

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ».

Физический факультет

Кафедра общей физики

Бабенко Петр Владимирович

КУРСОВАЯ РАБОТА

**Исследование комплексообразования молекул при помощи
спектроскопии ЯМР**

Физический факультет. Электромагнитный практикум.

Группа № 19311, 3 семестр, 2020 год.

Научный руководитель:

мнс ИХКГ СО РАН Бабенко Семён Владимирович (б/с)

Оценка научного руководителя _____ С. Бабенко _____ «_» декабря
2020 г. Преподаватель практикума.

Оценка преподавателя практикума:

Оглавление

Оглавление.....	2
Аннотация.....	3
1. Введение.....	4
2. Теоретическая часть.....	6
3. Экспериментальная часть.....	11
4. Результаты и обсуждение.....	13
5. Заключение.....	20
Список литературы.....	22

Аннотация

Цель работы заключалась в знакомстве с методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и его применении для исследования комплексов по типу «гость-хозяин» и им подобных. Тестовая система для отработки идентификации и определения константы стабильности (образования) комплекса состояла из молекулы «хозяина» - бета-циклодекстрина (CD) и молекулы гостя – 2,2'-дипиридила (DP). Для данной системы в щелочной среде была получена константа стабильности комплекса DP с CD, которая составила 100M^{-1} , при было установлено, что в кислой среде DP в протонированной форме (DPH^+) не образует комплекс с CD, таким образом было продемонстрировано влияние электростатических факторов, а именно влияние наличия заряда у молекулы DP на стабильность комплекса с CD. Также представлены качественные рассуждения о комплексе DP с более сложным комплексантом, бычьим сывороточным альбумином (BSA) в нейтральной среде.

Ключевые слова: ЯМР, комплексы «гость-хозяин»

1. Введение

Организованные супрамолекулярные структуры, способные связывать другие молекулы, широко распространены в биологических системах [1]. Данные молекулы включают в себя рецепторы, находящиеся на поверхности клеточной мембраны, ферменты, белки, ассоциаты наподобие желчных кислот, которые присутствуют в желудке и образуют

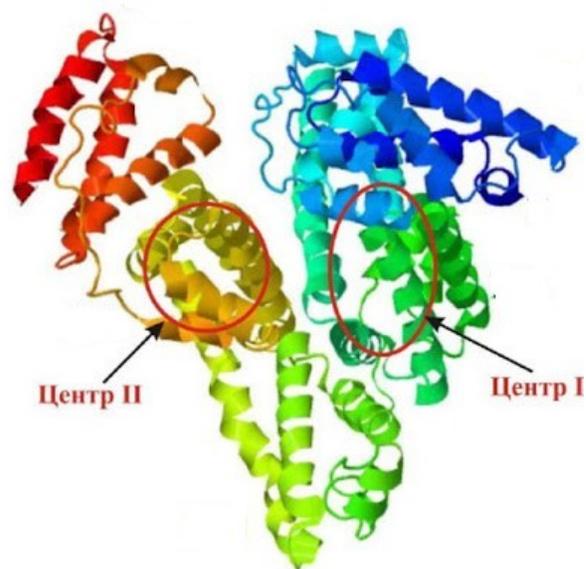


Рисунок 1 - Третичная структура человеческого сывороточного альбумина.

так называемые мицеллы, которые солюбилизируют попавшие вместе с пищей липиды в желудке и кишечнике, тем самым способствуя их всасыванию. Существуют и так называемые транспортные белки, например, сывороточный альбумин (рисунок 1), присутствующий в крови человека и ответственный за доставку молекул, в том числе молекул нерастворимых лекарств к клеткам мишеням. Помимо биологических супрамолекулярных структур, присутствующих в живых организмах и способных связывать молекулы, существуют и специально производимые (синтезируемые) человеком структуры, в числе которых, например, циклодекстрины, представляющие собой супрамолекулярные структуры из глюкопиранозных колец (рисунок 2). Циклодекстрины получают путем ферментативной обработки крахмала, и они широко используются в разных отраслях промышленности. Одно из важнейших применений циклодекстрина - системы доставки лекарств. Циклодекстрины достаточно хорошо

растворимы в воде за счет наличия большого количества гидроксигрупп с внешней стороны, однако внутри они имеют гидрофобную полость, в которой могут располагаться разные молекулы, в том числе молекулы водонерастворимых лекарств. Таким образом, при добавлении в лекарственную форму циклодекстрина

может на порядки увеличиваться растворимость плохо растворимых активных лекарственных субстанций.

Однако для того чтобы прогнозировать терапевтический эффект и поведение подобных систем в живых организмах, необходимо проводить модельные

исследования стабильности подобных комплексов, поскольку данные комплексы образуются лишь за счет слабых, нековалентных взаимодействий

(ван-дер-ваальсовы силы, электростатические взаимодействия, и др.), поэтому диапазон констант

стабильности данных комплексов является достаточно широким (как правило подобные комплексы с циклодекстрином живут от десятков миллисекунд до десятков наносекунд). Одним из удобных методов для обнаружения данных комплексов и определения констант связывания является спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР). ЯМР обладает высоким спектральным разрешением и позволяет регистрировать даже небольшие смещения резонансных линий вследствие образования подобных комплексов.

