависит от характеристики обменных протонов до описания протяженных спиновых систем, в то время как гетероядерные 2D ЯМР спектры являются очень мощным инструментом для детального структурного анализа углеродного скелета исследуемых веществ.

Большое значение 2D ЯМР спектроскопии для структурного анализа веществ заключается в сочетании информации из двух (идентичных или различных) 1D ЯМР спектров, дающих значительно более детальную информацию о химической среде отдельных спинов. В то время как 2D ЯМР спектры дают информацию о связи между ядрами разного типа, необходимую для спектрального анализа [20].

1.2.1. Спектроскопия DOSY эксперимента

Поступательное движение молекул в жидкости, в отличие от вращательного, известно как Броуновское молекулярное движение, и часто просто называется диффузией или самодиффузией. Метод ЯМР, который основан на этом процессе, называется диффузионно-упорядоченной спектроскопией (DOSY, Diffusion ordered spectroscopy). В этом эксперименте обычная ЯМР спектроскопия объединяются с градиентами магнитного поля[22].

Процесс диффузии зависит от таких физических параметров как размер и колебания молекул, температура, вязкость. Если примем форму молекулы за сферическую, коэффициент диффузии D можно описывать уравнением Стокса-Эйнштейна [23]:

$$D = \frac{kT}{6\pi\mu r_s}, \quad (6)$$

где k — постоянная Больцмана, T — температура, μ — вязкость жидкости и r_s — гидродинамический радиус молекулы.

Импульсное градиентное поле ЯМР спектроскопии используется для измерения коэффициентов диффузии молекул. Градиент магнитного поля позволяет сделать молекулы пространственно-мечеными. Если они перемещаются после кодирования или «маркировки» в течение времени диффузии (Δ), которое следует в последовательности импульсов, их новое положение может быть декодировано вторым градиентом (рисунок 8 (а)). Ослабление интенсивности сигнала зависит от коэффициента диффузии (D), времени диффузии (Δ) и параметров градиента (величины градиента поля g и длительности воздействия δ). Значение коэффициента диффузии может быть рассчитано аппроксимацией кривой затухания сигнала эха (рисунок 8 (б)). Изменение интенсивности описывается уравнением [23]:

$$I = I_0 e^{-D\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)}, \quad (7)$$

где I – наблюдаемая интенсивность, I_0 – начальная интенсивность – неослабленная интенсивность сигнала, D – коэффициент диффузии, γ – гиромагнитное отношение наблюдаемого ядра, g – амплитуда градиента, δ – длительность градиента, Δ – время диффузии.

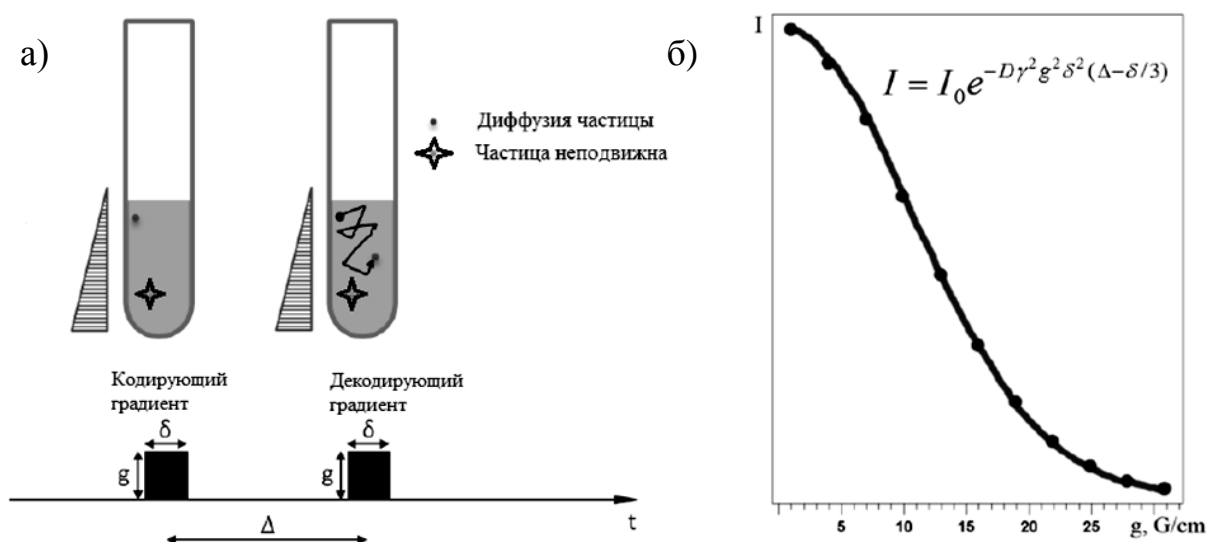


Рисунок 8 – Применение градиентных импульсов (а). Зависимость интенсивности сигнала ЯМР от величины градиента поля g (б)

Для упрощения уравнения (7) некоторые параметры часто комбинируют, чтобы подчеркнуть затухание экспоненты:

$$I = I_0 e^{-Dq^2(\Delta - \delta/3)} \text{ или } I = I_0 e^{-DQ}. \quad (8)$$

Если биполярный градиент использовался для дефазировки и рефазировки поправки во времени τ между этими биполярными градиентами, то применяется уравнение:

$$I = I_0 e^{-D\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \frac{\delta}{3} - \frac{\tau}{2})}. \quad (9)$$

Для точного измерения коэффициента диффузии качество градиентных катушек играет очень большую роль. Градиенты должны быть линейными по отношению к объему образца [23].

ЯМР эксперимент по DOSY разрешает сигналы различных компонентов в смеси на основе измерения их переменных коэффициентов диффузии без физического разделения компонентов в образце [24]. Эксперименты DOSY применяются для исследования сольватации [25], образования ионных пар [26], водородных связей [27], включений [28], межмолекулярных комплексов [29], органометаллических комплексов [30], мицелл [31, 32], ионных жидкостей [33], микроэмульсий [34], определения размера молекул и агрегатов [35] и другие. Существует несколько факторов, которые влияют на значение коэффициента диффузии.

Во-первых, один очень важный экспериментальный параметр при измерениях коэффициента диффузии - это высокая стабильность температуры [23]. Плохая температурная стабильность приводит к различию температур вдоль образца, т.е. устанавливаются различные температуры в нижней и верхней части трубки. Разность температур приводит к появлению конвекции в образце. Это такой же эффект как диффузия, молекулы двигаются, но большинство из них двигаются быстрее, чем в процессе диффузии.

Во-вторых, при использовании растворителей низкой вязкости, имеет место похожий эффект, если температура слишком близка к точке кипения растворителя. Растворитель сильно испаряется, возникает конденсация в

верхней части ампулы и капли растворителя спускаются вниз вдоль стенок ампулы обратно в раствор. Этот процесс приводит к возникновению потока, который очень похож на конвекцию и также препятствует измерению диффузии [23].

Как уже говорилось, эксперименты DOSY выполняются путем объединения обычных последовательностей импульсов, используемых в ЯМР, с градиентами магнитного поля. Простейшая форма диффузионного эксперимента, описанным уже Стейскалом и Таннером в 1965 году, называется последовательностью импульсного градиентного спин-эхо (PGSE, Pulsed-Gradient Spin-Echo) [36 - 38] (рисунок 9).

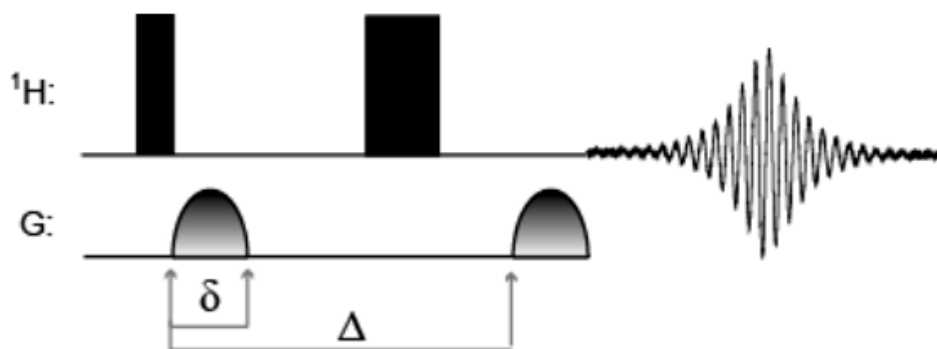


Рисунок 9 – Последовательность импульсов PGSE для эксперимента 2D DOSY, где δ – длина градиента, Δ – время диффузии. Первый прямоугольник – 90° импульс, второй – 180° импульс [19]

В последовательности (рисунок 9) градиент магнитного поля g включают между 90° и 180° радиочастотными импульсами, между 180° импульсом и сигналом эхо [38]. Намагниченность возбуждается радиочастотным 90° импульсом, а затем рассеивается с использованием градиентного импульса магнитного поля. После периода $\Delta/2$ радиочастотный 180° импульс инвертирует рассеянную намагниченность, так что после периода Δ намагниченность является отрицательной по сравнению с импульсом

градиента. В этот момент второй градиентный импульс применяется для перефокусировки сигнала.

1.2.2. Эксперименты, основанные на ядерном эффекте Оверхаузера

Ядерным эффектом Оверхаузера (ЯЭО) (Nuclear Overhauser Effect, NOE) называется явление изменения интенсивностей сигналов ЯМР при дополнительном облучении одного из магнитных ядер, при котором ядерный спин выводится из состояния теплового равновесия. Если селективно облучить один из сигналов в спектре, то интенсивности других сигналов могут измениться. То есть, эффект NOE – это изменение заселенности одного протона (т.е. водорода или другого ядра), когда другое магнитное ядро насыщается селективным 90- или 180-градусными импульсами. ЯЭО наблюдается более сильно у пространственно близко расположенных магнитных ядер. Поэтому такие эксперименты используют для определения внутри- и межмолекулярных расстояний [39].

Когда протон находится в пространстве близко к другому протону (или любому другому ядру со спином больше 0), их магнитные диполи взаимодействуют (диполь-дипольное взаимодействие, ДДВ). Это взаимодействие отличается от J -связи, которая не зависит от пространственной локализации, а связана с поляризацией электронов в молекуле [39]. Влияние ДДВ на вид ЯМР спектра полностью усредняется при обычном вращении молекул в растворе, если среда изотропна и вязкость достаточно низкая, чтобы обеспечить достаточно быстрое молекулярное движение.

