

О.А.Нуркенов¹, Т.М.Сейлханов², С.Д.Фазылов¹, А.Ж.Исаева¹,
С.К.Кабиева³, А.Т.Такибаева³, А.Б.Татеева⁴, А.Е.Аринова¹

¹Институт органического синтеза и углекислоты Республики Казахстан, Караганда;

²Кокшетауский государственный университет им. Ш.Уалиханова;

³Карагандинский государственный технический университет;

⁴Карагандинский государственный университет им. Е.А.Букетова
(E-mail: nurkenov_oral@mail.ru)

Получение и исследование супрамолекулярного комплекса включения лупинина с β -циклодекстрином методом спектроскопии ЯМР

В статье изучены одномерные (^1H и ^{13}C) и двумерные (COSY, HMQC) спектры ЯМР лупинина, β -циклодекстрина и их комплексов включения. Определены изменения значений химических сдвигов ядер ^1H и ^{13}C субстрата и рецептора в свободном состоянии и в составе комплекса. По изменению величин химических сдвигов лупинина и β -циклодекстрина в свободном состоянии и в составе комплексов включения установлено образование внутримолекулярных комплексов. По результатам одно- и двумерных гомо- и гетероядерных корреляций, а также ЯМР-спектроскопических интегральных данных показано, что полученные супрамолекулярные комплексы включения лупинина с β -циклодекстрином имеют состав 1:1 с полным вхождением молекулы лупинина во внутреннюю сферу рецептора.

Ключевые слова: алкалоид лупинин, β -циклодекстрин, спектроскопия ЯМР.

В фармацевтической промышленности при производстве лекарственных форм широко используется метод комплексообразования. Стабильность образованных комплексов биологически активного вещества и инертного носителя зависит не только от химических свойств активного компонента, но и, в равной степени, от свойств молекул носителя. Важными при подборе вещества матрицы являются такие критерии, как безвредность и биодоступность.

Всем этим требованиям соответствуют циклодекстрины [1]. Хорошо известной особенностью циклодекстринов является их способность формировать твердые комплексы включения (комплексы «хозяин–гость») с широким кругом соединений за счет молекулярных нековалентных взаимодействий [2]. В этих комплексах молекулы гостя удерживаются внутренней полостью молекул циклодекстрина (хозяина). Включение в циклодекстрин оказывает влияние на физико-химические свойства молекул гостя, в том числе увеличивает растворимость плохо растворимых соединений. Наиболее интересным является использование в качестве «гостя» природных соединений, в частности алкалоида лупинина, производные которого обладают противовирусной, противоопухолевой, гепатопротекторной, противотуберкулезной и антихолинэстеразной активностью [3].

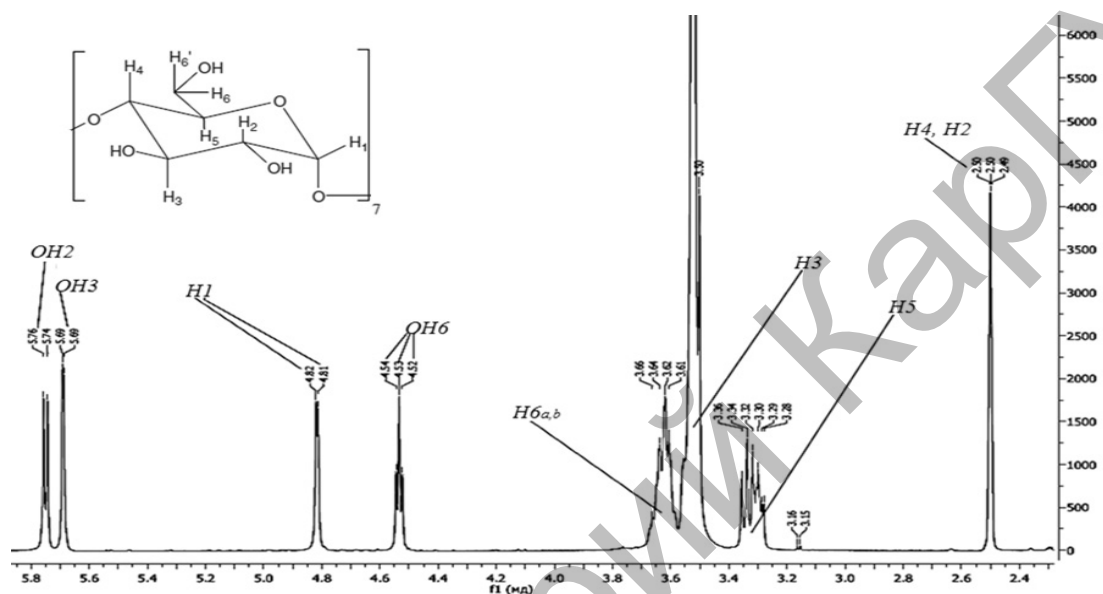
Для получения инкапсулированной формы лупинина использован метод соосаждения из водно-этанольного раствора смеси алкалоида лупинина с β -циклодекстрином (β -ЦД). А именно к 0,001 моль спиртового раствора лупинина добавляли 0,001 моль водного раствора β -ЦД и нагревали до 50 °С при постоянном перемешивании в течение 5 ч. Выпавший осадок отфильтровали, промывали ацетоном и сушили в вакуумном сушильном шкафу при 40 °С в течение 5 ч.