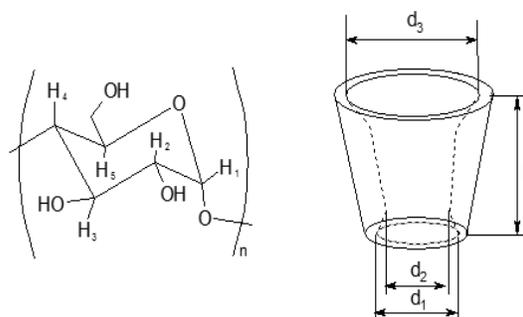
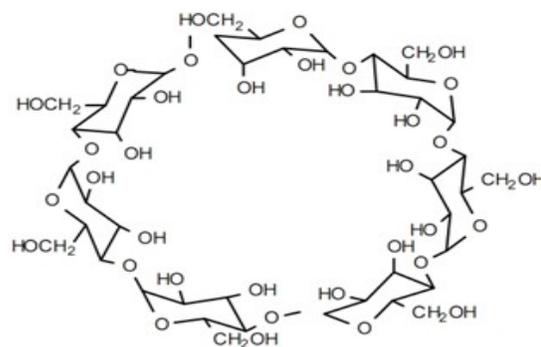


Рисунок 2 – Структура циклодекстринов.

2. Теоретическая часть

Принцип метода ядерного магнитного резонанса (ЯМР)

Ядра, кроме массового числа и заряда, имеют такую характеристику, как магнитный момент μ . Ядра, чьи массовые числа и заряд – чётные, имеют $\mu=0$. Во внешнем магнитном поле намагниченные ядра, со спином, равным $1/2$ прецессируют относительно внешнего магнитного поля – вверх или вниз.

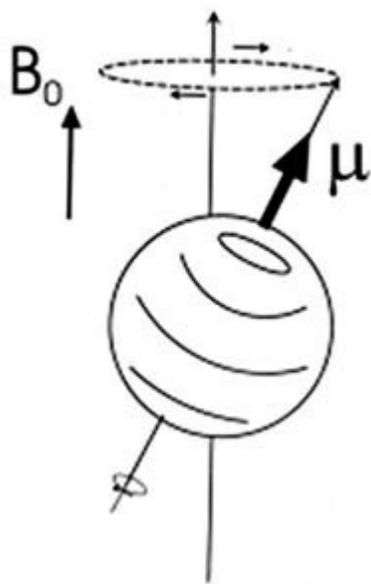


Рисунок 3 - Иллюстрация магнитного момента и спина ядра в магнитном поле.

То есть, возможны только два устойчивых состояния: первое, когда магнитный момент направлен по полю, то есть магнитный диполь имеет

более низкое состояние. Более высокой энергией обладает второе состояние, когда магнитный момент направлен противоположно полю. Таким образом, происходит расщепление уровней энергии (рисунок 4).

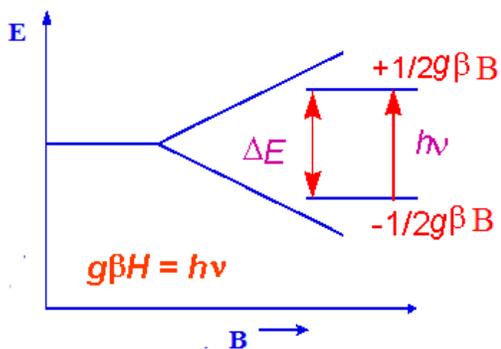


Рисунок 4 - Схема расщепления уровня энергии.

Если подать переменное радиочастотное поле B_1 перпендикулярно внешнему полю с частотой, соответствующей частоте перехода между состояниями $\nu = g\beta B/h$ (рисунок 4), будет происходить резонансное поглощение энергии переменного РЧ-поля, при этом спиновая система будет переходить в состояние так называемого насыщения, при котором населенности нижнего и верхнего уровня энергии будут выравниваться ².

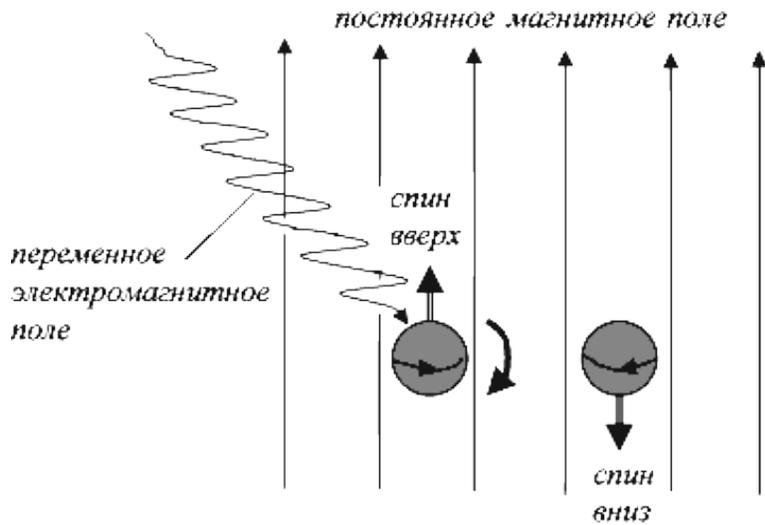


Рисунок 5 - Процесс насыщения.

После выключения переменного магнитного поля система будет релаксировать к основному состоянию, при этом в результате так называемого «спада свободной индукции» в приемной катушке датчика будет наводиться ток, соответствующий временному поведению намагниченности. В результате фурье-преобразования данной временной зависимости получается частотный спектр.