Спектроскопия одномерного селективного NOESY эксперимента

Селективный NOESY эксперимент является одним из популярных методик ЯЭО [40]. Этот эксперимент является самостоятельным, несмотря на то, что ее название близко к соответствующему двумерному методу, также требует меньше времени.

Сегодня наиболее распространен эксперимент, основанный на двухимпульсной градиентной спиновой эхо последовательности, DPFGE (рисунок 10) [19].

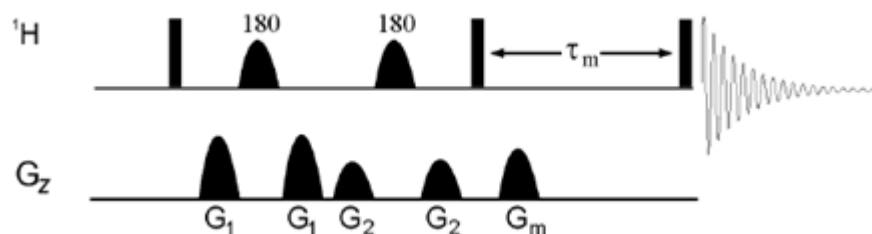


Рисунок 10 – Схема импульсной последовательности 1D селективного NOESY эксперимента, основанная на селективном возбуждении с градиентным отбором [19]

На рисунке 10 G_1 , G_2 и G_m – градиенты магнитного поля, τ_m – время смешивания, 180° импульсы – селективные, 90° – неселективные.

Этот эксперимент позволяет селективно рефокусировать намагниченность выбранного спина, в то время как другие сигналы остаются расфазированными и в спектре не наблюдаются. Данная методика является быстрой, потому что нет необходимости долгого накопления сигнала [41].

Данная последовательность импульсов (рисунок 10) начинается с неселективного 90° импульса, который переводит вектор намагниченности в поперечную плоскость. Далее следует две последовательности

градиентного спинового эха, где 180° импульсы являются селективными. Градиенты, подающиеся до и после данного селективного импульса, позволяют селективно рефокусировать избранные сигналы, при этом все остальные расфазировываются.

Для более полной расфазировки всех остальных сигналов применяется вторая часть последовательности градиентного спинового эха. Используемые в нем пары градиентов меньше по амплитуде от предыдущих. Это делается для того, чтобы рефокусировать намагниченности, которые были расфазированы предыдущим градиентным спиновым эхом.

Далее следует 90° импульс, который располагает выбранный вектор намагниченности вдоль оси z . Это приводит к нарастанию ЯЭО. Существенным отличием остальных экспериментов от 1D NOESY является то, что в данном случае за время смешивания возникают лишь сигналы ЯЭО. Все первичные сигналы становятся расфазированными и в спектре не проявляются. Дополнительный импульс G_m используется для удаления из поперечной плоскости остаточных компонентов намагниченности.

Спектроскопия двумерного NOESY эксперимента

Преимуществом двумерных методов, в отличие от одномерных методик, является то, что в одном эксперименте есть возможность определить все близко расположенные магнитные ядра. Например, в одномерном селективном NOESY эксперименте требуется проведения множества независимых экспериментов. А исследование полученных результатов по двумерной спектроскопии позволяет построить пространственную модель молекулы. Следует отметить, что ЯЭО может наблюдаться на расстоянии не более чем 5 \AA между ядрами [42], так как только в этом случае диполь-дипольное взаимодействие действительно дает существенный вклад в механизм релаксации.

С помощью данного эксперимента можно получить два информативных взаимодействия, в которые могут быть вовлечены z-компоненты намагниченности: химический обмен с другим ядром и ЯЭО [14].

Последовательность данного метода состоит из трех 90° импульсов (рисунок 11) [19]. Первый и второй импульсы разделяются переменным временем t_1 , за которым следует постоянное время смешивания τ_m , далее следует третий импульс и регистрация спада свободной индукции (ССИ).

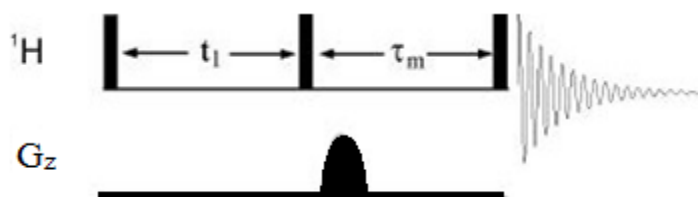


Рисунок 11 – Импульсная последовательность эксперимента 2D NOESY [19]

Первый импульс создает поперечную намагниченность, позволяя ей эволюционировать в течение времени t_1 , то есть во время t_1 релаксация происходит при частотах, соответствующих собственным химическим сдвигам ядер. Таким образом, каждый спин оказывается «помеченным» своей резонансной частотой. Вторым импульсом создается намагниченность опять в направлении z, где происходит обмен намагниченностями в течение времени τ_m . Если других путей релаксации нет, то система будет релаксировать со временем продольной релаксации T_1 . Если же ядра связаны диполь-дипольным взаимодействием, то за время τ_m могут «включиться» кросс-релаксации. Кросс-релаксация – это релаксация, включающая изменение спиновых состояний, ориентаций для разных типов спинов в многоспиновой системе. Ядра «обмениваются» частотами и в течение времени t_2 после третьего 90° импульса либо вследствие химического обмена, либо вследствие диполь-дипольного взаимодействия намагниченность уже будет эволюционировать с другим

химическим сдвигом. Вероятность такого события будет зависеть от скорости кросс-релаксации и времени смешивания τ_m , а также от скорости продольной релаксации, приводящей к уменьшению сигнала. После двойного преобразования Фурье по временам t_1 и t_2 в двумерном спектре получится кросс-пик на пересечении соответствующих химических сдвигов. [18] Результирующий спектр похож на ЯМР спектр 2D ^1H - ^1H COSY, но кросс-пики наблюдаются между обменивающимися положениями ядер [14].

В случае простых комплексов можно после расчета скорости кросс-релаксации посчитать расстояния. Но в случае комплексов мицелла-соединение или бислой-соединение, точное определение расстояний некорректно и используется собственно константа скорости кросс-релаксации как вероятность контакта между взаимодействующими спинами.

Следует отметить, что ЯМР эксперименты DOSY и NOESY могут обеспечить понимание поверхностного присоединения функциональных групп и молекулярных взаимодействий. DOSY эксперименты используются для сортировки различных видов молекул в соответствии с их размером, поскольку коэффициент диффузии обратно пропорционален гидродинамическому радиусу, тогда как NOESY эксперименты позволяют отслеживать взаимодействия наночастиц с лигандами, в том числе при быстрой адсорбции или десорбции, и в сложных смесях растворителей [23].

2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования являлись следующие терпеновые соединения: камфеновый сульфид 2-(((S)-(3,3-диметилбицикло-[2.2.1]-гептан-2-ил)метил)сульфид)этан-1-ол (соединение **I**), камфеновый сульфоксид 2-(((S)-(3,3-диметилбицикло-[2.2.1]-гептан-2-ил)метил)сульфоксид)этан-1-ол (соединение **II**) и тиотерпеноиды борнановой серии: 2-((S)-(1,7,7-триметилбицикло-[2.2.1]-гепт-2-ил)тио)уксусная кислота (соединение **III**), 2-((S)-(1,7,7-триметилбицикло-[2.2.1]-гепт-2-ил)тио)ацетат натрия (соединение **IV**), экзо-1,7,7-триметилбицикло-[2.2.1]-гептан-2-ол (соединение **V**). Химические структуры исследуемых монотерпеноидов представлены на рисунке 12.

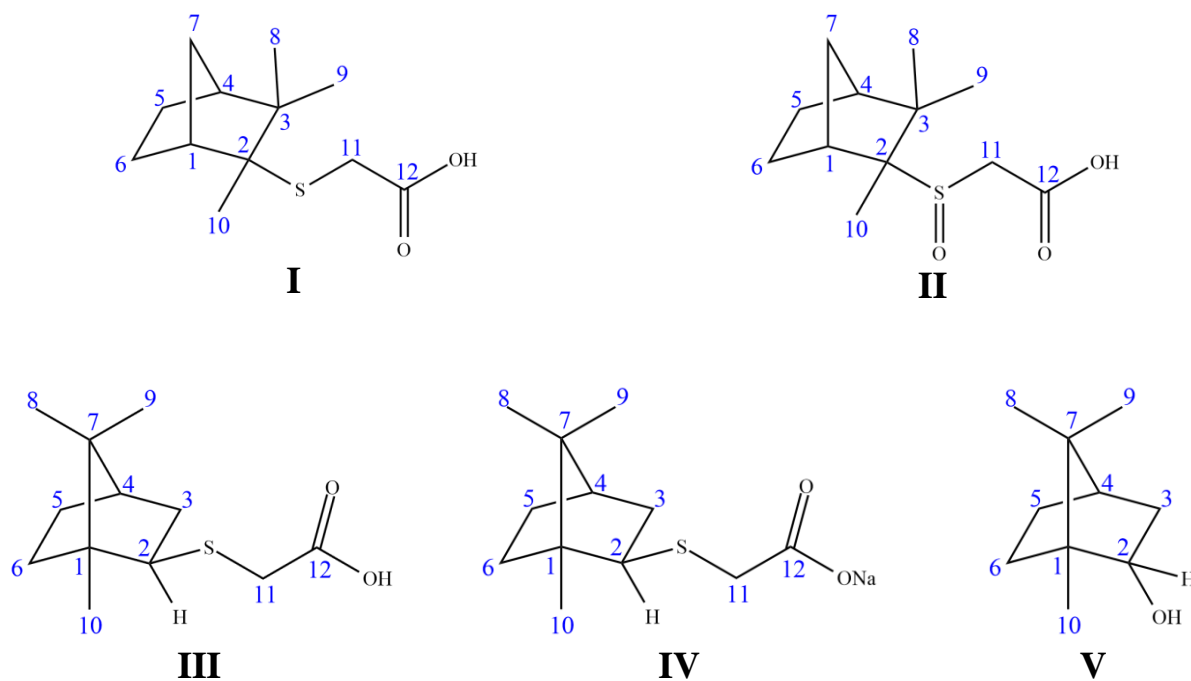


Рисунок 12 – Структурные формулы объектов исследования: терпеноиды камфеновой (**I**, **II**) и борнановой (**III** – **V**) серии

Химические структуры исследуемых веществ (рисунок 12) после синтеза были подтверждены мной ранее путем регистрации и анализа следующих ЯМР спектров в растворах хлороформа CDCl_3 , воды D_2O и ацетона $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$: $1\text{D } ^1\text{H}$ и ^{13}C , $2\text{D } ^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC и $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY [43].