Спектры ЯМР лупинина, β -ЦД и их супрамолекулярного комплекса снимали в ДМСО- d_6 на спектрометре JNN-ECA 400 (400 и 100 МГц на ядрах ^1H и ^{13}C) компании «Jeol» производства Японии. Химические сдвиги измерены относительно сигналов остаточных протонов или атомов углерода дейтерированного диметилсульфоксида.

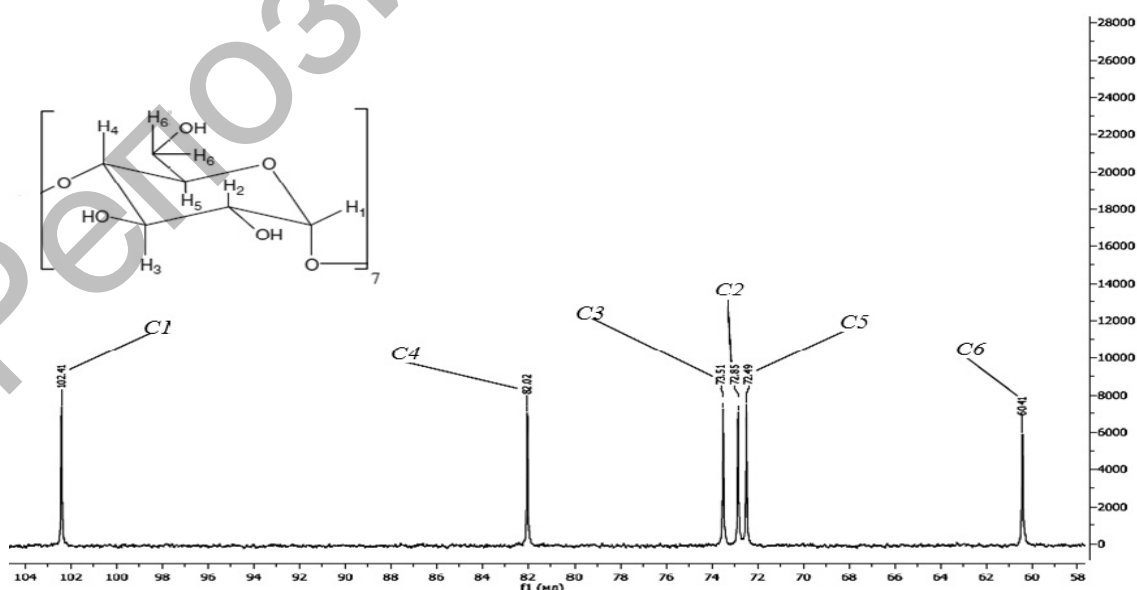
ЯМР-спектроскопический метод изучения комплексообразования основан на установлении разницы в значениях химических сдвигов различных ядер молекул гостя и хозяина в индивидуальной и связанной формах [4, 5]. Инкапсулирование субстрата сопровождается невалентным (гидрофильным) связыванием определенных атомов, что приводит к смещению сигналов ^1H и ^{13}C по шкале δ . Таким образом, для подтверждения существования комплекса и установления его структурных характеристик необходимо произвести сравнительный анализ спектров субстрата и рецептора в свободном состоянии и в составе комплекса.