Следует отметить, что ядра в молекуле, в зависимости от места расположения, ближайших функциональных групп в молекуле, и др. имеют свои резонансные частоты в спектре. Данные резонансные частоты определяются константой экранирования, σ , которая связана с присутствием рядом с ядром электронном плотности, которая создает магнитное поле, направленное, как правило, против внешнего магнитного поля, в результате чего резонансная частота будет выглядеть следующим образом: $\nu = g\beta B_z(1 - \sigma)/h$, где g -фактор ядра, β – ядерный магнетон Бора, B_z – внешнее поле, h - постоянная Планка.

Ввиду того, что σ – величины крайне малые, порядка 10^{-6} , для удобства вводится понятие химического сдвига $\delta=10^6(\sigma_{\text{ТМС}}-\sigma)$, где $\sigma_{\text{ТМС}}$ – константа экранирования тетраметилсилана, принятого за стандарт. Хим. сдвиг тетраметилсилана принят равным 0.

Идентификация и определение констант стабильности (образования) комплексов типа «гость-хозяин»

При смене среды, например, при переходе из полярного растворителя в неполярный, будет меняться хим. сдвиг линий протонов исследуемой молекулы. Поскольку зачастую полости молекул «хозяев» и «сайты» белков являются неполярными, то сдвиг, аналогичный переходу между разными растворителями, наблюдается и при комплексообразовании, при этом для комплексов типа «гость-хозяин» характерен так называемый быстрый спектральный обмен, в результате которого мы наблюдаем усредненную линию с частотой $\nu=\chi_A*\nu_A+\chi_B*\nu_B$, где χ_A и χ_B – мольные доли (вероятности) нахождения в соответствующих состояниях А и В. Условие быстрого обмена: $k_a, k_b \gg |\nu_A-\nu_B|$.

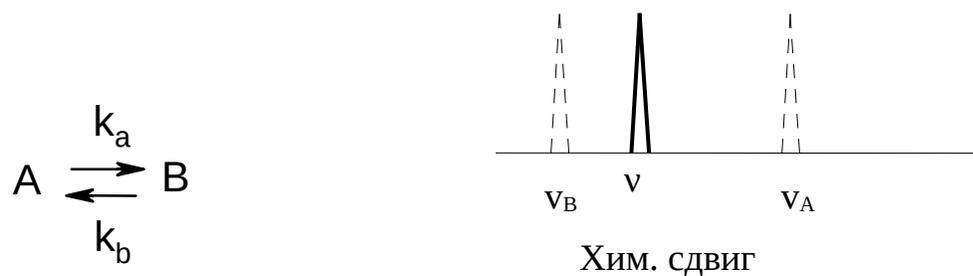
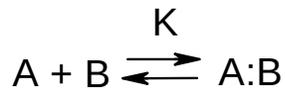


Рисунок 6 - Обмен между состояниями А и В. k_a – константа скорости перехода из А в В, k_b – константа скорости перехода из В в А.

Рассмотрим реакцию комплексообразования молекулы А с комплексантом В:



Равновесная реакция характеризуется константой $K = [x]/[A_0-x][B_0-x]$, где скобками обозначаются соответствующие концентрации, x – текущая концентрация комплекса, A_0 и B_0 – начальные концентрации реагентов. С учетом выражения для средней частоты (хим. сдвига) при быстром обмене, $\nu = \chi_A \nu_A + \chi_{A:B} \nu_B$, где $\chi_A = (A_0-x)/A_0$, а x/A_0 , и выражения для константы выше, варьируя концентрацию «хозяина» (B_0) мы получаем зависимость средней частоты для протонов А от концентрации хозяина, где в качестве параметра будет присутствовать константа стабильности комплекса, K . Таким образом, в результате соответствующего фитирования зависимости можно получить данные о константе K .

Ниже для общего представления приведены модельные зависимости для наблюдаемого хим. сдвига линий молекулы «гостя» ($\delta - \delta_G$) от концентрации «хозяина» ($[H]_0$) при разных константах стабильности комплекса.

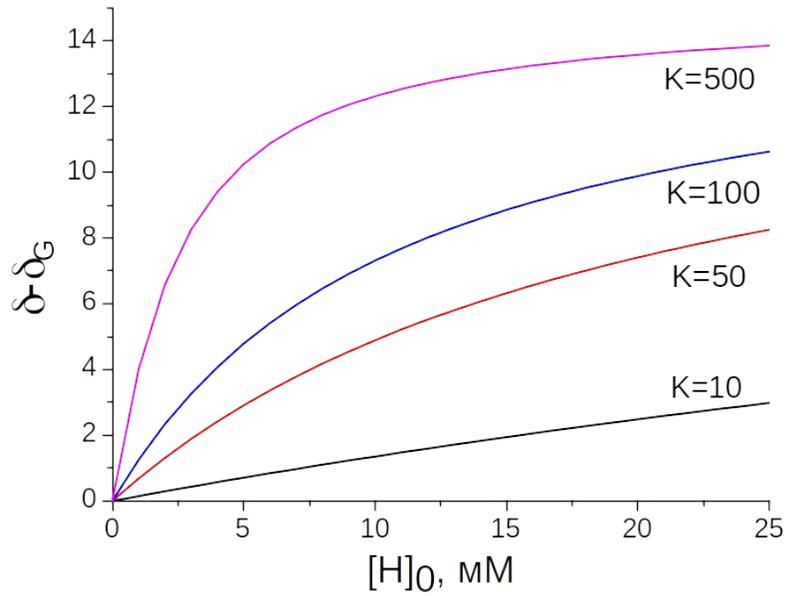


Рисунок 11 - Модельные зависимости наблюдаемого хим. сдвига от концентрации «хозяина» при разных константах образования комплекса (K_a), $[G]_0=1$ мМ, параметр максимального сдвига (100% молекул в комплексе), $\Delta\delta = 15$ (Гц).