2.2. Материалы и методы

Исследуемые биологические монотерпеноиды являются потенциальными лекарственными веществами для профилактики или лечения сердечно-сосудистых заболеваний [4]. Они, помимо антитромботических свойств, обладают также противогрибковой, антибактериальной и противовоспалительной активностями, являются соединениями низкой токсичности. Исследуемые монотерпеноиды были синтезированы в Казанском государственном медицинском университете под руководством д.х.н., профессора Никитиной Л.Е. [7, 44].

С помощью ЯМР спектроскопии высокого разрешения возможно изучение взаимодействия различных органических соединений с моделями клеточных мембран: мицеллы, бицеллы, фосфолипидные везикулы. Мицеллы формируются с помощью поверхностно-активных веществ (ПАВ) при определённой концентрации (так называемой, критической концентрации мицеллообразования) последних в растворе. В наших экспериментах в качестве ПАВ был использован додецилфосфохолин (ДФХ, DPC). Головная группа молекулы ДФХ идентична с фосфатидилхолином - одной из самых распространенных молекул в клеточной мембране [45 – 48]. В экспериментах растворы мицелл были приготовлены с использованием смеси дейтерированного (больше 98%) и недейтерированного ДФХ. В то же время мицеллы на основе ДФХ по размеру намного меньше, по сравнению с фосфолипидными бислоями и, следовательно, более пригодны для

спектроскопии ЯМР в растворе, как показано в работах [49, 50].

На рисунке 13 показана химическая структурная формула молекулы ДФХ, а на рисунке 14 – ее схематическое представление.

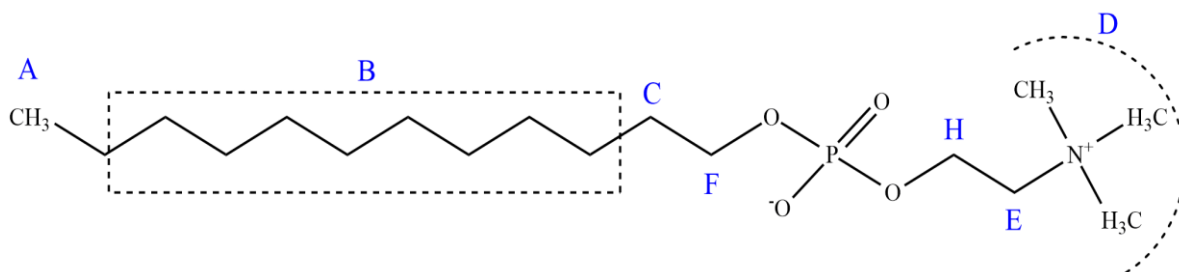


Рисунок 13 – Химическая структурная формула додецилфосфохолина (ДФХ)

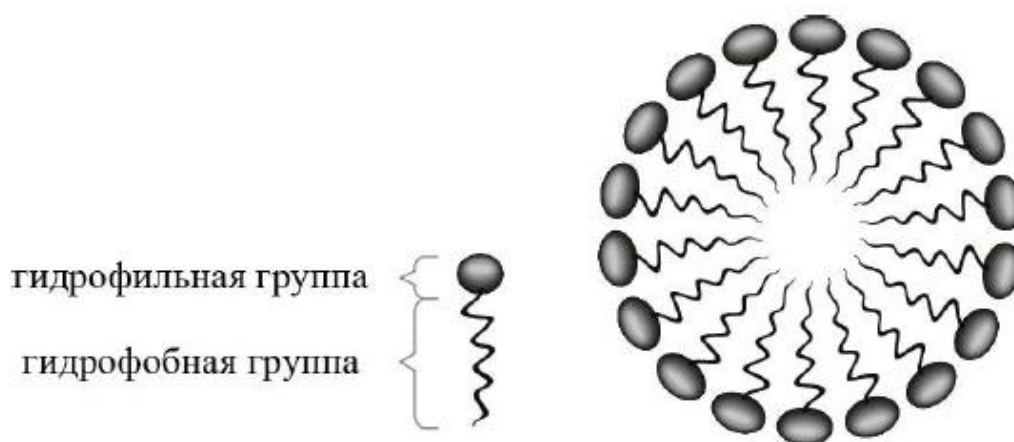


Рисунок 14 – Мицелла, схематическая модель биологической мембраны

В работе применялись следующие методы ЯМР высокого разрешения в растворе: одномерные ^1H селективные NOESY и ^1H эксперименты, двумерные ЯМР эксперименты DOSY и ^1H - ^1H NOESY. Все ЯМР исследования выполнены на спектрометрах Bruker Avance ПТМ – 500 (500 MHz (^1H)) и Bruker Avance

ШТМ – HD – 700 (700 MHz (^1H)) [51], которые представляют собой многофункциональные спектрометры со сверхпроводящим магнитом, работающие в импульсном режиме с преобразованием Фурье, используя стандартное программное обеспечение V.3.1 Bruker TOPSPIN-NMR. Единица измерения химического сдвига – миллионные доли (м.д.). Значения химических сдвигов ^1H сигналов растворителей: D_2O – 4,78 м.д.; CDCl_3 – 7,26 м.д. Температура, при которой проводились эксперименты, составляла 303 К. Суммарный объем, используемых растворителей для одного образца, составлял 500 мкл.

В 2D DOSY экспериментах продолжительность градиентных импульсов магнитного поля была оптимизирована для каждого времени диффузии (t) для получения 1–5% остаточного сигнала с максимальной силой градиента [22]. Градиенты импульса (g) увеличились от 5 до 95% от максимальной силы градиента в линейной функции. Проводили оптимизацию следующих параметров: амплитуда градиента (g), время диффузии (Δ) и длительность градиентного импульса (δ), которые определяют функцию затухания в уравнении (9). Подбор правильных значений важен для того, чтобы получить хорошие константы диффузии с меньшей ошибкой. При проведении расчетов ориентировались на кривую зависимости интенсивности сигнала от градиента, представленную на рисунке 15.

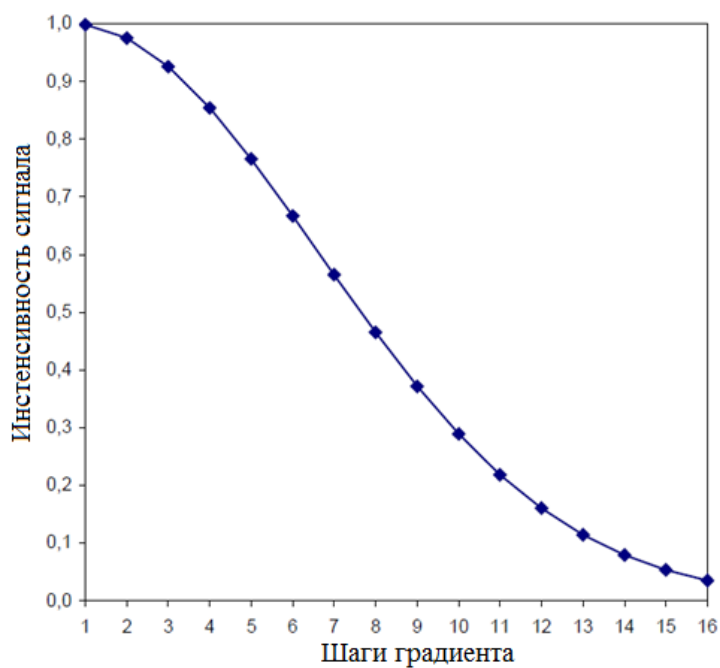


Рисунок 15 – Смоделированная кривая спада диффузии при изменении амплитуды градиента g от 5 до 95% за 16 шагов для одной и той же константы диффузии, но с правильно подобранными Δ и δ [22]

В 2D NOESY экспериментах были использованы импульсные фильтрованные градиенты [52]. Задержка между экспериментами была равна 2 с, длительность 90° импульса составляла 8.0 мкс. Значения времен смешивания (τ_m) составляли: 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 с [53].

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Терпеноиды камфеновой серии

Камфеновый сульфид (соединение **I**) и сульфоксид (соединение **II**) были растворены в смеси $D_2O+(CD_3)_2CO$ и $DPC+dDPC+D_2O+(CD_3)_2CO$ (рисунок 16 и 17).