3. Экспериментальная часть

В Институте используется ЯМР спектрометр Bruker Avance 500. Ниже на рисунке 7 для общего представления приведена схема электромагнита ЯМР-спектрометра.

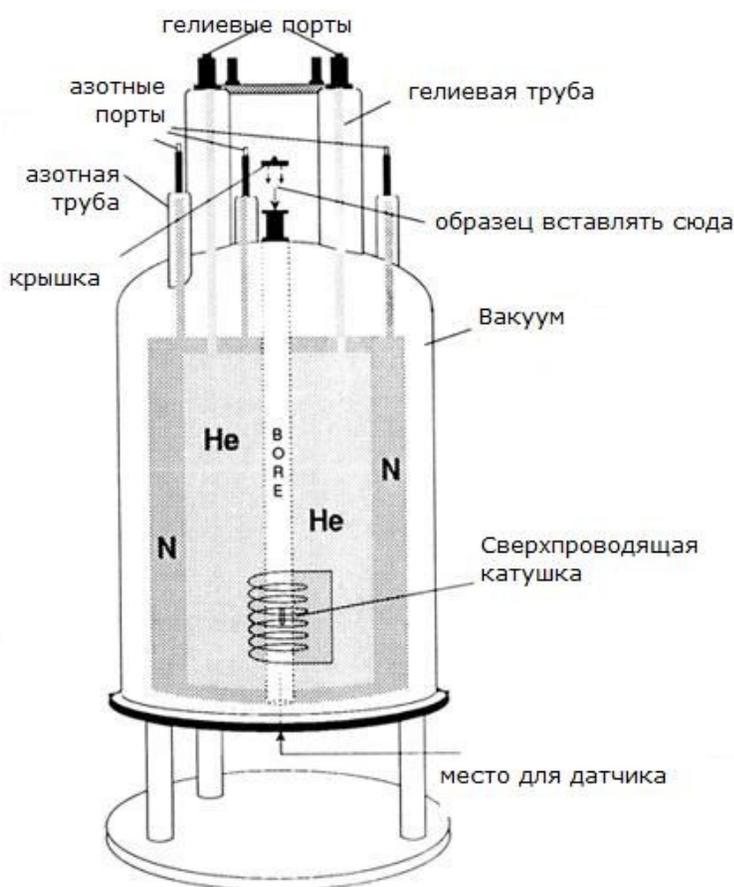


Рисунок 7 – Краткая схема высокопольного электромагнита ЯМР-спектрометра.

Схема эксперимента: образец помещается в трубу, внизу трубы находится датчик. Сверхпроводящая катушка создаёт большое магнитное поле $B(z)$. Азот и Гелий нужны для обеспечения условий сверхпроводимости.

Датчик (рисунок 8) содержит катушки для генерации РЧ-магнитного поля, перпендикулярного внешнему полю $B(z)$. Датчик генерирует последовательность радиочастотных импульсов, выводящих систему из равновесного состояния (насыщение), после чего регистрируется спад свободной индукции. Выполняется обработка спада свободной индукции, и полученный спектр выводится на экран ПК.

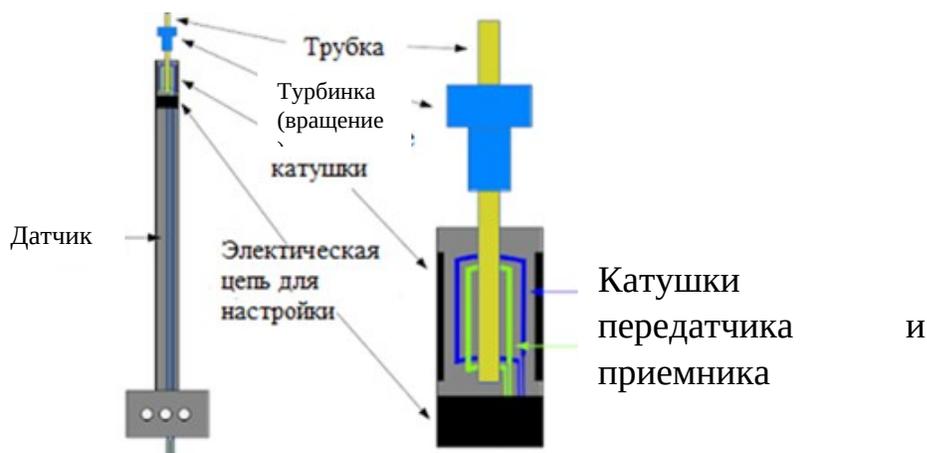


Рисунок – 8 Схема датчика ЯМР-спектрометра.