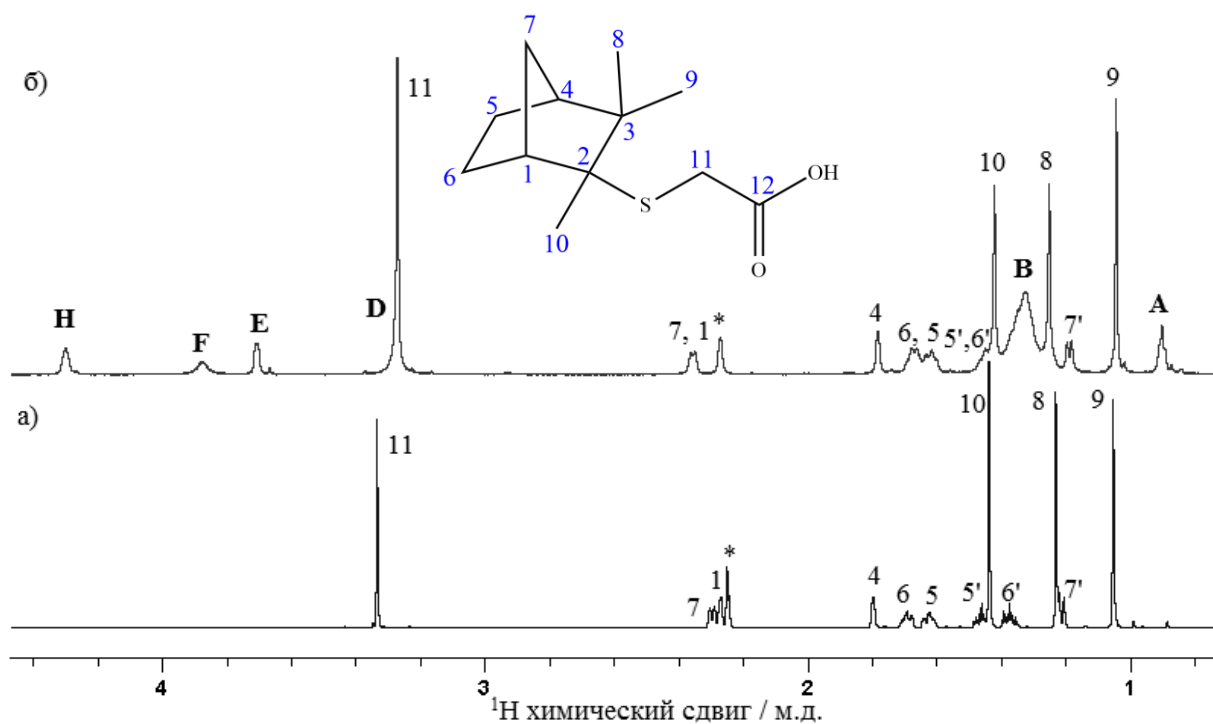


Рисунок 16 – 1H ЯМР спектры соединения **I** в растворах $D_2O+(CD_3)_2CO$ (a) и $DPC+dDPC+D_2O+(CD_3)_2CO$ (б) при $T= 303$ К. Обозначение сигналов соответствует цифрам и латинским буквам на рисунках 12 и 13, * – сигнал ацетона

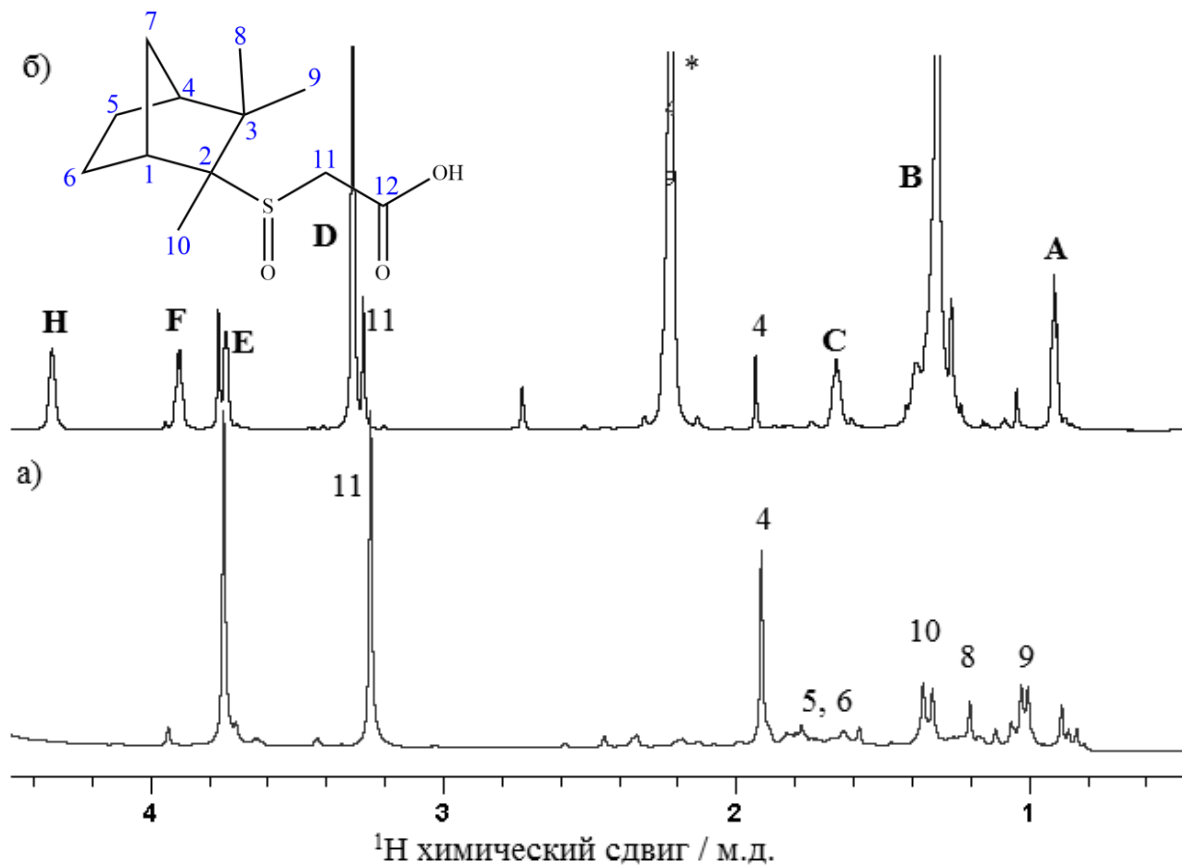


Рисунок 17 – ^1H ЯМР спектры соединения **II** в растворах D_2O (а) и $\text{DPC}+\text{dDPC}+\text{D}_2\text{O}+(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ (б) при $T=298\text{ K}$. Обозначение сигналов соответствует цифрам и латинским буквам на рисунках 12 и 13, * – сигнал ацетона

Полное отнесение линий в ^1H ЯМР спектрах исследуемых соединений (рисунки 16 и 17) проводили с помощью следующих двумерных экспериментов: $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC и $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC. Также отнесение сигналов было основано на анализе мультиплетности сигналов, интегральных интенсивностей и характерных таблиц химических сдвигов. ^1H ЯМР спектр соединения **I** незначительно изменяется в присутствии ДФХ. Если провести сравнение со спектром в растворе дейтерированной воды и ацетона, то наблюдаются лишь небольшие сдвиги некоторых сигналов в сторону высоких полей. А в случае соединения **II** наблюдается изменение мультиплетности

только у протона метильной группы CH_3 -9. Из таких наблюдений можно предположить, что соединения **I** и **II** не образуют устойчивого межмолекулярного комплекса с мицеллой на основе ДФХ.

Для того чтобы убедиться в этом предположении, были зарегистрированы и проанализированы 2D DOSY спектры (рисунок 18 и 19). Коэффициент диффузии D для протонов соединения **I** равен $(3,750 \pm 0,375) * 10^{-10}$ м²/с, для протонов ДФХ – $(2,604 \pm 0,260) * 10^{-10}$ м²/с, а для соединения **II** и ДФХ $(5,700 \pm 0,570) * 10^{-10}$ м²/с и $(4,337 \pm 0,434) * 10^{-10}$ м²/с, соответственно.

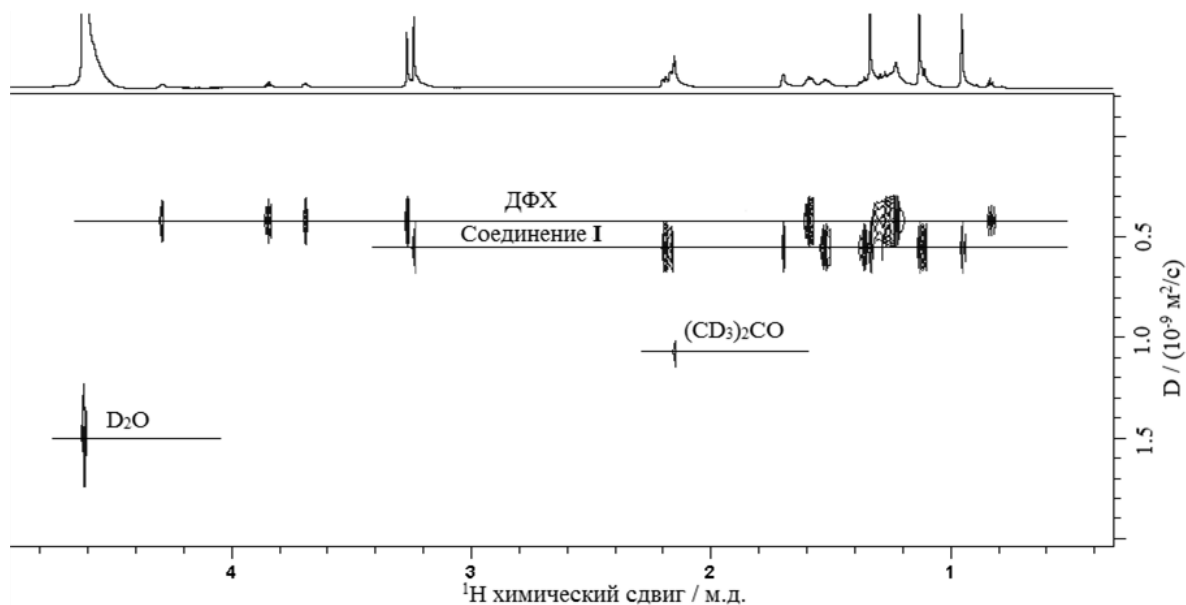


Рисунок 18 – 2D DOSY ЯМР спектр соединения **I** в растворе $\text{DPC} + \text{dDPC} + \text{D}_2\text{O} + (\text{CD}_3)_2\text{CO}$. $T = 298_K$

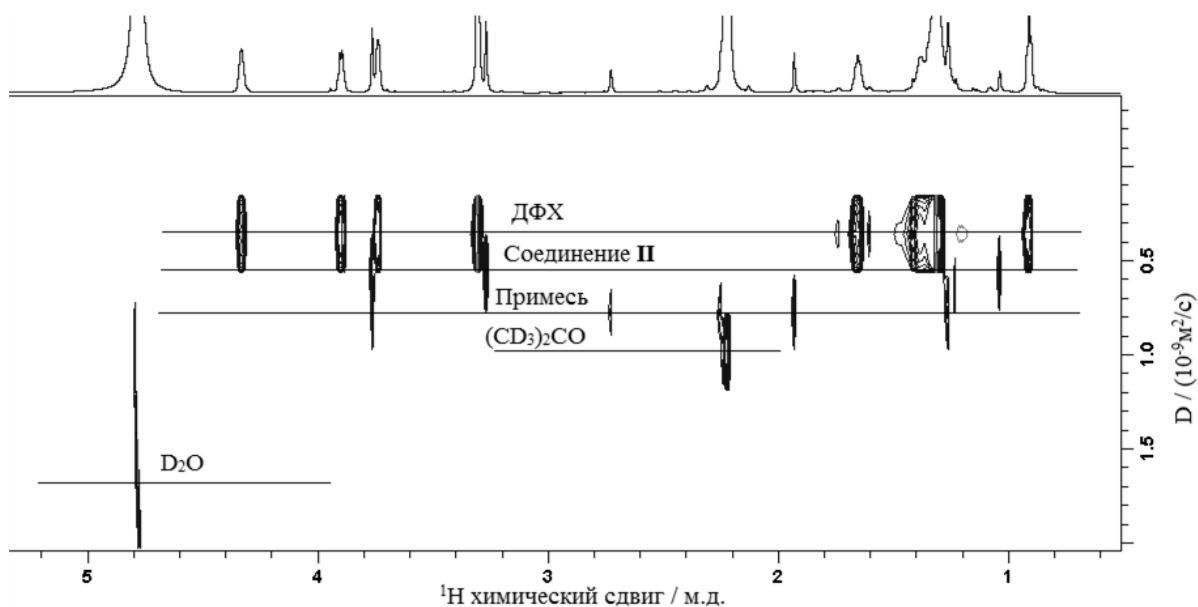


Рисунок 19 – 2D DOSY спектр соединения **II** в растворе DPC+dDPC+D₂O+(CD₃)₂CO. T = 298 K

Коэффициенты диффузии ДФХ и исследуемых соединений даже в пределах ошибки не близки по значениям. Это означает, что камфеновые терпеноиды не образует устойчивого комплекса с модельной мембраной, а всего лишь локализуются на поверхности мицеллы. Также были проведены 2D NOESY и 1D selective NOESY ЯМР эксперименты, которые подтвердили этот факт.

3.2. Терпеноиды борнановой серии

Терпеноиды борнановой серии – соединения **III**, **IV**, **V** (рисунок 12) – являются конформационно жесткими и могут закрепляться в липидном бислое [9, 54]. Отнесение ^1H сигналов в одномерных спектрах исследуемых соединений (**III**, **IV**, **V**) (рисунок 12) в растворе были сделаны на основании анализа следующих двумерных ЯМР экспериментов: ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC и ^1H - ^1H COSY [43].

Борнановый сульфид (соединение **III**) был приготовлен в растворе хлороформа CDCl_3 и в смеси $\text{D}_2\text{O}+\text{DPC}+\text{dDPC}$ (рисунок 20).

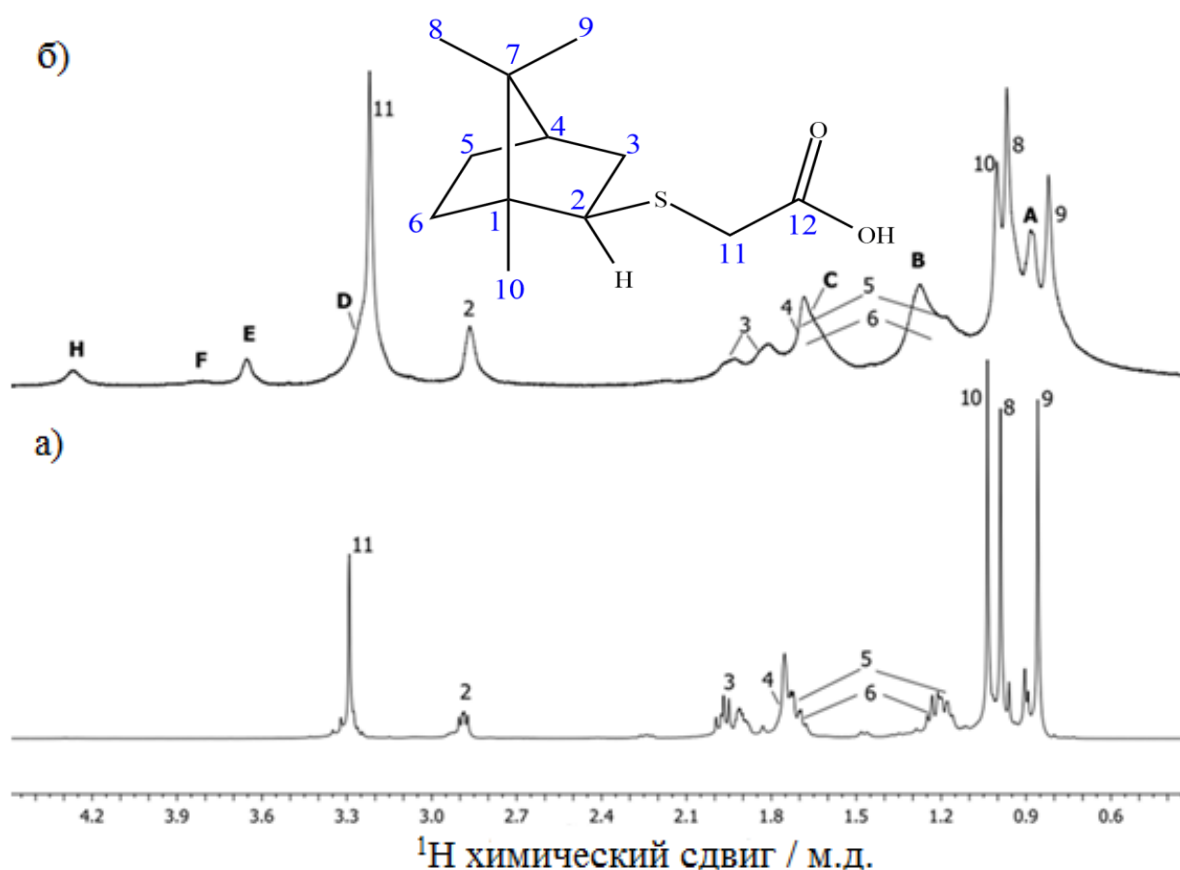


Рисунок 20 – ^1H ЯМР спектр борнанового сульфида (соединение **III**) в растворах CDCl_3 (а) и в $\text{D}_2\text{O}+\text{DPC}+\text{dDPC}$ (б). $T = 303 \text{ K}$. Обозначение сигналов соответствует цифрам и латинским буквам на рисунках 12 и 13

При сравнении двух протонных спектров (рисунок 20), было замечено, что в присутствии ДФХ наблюдаются следующие изменения сигналов: уширение, изменение мультиплетности и сдвиг в сторону высоких полей. Эти изменения являются одним из возможных признаков образования межмолекулярного комплекса.

Для того, чтобы проверить наличие образования комплекса был зарегистрирован 2D DOSY спектр (рисунок 21). Были получены коэффициенты диффузии D для каждой компоненты исследуемой смеси.

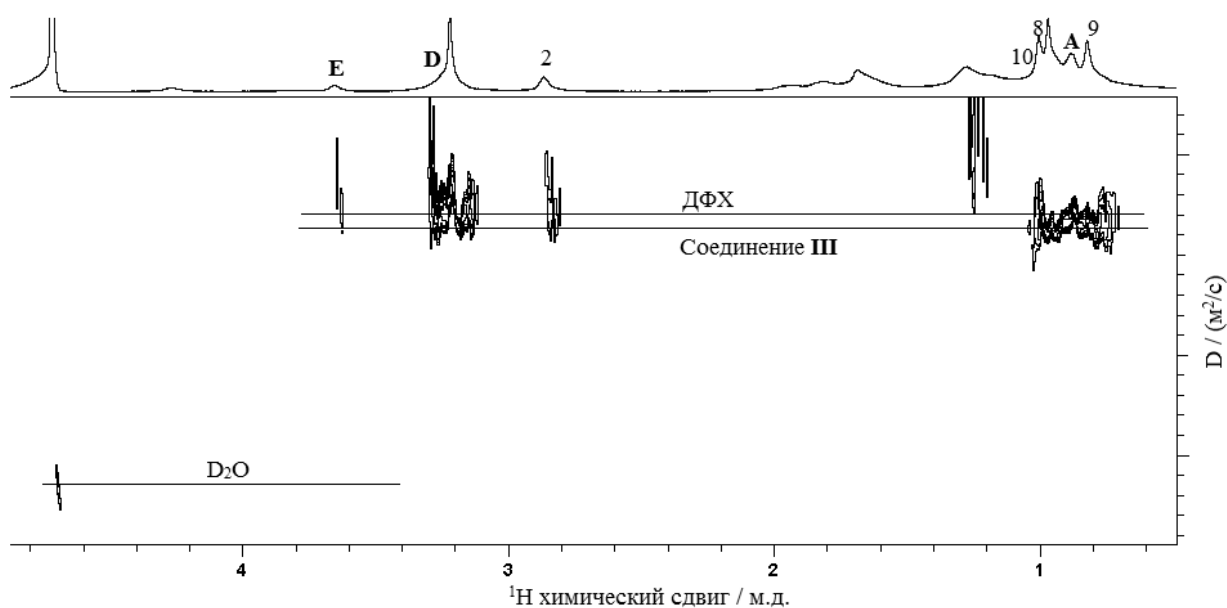


Рисунок 21 – 2D DOSY спектр соединения **III** в растворе DPC+dDPC+D₂O

По данным 2D DOSY ЯМР спектра (рисунок 21) было определено перекрывание сигналов от ДФХ и борнанового сульфида. Это означает, что исследуемое соединение образует комплекс с модельной мембраной. Соответствующие значения коэффициентов диффузии для протонов ДФХ и

борнанового сульфида очень близкие: $(4,118 \pm 0,412) \cdot 10^{-12}$ м²/с и $(4,472 \pm 0,447) \cdot 10^{-12}$ м²/с.

Далее, для того чтобы подробнее исследовать каким образом происходит образование комплекса, был зарегистрирован 2D NOESY спектр. К сожалению, большинство возможных межмолекулярных кросс-пиков перекрывалось с внутримолекулярными пиками. Тем не менее, в спектре наблюдались четко различимые кросс пик между сигналом протона **H-2** соединения **III** и сигналами **H**, **F** и **E** ДФХ (рисунок 22).