Используемые химические реактивы и растворители

2,2'-дипиридил (>98%) был дважды перекристализовыван из этанола, β -циклодекстрин (Sigma-Aldrich, >98%) использовали без дополнительной очистки. Термогравиметрические эксперименты показали, что CD в среднем содержал 9,5 молекул воды на одну молекулу CD. Дейтерированную воду (D_2O , 99,9% D, Izotop) для получения спектров ЯМР использовали без дополнительной очистки. Для регулировки pH использовали концентрированную HCl и твердый NaOH, растворенные в D_2O . Бычий сывороточный альбумин (BSA) использовали без дополнительной очистки.

4. Результаты и обсуждение

Первая часть данной работы посвящена комплексам 2,2'-дипиридила (DP) с бета-циклодекстрином (CD) в щелочной (pH=11) и кислой (pH=3) среде. Как уже упоминалось в теоретической части, комплексы типа «гость-хозяин» образуются за счет нековалентных взаимодействий, а потому зависят от многих факторов, включая электростатические взаимодействия. Появление заряда у молекулы также может существенно влиять на стабильность таких комплексов. Например, ранее было показано, что стабильность комплексов виологенов, которые являются производными дипиридила, с β -циклодекстрином увеличивается по мере восстановления виологена. Так, дикатион виологена не образует комплекс с β -циклодекстрином, одноэлектронное восстановление с образованием монокатиона приводит к слабому связыванию с β -CD, и полное восстановление до нейтральной молекулы приводит к сильному связыванию [3]. В данной работе мы рассмотрели схожую систему, а именно комплексы 2,2-дипиридила в протонированной и непротонированной форме, DP и DPH^+ , соответственно, с CD. Ниже представлены спектры 1H ЯМР протонов DP при разной концентрации CD (рисунок 9). Как видно, наблюдается достаточно сильное смещение линий DP (в частности, линий, соответствующих протонам 6,6' и 3,3') при увеличении концентрации CD.

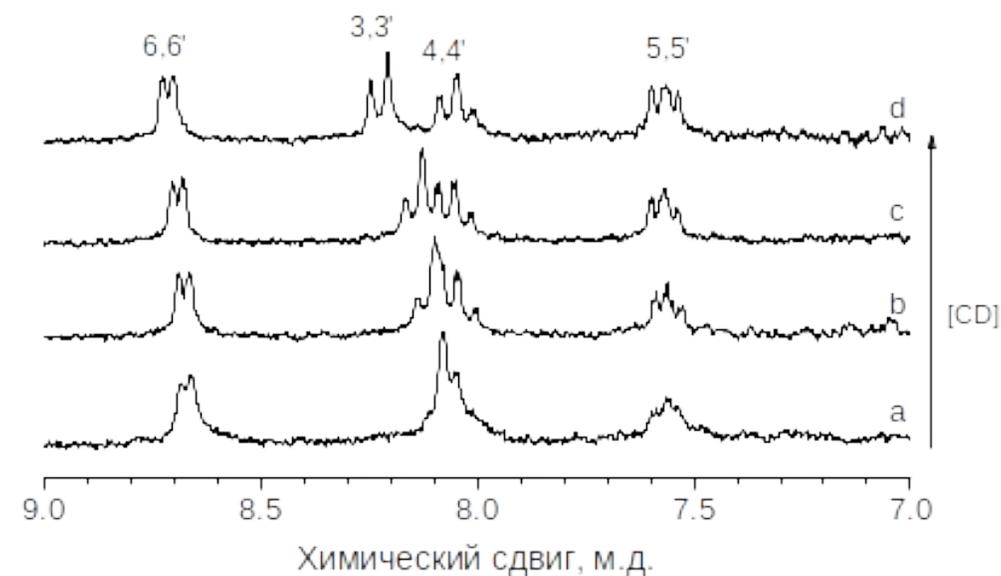


Рисунок 9 - Спектры 200 МГц ^1H ЯМР 2,2'-дипиридила в щелочном (рН=11) растворе в присутствии различных концентраций β -CD: (a) 0 мМ, (b) 1 мМ, (c) 2 мМ и (d) 9 мМ.

Подобное смещение линий в ЯМР-спектре означает изменение ближайшего окружения молекулы и указывает на образования комплекса между DP и CD, т.к. переход молекулы DP в полость CD (ϵ) имитирует смену полярного растворителя на неполярный (подобное смещение также наблюдается в случае смены растворителей с разной диэлектрической проницаемостью).

С учетом того, что стехиометрия комплекса составляет 1:1, как и в случае виологенов, а также в условиях быстрого спектрального обмена можно записать следующую зависимость величины наблюдаемого хим. сдвига от концентрации CD:

$$\Delta\delta_{obs}(DP) = -\frac{\Delta\delta}{2[DP]_0} \left(B - \sqrt{B^2 - 4[DP]_0[CD]_0} \right), \quad (1)$$

где $B = [DP]_0 + [CD]_0 + 1/K_F$, $[DP]_0$ и $[CD]_0$ – начальные концентрации реагентов, K_F – константа образования комплекса, а $\Delta\delta = \delta(DP) - \delta(DP:CD) = Const$ – разница хим. сдвигов свободного и полностью закомплексованного «гостя». Соответственно методом нелинейного фитирования (аппроксимации) мы можем определить K_F и $\Delta\delta$. Ниже на рисунке 10 представлен результат фитирования зависимости наблюдаемого хим. сдвига 6,6'-протонов DP от концентрации CD.