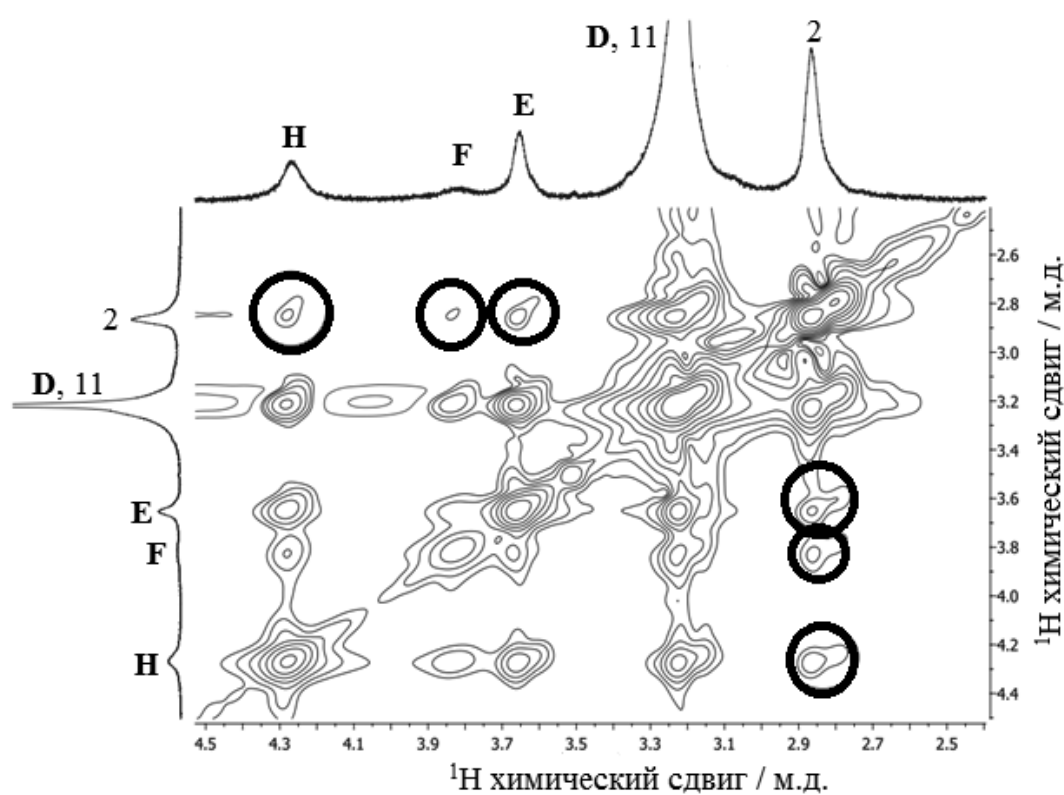


Рисунок 22 – Фрагмент 2D ¹H-¹H NOESY спектра борнанового сульфида в растворе DPC+dDPC+D₂O. T = 303 К. Межмолекулярные кросс-пики обведены кружками. Обозначение сигналов соответствует цифрам и латинским буквам на рисунках 12 и 13

Таким образом, был сделан вывод, что борнанный сульфид образует молекулярный комплекс с мицеллами на основеДФХ и своей циклической частью проникает относительно глубоко в углеводородное ядро модельной мембраны. Образованный комплекс схематически представлен на рисунке 23.

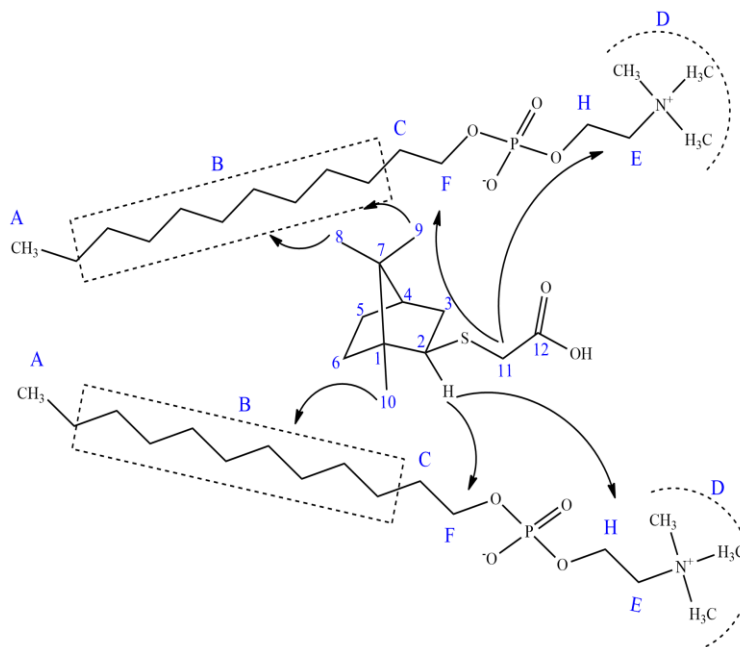


Рисунок 23 – Схематическое представление образования комплекса борнатового сульфида с ДФХ

Соединения **IV** и **V** были приготовлены в растворе D_2O и в смеси $D_2O+DPC+dDPC$ (рисунки 24 и 25).

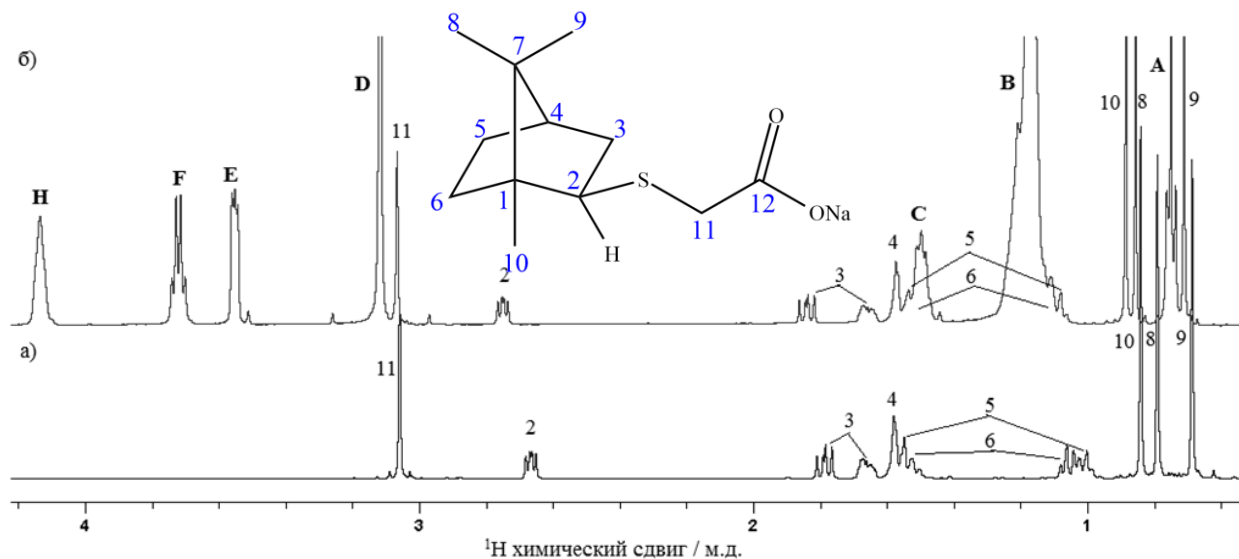


Рисунок 24 – ^1H ЯМР спектр борановой соли в растворах D_2O (а) и $\text{D}_2\text{O} + \text{DPC} + \text{dDPC}$ (б). $T = 303 \text{ K}$. Обозначение сигналов соответствует цифрам и латинским буквам на рисунках 12 и 13

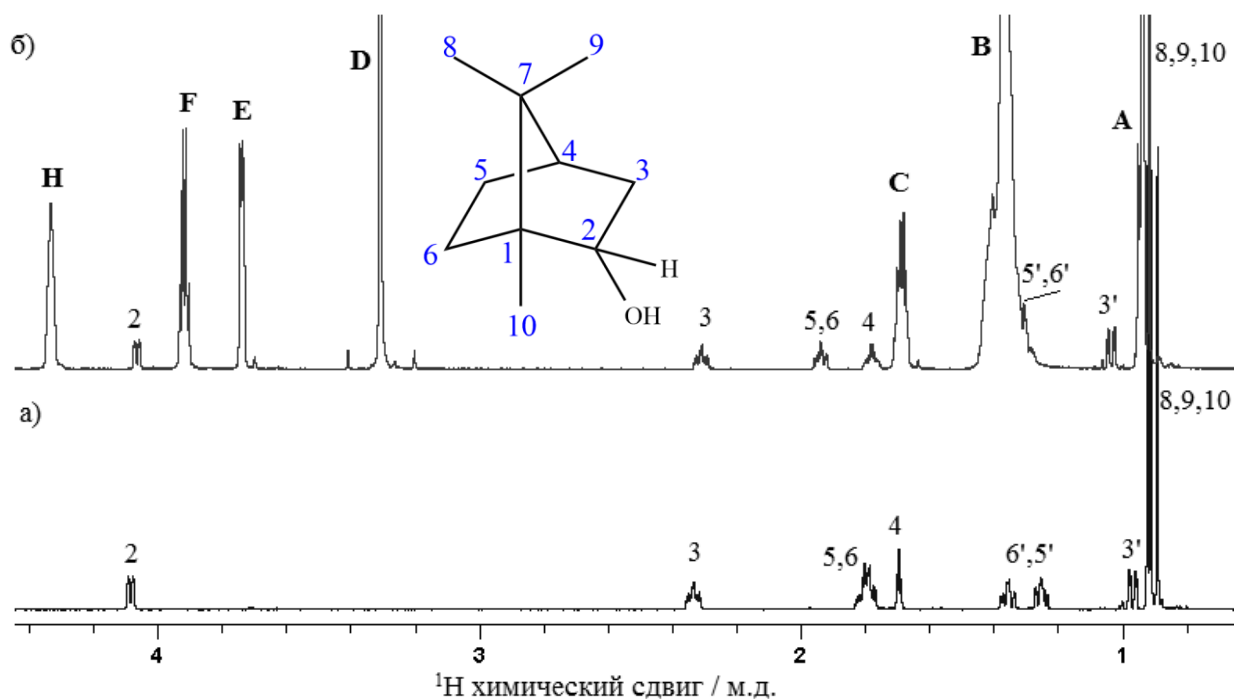


Рисунок 25 – ^1H ЯМР спектр изоборнеола в растворах D_2O (а) и $\text{D}_2\text{O} + \text{DPC} + \text{dDPC}$ (б). $T = 303 \text{ K}$. Обозначение сигналов соответствует цифрам и латинским буквам на рисунках 12 и 13

Как видно по рисункам 24 и 25, ^1H ЯМР спектры исследуемых соединений в D_2O незначительно отличаются от спектров в $\text{D}_2\text{O}+\text{DPC}+\text{dDPC}$. Большинство сигналов смещены в область низких полей примерно на 0,08 м.д., хорошо разрешены, не наблюдается значительного уширения.

Для того чтобы проверить, образуется ли межмолекулярный комплекс между борнановой солью/изоборнеолом и мицеллой на основе ДФХ были проведены 2D DOSY эксперименты (рисунки 26 и 27).

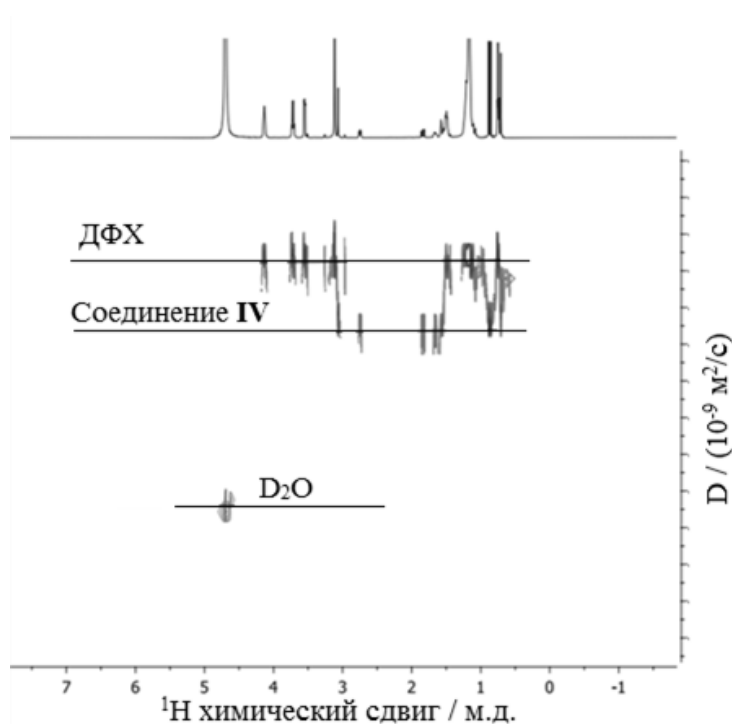


Рисунок 26 – 2D DOSY спектр соединения **IV** в растворах $\text{DPC}+\text{dDPC}+\text{D}_2\text{O}$. $T = 303 \text{ K}$

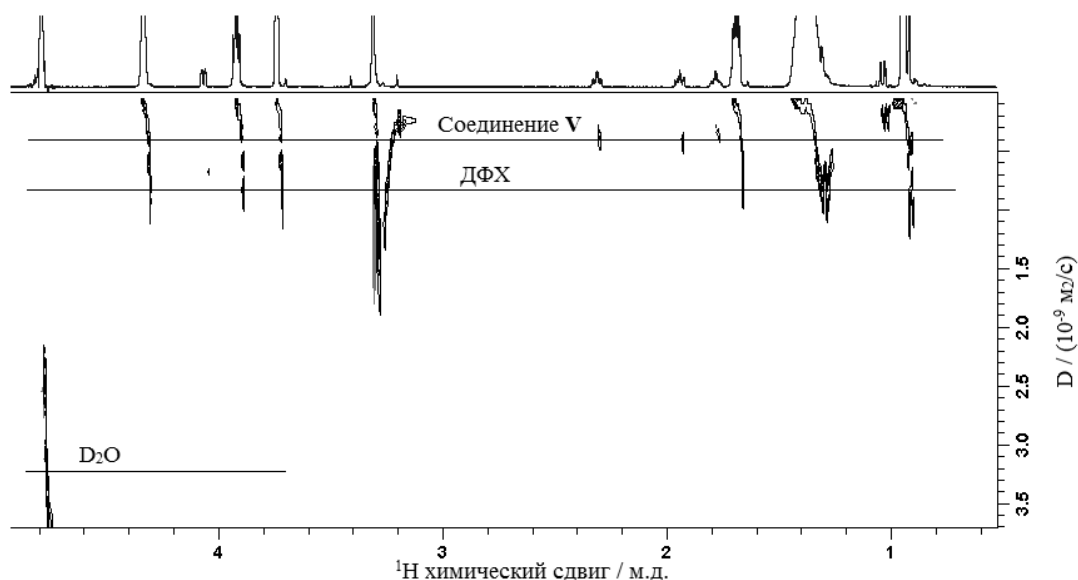


Рисунок 27 – 2D DOSY спектр соединения **V** в растворах DPC+dDPC+D₂O. T = 303 K

Исходя из данных DOSY эксперимента, наблюдались значительно различные значения коэффициентов диффузии для борнановой соли ($D = (1,630 \pm 0,163) * 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$) и ДФХ ($D = (8,010 \pm 0,801) * 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$), а также для изоборнеола ($D = (3,410 \pm 0,341) * 10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$) и ДФХ ($D = (8,670 \pm 0,867) * 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$).

Таким образом, из данных ЯМР в растворе не были получены подтверждения образования стабильного межмолекулярного устойчивого комплекса мицеллы на основе ДФХ с борнановой солью и изоборнеолом. Также для соединений **IV** и **V** были проведены 2D NOESY и 1D selective NOESY ЯМР эксперименты, которые подтвердили этот вывод.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

На основе анализа данных DOSY и двумерной ^1H - ^1H NOESY спектроскопии ЯМР изучено комплексообразование ряда серосодержащих монотерпеноидов с мицеллой на основе ДФХ.

В ходе научно-исследовательской работы были получены следующие количественные параметры – коэффициенты диффузии: для протонов камфенового сульфида ($(3,628 \pm 0,363) * 10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$), для протонов камфенового сульфоксида ($(4,430 \pm 0,443) * 10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$), для протонов соли борнанового сульфида ($(1,630 \pm 0,163) * 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$) и для протонов изоборнеола ($(3,410 \pm 0,341) * 10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$).

Было установлено, что борнановый сульфид (соединение **III**) может быть наиболее перспективным для дальнейших исследований на биологическую активность, так как он встраивается внутрь мицеллы на основе додецилфосфохолина, то есть образует устойчивый комплекс с модельной мембраной.

Публикации по теме

1. Nikitina, L.E. Structural details on the interaction of biologically active sulfur-containing monoterpenoids with lipid membranes. [Text] / L.E. Nikitina, R.S. Pavelyev, V.A. Startseva, S.V. Kiselev, L.F. Galiullina, O.V. Aganova, A.F. Timerova, S.V. Boichuk, Z.R. Azizova, V.V. Klochkov, D. Huster, I.A. Khodov, H.A. Scheidt // Journal of Molecular Liquids, 2020. – V. 301. – P. 13.

2. Тимерова, А.Ф. Исследование серосодержащих борнанных терпеноидов в растворе методами ЯМР спектроскопии. [Текст] / А.Ф. Тимерова // Сборник научных статей Казанского федерального университета 2018 года, Изд-во Казан. ун-та, 2018. – С. 127–130.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Finegold, J.A. Mortality from ischaemic heart disease by country, region, and age: Statistics from World Health Organization and United Nations. [Text] / J.A. Finegold, P. Asaria, D.P. Francis // International Journal of Cardiology, 2013. – №168. – P. 934-945.
2. Порядина, Г.В. Патофизиология системы гемостаза. Методические разработки для самостоятельной работы студентов лечебного и педиатрического факультетов. [Текст] / Г.В. Порядина // Под редакцией проф. – М: РГМУ, 2013. – 39 с.
3. Бережнова, Н.И. Патология сердечно-сосудистой системы. Учебно-методическая разработка для самостоятельной работы студентов 3-4 курсов лечебного, педиатрического и стоматологического факультетов. [Текст] / Н.И. Бережнова // М: РГМУ, 2014. – 25 с.
4. Santos, R.V. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. [Text] / M.R.V. Santos, F.V. Moreira, B.P. Fraga et al. // Revista Brasileira de Farmacognosia, 2011. – V. 21. – №1. – P. 764–771.
5. Григорьева, Н.Я. Физиологическая активность полиизопреноидов. [Текст] / Н.Я. Григорьева, А.М. Моисеенков // Химико-фармацевтический журнал, 1989. – Т. 23. – №21. – С. 144-155.
6. Серебряков, Э.П. Биологически активные производные полипренилуксусных кислот и родственные им соединения. [Текст] / Э.П. Серебряков, А.Г. Нигматов // Химико-фармацевтический журнал, 1990. – №2. – С. 104-112.
7. Sofronov, A.V. Monoterpenoids Dithiophosphates. Synthesis and Biological Activity. [Text] / A.V. Sofronov, I.S. Nizamov, L.A. Almetkina, L.E. Nikitina, D.G. Fatyhova, P.V. Zelenikhin, O.N. Il'inskaya, R.A. Cherkasov // Zhurnal Obshchei Khimii, 2010. – V. 8. – №7. – P. 1101–1105.
8. Галиуллина, Л.Ф. Исследование структуры компонентов атеросклеротической бляшки методами магнитного резонанса. [Текст] / Л.Ф.

Галиуллина // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук, 2013. – 23 с.

9. Kiselev, S.V. Hemocoagulation Activity of Sulfur-Containing Pinane-Type Terpenoids. [Text] / S.V. Kiselev, L.E. Nikitina, V.A. Startseva, N.P. Artemova, A.V. Bodrov, S.V. Boichuk, M.M. Vorontsova, A.A. Rakhmatullina, R.G. Turaev, V.V. Klochkov // *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2017. – V. 51. – P. 343–347.