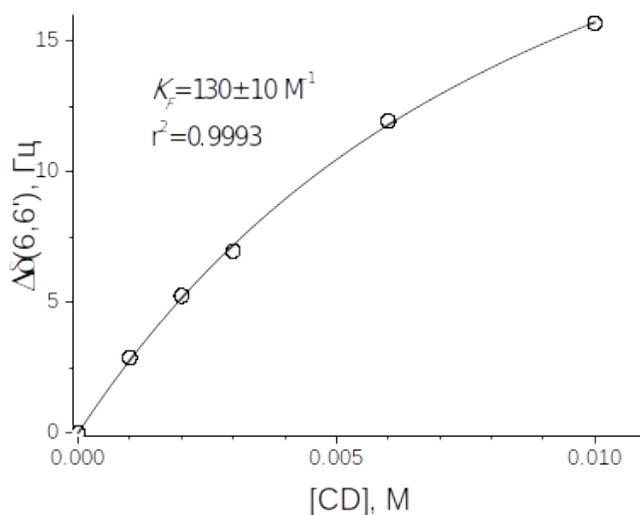


Рисунок 10 - Зависимость изменения химического сдвига (○) 6-Н протонов DP (2 мМ) от концентрации β -CD в щелочном водном растворе (рН=11). Сплошной линией показан наилучший вариант фитирования в соответствии с выражением (1).

Ниже (рисунок 11) представлены спектры ^1H ЯМР протонов DP при разной концентрации CD в кислой среде ($\text{pH}=3$). Как видно, в кислой среде картина отличается от той, наблюдаемой в щелочной среде.

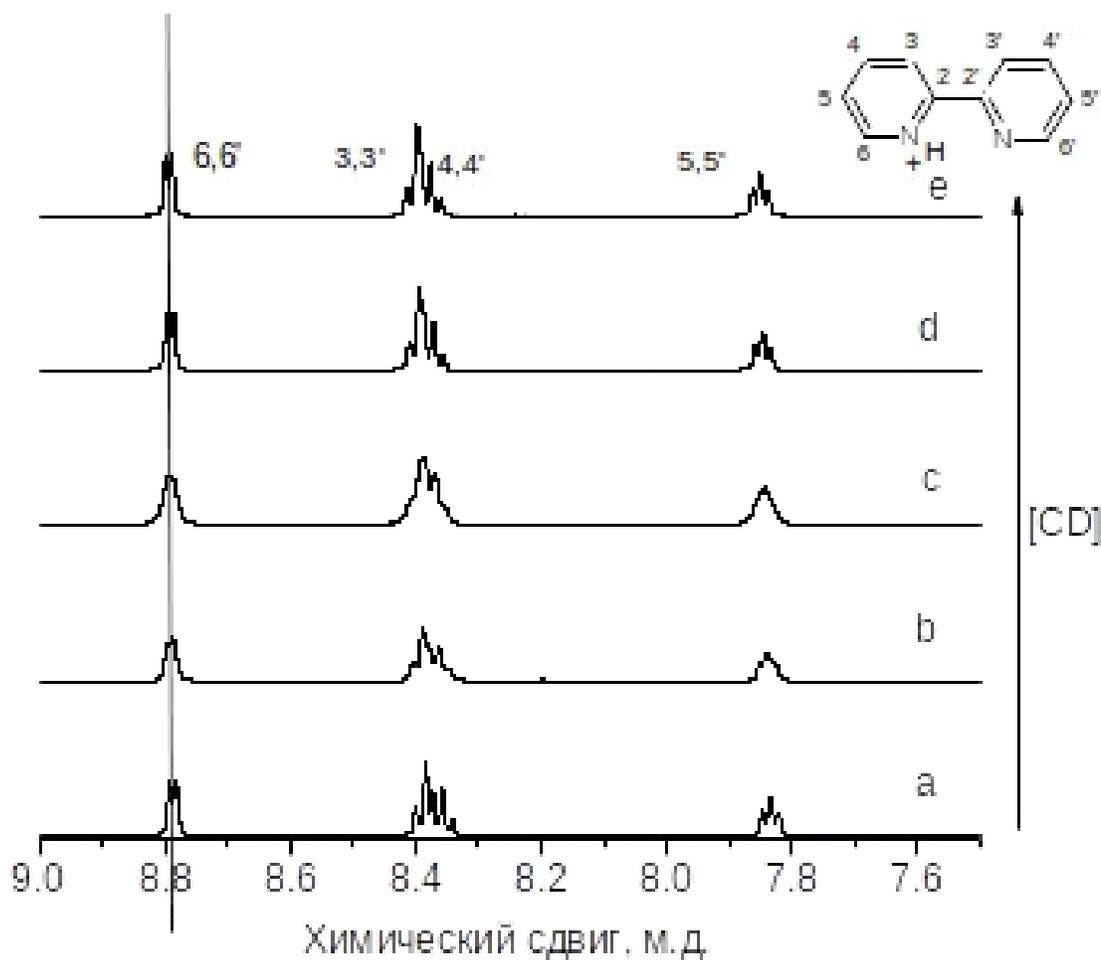


Рисунок 11 - Спектры 500 Мгц ^1H ЯМР 2мМ 2,2`-дипиридила в кислом ($\text{pH}=3$) растворе в присутствии β -CD: (a) 0 мМ, (b) 2 мМ, (c) 6мМ, (d) 10 мМ и (e) 12 мМ. Растворитель D_2O .