10. Гюнтер, Х. Введение в курс спектроскопии ЯМР. [Текст] / Х. Гюнтер // М.: Мир, 1984. – 478 с.

11. Macomber, R.S. A complete introduction to modern NMR spectroscopy. [Text] / R.S. Macomber // A Wiley-Interscience publication, 1998. – 357 P.

12. Ландсберг, Г.С. Оптика. [Текст] / Г.С. Ландсберг // М., 2010. – 848 с.

13. Кессених, А.А. Открытие, исследования и применения магнитного резонанса. [Текст] / А.А. Кессених // *Успехи физических наук*, 2009. – Т. 179. – №7. – С. 737–764.

14. Дероум, Э. Современные методы ЯМР для химических исследований. [Текст] / Э. Дероум // М.: Мир, 1992. – 403 с.

15. Альтшуллер, С.А. Электронный парамагнитный резонанс соединений элементов промежуточных групп. [Текст] / С.А. Альтшуллер, Б.М. Козырев // М.: Наука, 1972. – 672 с.

16. Нифантьев, И.Э. Практический курс спектроскопии ядерного магнитного резонанса. [Текст] / И.Э. Нифантьев, П.В. Ивченко – М.: Издательство МГУ, 2006. – 200 с.

17. Мануйлов, А.В. Основы химии. Интернет-учебник: [Электронный ресурс]. / А.В. Мануйлов, В.И. Родионов. URL: <http://www.hemi.nsu.ru>. (Дата обращения: 20.12.2018).

18. Устынюк, Ю.А. Лекции по спектроскопии ядерного магнитного резонанса: [Электронный ресурс]. 1997 – 2020. URL: <http://www.chem.msu.ru>. (Дата обращения: 25.09.2019).

19. Воловенко, Ю.М. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса для химиков. [Текст] / Ю.М. Воловенко, В.Г. Карцев, И.В. Комаров, А.В. Туров, В.П. Хиля // М.: Издано Международным благотворительным фондом «Научное партнерство», МБФНПб, 2011. – 704 с.
20. Hertkorn, N. Two dimensional NMR spectroscopy of humic substances. [Text] / N. Hertkorn, Ph. Schmitt-Kopplin, I.V. Perminova, D. Kovalevski, A. Kettrup // IHSS, 2001. – P. 149–158.
21. Jaun, B. Structure Determination by NMR. [Text] / B. Jaun // Analytische Chemie IV, 2013. –103 p.
22. Kerssebaum, R. NMR Application Lab. DOSY and Diffusion by NMR. [Text] / R. Kerssebaum // Bruker BioSpin GmbH, 2002. – P. 4-5, 22-23.
23. Еврейский университет в Иерусалиме: [Электронный ресурс]. URL: <http://chem.ch.huji.ac.il>. (Дата обращения: 30.11.2019).
24. Agarwal, N. Characterization of Nanomaterials Using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. [Text] / N. Agarwal, M.S.Nair, A. Mazumder, K.M. Poluri / Advances and Key Technologies, Micro and Nano Technologies, 2018. – P. 61-102.
25. Keresztes, I. Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy (DOSY) of THF Solvated n-Butyllithium Aggregates. [Text] / I. Keresztes, P.G. Williard // Journal of the American Chemical Society, 2000. – №122. – P. 10228-10229.
26. Binotti, B. Application of NOE and PGSE NMR Methodologies to Investigate Non-Covalent Intimate Inorganic Adducts in Solution. [Text] / Binotti B., Macchioni A., Zuccaccia C., Zuccaccia D. // Comments on Inorganic Chemistry, 2002. – №23. – P. 417-450.
27. Pastor, A. NMR spectroscopy in coordination supramolecular chemistry: A unique and powerful methodology. [Text] / A. Pastor, E. Martinez-Viviente // Coordination Chemistry Reviews, 2008. – №252. – P. 2314-2345.
28. Cameron, K.S. NMR diffusion coefficient study of steroid–cyclodextrin inclusion complexes. [Text] / K.S. Cameron, L. Fielding // Magnetic Resonance in Chemistry, 2002. – №40. – P. S106-S109.

29. Brand, T. Intermolecular interaction as investigated by NOE and diffusion studies. [Text] / Brand T., Cabrita E.J., Berger S. // Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 2005. – №46. – P. 159-196.
30. Pregosin, P.S. NMR diffusion methods in inorganic and organometallic chemistry. [Text] / P.S. Pregosin // Spectroscopic Properties of Inorganic and Organometallic Compounds, 2012. – №42. – P. 248-268.
31. Furo, I. NMR spectroscopy of micelles and related systems. [Text] / Furo I. // Journal of Molecular Liquid, 2005. – №117. – P. 117-137.
32. Asaro, F. Resolution of a nonionic surfactant oligomeric mixture by means of DOSY with inverse micelle assistance. [Text] / F. Asaro, N. Savko // Magnetic Resonance in Chemistry, 2011. – №49. – P. 195-198.
33. Weingartner, H. NMR studies of ionic liquids: Structure and dynamics. [Text] / H. Weingartner // Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2013. – №18. – P. 183-189.
34. Hathout, R.M. Applications of NMR in the characterization of pharmaceutical microemulsions. [Text] / R.M. Hathout, T.J. Woodman // Journal of Controlled Release, 2012. – №161. – P. 62-72.
35. Macchioni, A. Determining accurate molecular sizes in solution through NMR diffusion spectroscopy. [Text] / A. Macchioni, G. Ciancaleoni, C. Zuccaccia, D. Zuccaccia // Chemical Society Reviews, 2008. – №37. – P. 479-489.
36. Johns Hopkins University: [Электронный ресурс]. URL: <http://nmr.chm.jhu.edu>. (Дата обращения: 10.01.2020).
37. Tanner, J.E. Use of the Stimulated Echo in NMR Diffusion Studies. [Text] / J.E Tanner // The Journal of Chemical Physics, 1970. – №52, P. 2523.
38. Tanner, J.E. Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. [Text] / J.E. Tanner, E.O. Stejskal // The Journal of Chemical Physics, 1965. – №42. – P. 288.
39. Reich, H.J. Structure Determination Using Spectroscopic Methods. [Электронный ресурс]. 2020. URL: <https://www.chem.wisc.edu>. (Дата обращения: 20.01.2020).

40. Черныш, Ю.Е. Селективная фурье-спекторскопия ЯМР и ее приложение по исследованию молекулярной динамики. [Текст] / Ю.Е. Черныш, Г.С. Бородкин, Б.С. Лукьянов, М.С. Коробов, Ю.М. Коробов // М.: СКНЦ ВШ, 2002. – 117 с.
41. Мусабиров, Г.С. Установление пространственной структуры статинов в комплексе с мицеллами додецилфосфохолина методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса. [Текст] / Г.С. Мусабиров. // Магистерская диссертация, 2018. – 76 с.
42. Rule, G.S. Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy. [Text] / G.S. Rule, T.K. Hitchens // Dordrecht: Springer Science+Business Media, 2006. – 530 P.
43. Тимерова, А.Ф. Исследование структуры антитромботических препаратов в растворе методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса. [Текст] / А.Ф. Тимерова // Бакалаврская работа, 2018. – 43 с.
44. Nikitina, L. E. Synthesis and antifungal activity of monoterpenoids of the carane series. [Text] / L.E. Nikitina, V.A. Startseva, N.P. Artemova, L.Yu. Dorofeeva, I.V. Kuznetsov, S.A. Lisovskaya, N.P. Glushko, M.P. Kutyreva // Pharmaceutical Chemistry Journal, 2012. – V. 45. – P. 664-667.
45. Kallik, D.A. The use of dodecylphosphocholine micelles in solution NMR. [Текст] / D.A. Kallik, M.R. Tessmer, C.R.Watts, C.-Y. Li // Journal of Magnetic Resonance, 1995. – V. 109. – P. 60-65.
46. Manzo, G. Characterization of sodium dodecylsulfate and dodecylphosphocholine mixed micelles through NMR and dynamic light scattering. [Текст] / G. Manzo, M. Carboni, A.C. Rinaldi, M. Casu, M.A. Scorciapino // Magnetic Resonance in Chemistry, 2013. – V. 51. – P. 176-183.
47. Usachev, K.S. High-resolution NMR structure of the antimicrobial peptide protegrin-2 in the presence of DPC micelles. [Текст] / K.S. Usachev, S.V. Efimov, O.A. Kolosova, A.V. Filippov, V.V. Klochkov // Journal of Biomolecular NMR, 2015. – V. 61. – P. 227-234.

48. Maler, L. Artificial membrane models for the study of macromolecular delivery. [Текст] / L. Maler, A. Graslund // *Methods in Molecular Biology*, 2009. – V. 480. – P. 129-139.
49. Galiullina, L. F. Interaction of Different Statins with Model Membranes by NMR Data. [Text] / L.F. Galiullina; O.V. Aganova; I.A. Latfullin; G.S. Musabirova, A.V. Aganov, V.V. Klochkov // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2017. – V. 1859 (3). – P. 295–300.
50. Usachev, K.S. Oligomerization of the Antimicrobial Peptide Protegrin-5 in a Membrane-Mimicking Environment. Structural Studies by High-Resolution NMR Spectroscopy. [Text] / K.S.Usachev, O.A. Kolosova, E.A. Klochkova, A.R. Yulmetov, A.V. Aganov, V.V. Klochkov // *European Biophysics Journal*, 2017. – V. 46 (3). – P. 293–300.
51. Magnetic Resonance. Product Overview: [Электронный ресурс]. URL: <https://www.bruker.com>. (Дата обращения: 10.10.2018).
52. Wei, Y. NOE experiment in the Bruker. / Yufeng Wei // URL: <https://www.rockefeller.edu>. (Дата обращения: 13.04.2020).
53. Аганова, А.В. Конформации и динамика некоторых биологически активных веществ (пиридины и терпеноиды) в растворе по данным ЯМР спектроскопии. [Текст] / А.В. Аганова // Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук, 2019. – 133 с.
54. Nikitina, L.E. Development of Approaches to the Study of the Interaction of Biologically Active Thioterpenoids with Model Membranes. [Text] / L.E. Nikitina, S.V. Kiselev, O.V. Aganova et al. // *BioNanoScience*, 2017. – V. 7, № 4. – P. 600–607.