При сравнении зависимостей на рисунке 9 и рисунке 11 видно, что в кислой среде (рисунок 11) сдвиг линий протонов DPH^+ крайне слабый, что скорее всего указывает на отсутствие, либо очень слабый комплекс DPH^+ и

CD, по сравнению с DP и CD, что, в принципе, не противоречит данным, полученным для виологенов [1]. Однако стоит отметить, что нередко существуют ситуации, когда ЯМР-титрование по хим. сдвигу не дает адекватных результатов, и полученные результаты необходимо проверять путем титрования по другим ЯМР-параметрам, например, временам T_2 -релаксации (ширинам линии) или с помощью других методов, таких как спектрофотометрия в видимой и УФ-области.

Во второй части работы мы предприняли попытку охарактеризовать комплексы молекулы DP с бычьим сывороточным альбумином (BSA). Комплексы с BSA (как и комплексы с другими рецепторами, ферментами, белками) можно рассматривать как комплексы типа «гость-хозяин», поскольку BSA по аналогии с циклодекстрином имеет неполярные «сайты» (области), которые термодинамически более выгодны для неполярных молекул, по сравнению с полярным растворителем - водой. Следует отметить, что исследовать комплексы с BSA с помощью ЯМР-спектроскопии намного сложнее из-за сильного уширения сигналов, вызванного короткими временами T_2 -релаксации. Ранее с помощью ЯМР-спектроскопии были исследованы разные комплексы BSA с такими молекулами, как L-триптофан, напроксен (нестероидный противовоспалительный препарат), ацетилсалициловая кислота (аспирин), и др. [4]. При этом было отмечено, что стехиометрия комплексов с BSA с данными агентами варьируется от 1:1 и 1:2 (основные два «сайта» BSA) до комплексов (например, ацетилсалициловая кислота), когда молекула связывается с периферическими «сайтами», при этом, например, в случае ацетилсалициловой кислоты количество периферических сайтов достигает 76 при моделировании. В подобных случаях получить количественные данные о стабильности комплексов крайне сложно, поскольку необходимо

рассматривать множественные равновесия и использовать сложные методики для определения констант стабильности. Поэтому в данной работе мы решили ограничиться некоторыми качественными результатами и рассуждениями.

Ниже на рисунке 12 представлены спектры ^1H ЯМР протонов DP при разных концентрациях BSA.

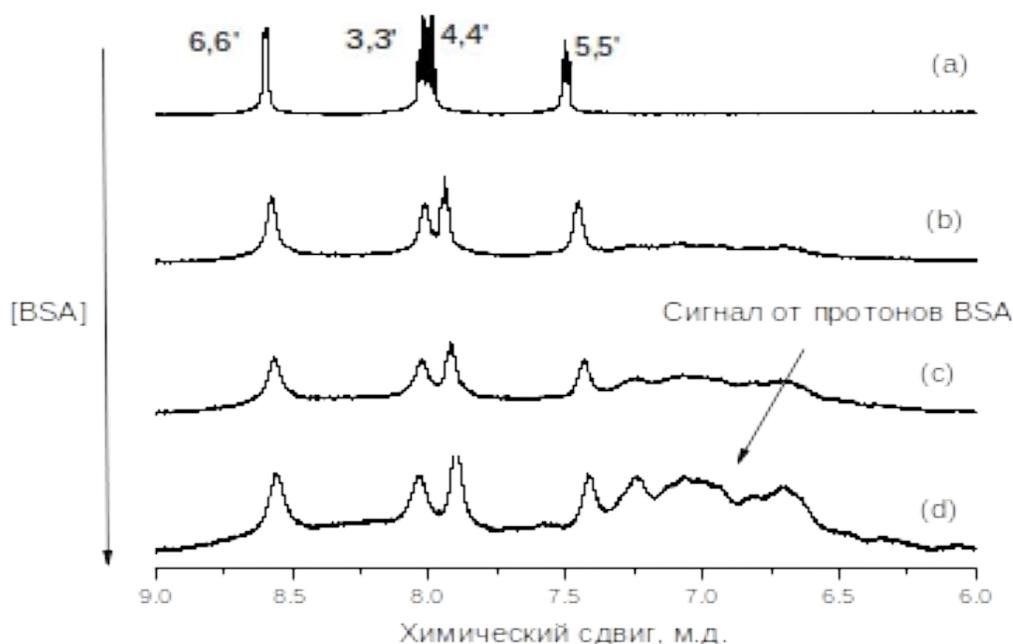


Рисунок 12 - Спектры 500 МГц ^1H ЯМР 2,35 мМ 2,2'-дипиридила при нейтральном рН (рН=7.5) растворе в присутствии BSA: (a) 0 мМ, (b) 0,153 мМ, (c) 0,306 мМ и (d) 0,46 мМ.

Как и в случае с CD на рисунке 9 можно отметить существенное смещение сигналов (изменение хим. сдвига) протонов DP при добавлении BSA, а также уширение линий сигналов. Данное наблюдение скорее всего говорит об образовании комплекса между DP и BSA. Как уже было указано

выше, для получения константы стабильности комплекса можно использовать разные параметры спектра ЯМР. В данном случае мы решили использовать скорость T_2 релаксации. Как и в случае с хим. сдвигом, для $1/T_2$ релаксации в условиях быстрого спектрального обмена можно записать следующее выражение для наблюдаемой скорости, $1/T_2$:

$$1/T_2(\text{набл.}) = \chi * 1/T_2(\text{своб.}) + (1 - \chi) * 1/T_2(\text{связан.}) \quad (2)$$

Где $1/T_2(\text{набл.})$ – наблюдаемая скорость T_2 релаксации, χ – мольная доля молекулы в свободном состоянии, $(1 - \chi)$ – мольная доля молекулы в комплексе, $1/T_2(\text{своб.})$ - скорость T_2 релаксации молекулы в свободном состоянии, а $1/T_2(\text{связан.})$ – скорость T_2 релаксации молекулы в связанном состоянии (в комплексе). В первом приближении $1/T_2$ соответствует ширине линии на полувысоте (ШЛ). Следовательно, для упрощения мы решили измерить ширины линии 6,6'-протонов при разных концентрациях BSA.

Полученная зависимость изменения ширины линии (Δ ШЛ) 6,6'-протонов DP при увеличении концентрации BSA представлена на рисунке 13 ниже.

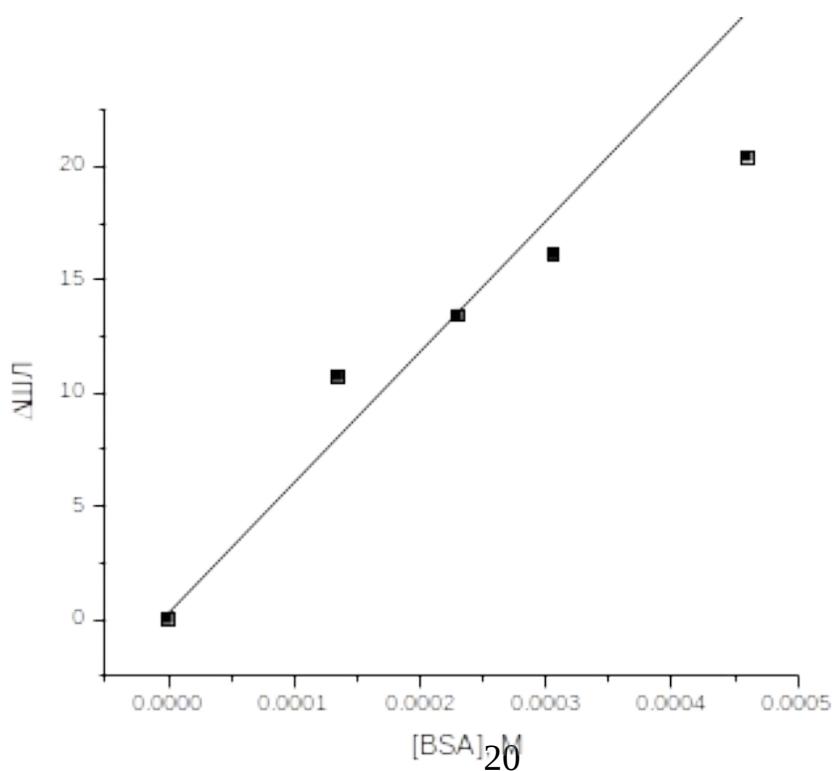


Рисунок 13 – Зависимость изменения ширины линии ($\Delta\text{ШЛ}$) 6,6'-протонов DP (2,35 мМ) при увеличении концентрации BSA.

Несмотря на то, что на первый взгляд зависимость ведет себя ожидаемо, то есть «загибается», что является индикатором достаточно высокой константы стабильности комплекса (как например, показано на кривых моделирования в теоретической части), при используемой концентрации DP, 2,35 мМ, и в диапазоне используемых концентраций BSA (0-0,5) мМ, при разумно предполагаемых константах стабильности зависимость должна вести себя линейно и отклоняться от линейной зависимости только начиная с концентраций 1-1,5 ммоль BSA. Подобное отклонение от линейности скорее всего говорит о том, что комплекс образуется не со стехиометрией 1:1, а предположительно 1:2, т.е. две молекулы DP заходят и «живут» в обоих сайтах белка BSA. Хотя, как и в случае салициловой кислоты, возможны множественные равновесия с периферическими сайтами.

5. Заключение

В данной работе были исследованы комплексы DP в непротонированной и протонированной форме. Показано, что в непротонированной форме DP образует комплекс с CD с константой связывания 100 M^{-1} , тогда как в протонированной форме DPH^+ не образует комплекс с CD. Кроме того, были проанализированы зависимости хим. сдвига протонов DP от концентрации BSA в нейтральной среде. По наличию смещения и сильного уширения линий ^1H ЯМР протонов DP установлено, что DP образует комплекс с BSA.

Исходя из отклонения зависимости $\Delta\delta$ протонов DP от концентрации BSA от линейной заключено, что стехиометрия комплекса DP отличается от 1:1.

Ссылки

1. Fendler, J.H. Photochemistry in organized media / J.H. Fendler // *J. Chem. Educ.* – 1983. – Vol. 60. – №. 10. – P. 872-876.
- 2 . Дзюба, С. А. Основы магнитного резонанса: учебное пособие / С. А. Дзюба // НГУ – 2010. – С. 293.
3. Kaifer, A.E. Interplay between molecular recognition and redox chemistry / A.E. Kaifer // *Acc. Chem. Res.* – 1999. – Vol. 32. – №. 1. – P. 62-71.
4. Fielding, L., Determination of protein-ligand binding affinity by NMR: observations from serum albumin model systems / L. Fielding, S. Rutherford, D. Fletcher // *Magn. Reson. Chem.* – 2005. – Vol. 43. – P. 463-470.