ЯМР ^1H спектр индивидуального β -ЦД (рис. 1) характеризуется проявлением шести групп сигналов. Наиболее низкопольный дублетный сигнал в диапазоне 5,71–5,73 м.д. с расщеплением 4 Гц

принадлежит протону гидроксильной группы при атоме С-2. Также в области слабого поля резонирует протон ОН-группы соседнего атома (ОН-3), находящийся во внутренней полости молекулы ЦД ($\delta=5,66$ м.д., дублет). Дублетный сигнал в области 4,77–4,78 м.д. соответствует протону Н-1. Расположение указанного протона в более слабом поле по сравнению с протонами других СН-групп обусловлено влиянием со стороны атома кислорода. Гидроксильная группа ОН-6 резонирует, расщепляясь на триплет с центром 4,48 м.д. В области сильного поля (3,49–3,60 м.д.) наблюдается накопление сигналов Н-6 *a, b* метиленовой группы. Высокоинтенсивный сигнал при 3,45 м.д. соответствует протонам Н-3 и Н-5 глюкопиранозного звена. В диапазоне от 3,23 до 3,32 м.д. проявляются метиновые протоны Н-2 и Н-4.

Рисунок 1. ЯМР ^1H спектр β -ЦД

Углеродный спектр β -ЦД (рис. 2) представляет собой пять сигналов ядер ^{13}C элементарного звена. В сильнополевой части проявляется сигнал атома углерода С-6 ($\delta=60,41$ м.д.). Сигналы при 72,49, 72,85 и 73,51 м.д. обусловлены атомами С-5, С-2 и С-3 соответственно. В области более слабого поля (82,02 и 102,41 м.д.) наблюдаются сигналы атомов углерода (С-4 и С-1 соответственно), непосредственно связанных с соседним глюкопиранозным звеном через кислородный мостик.

Рисунок 2. ЯМР ^{13}C спектр β -ЦД

С помощью двумерных спектров β-ЦД в форматах COSY (^1H - ^1H) и HMQC (^1H - ^{13}C) (рис. 3, 4) были установлены гомо- и гетероядерные взаимодействия соответствующих ядер глюкопиранозного звена.

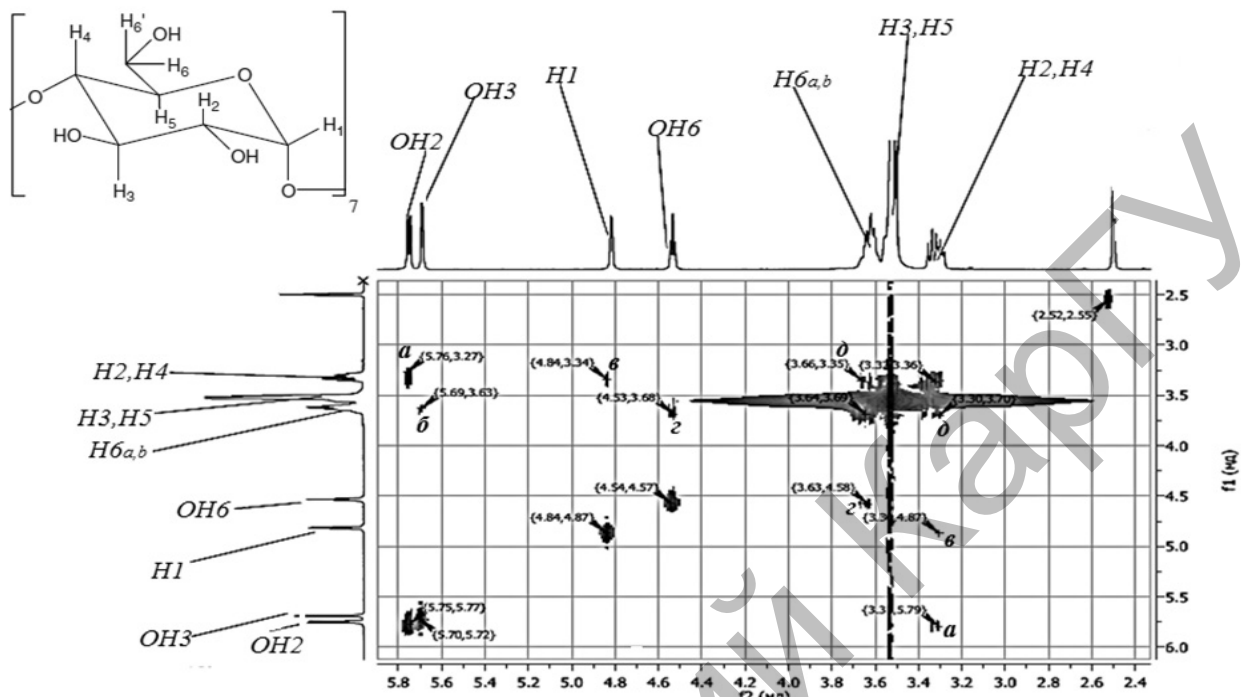


Рисунок 3. COSY (^1H - ^1H) ЯМР спектр β-циклодекстрина

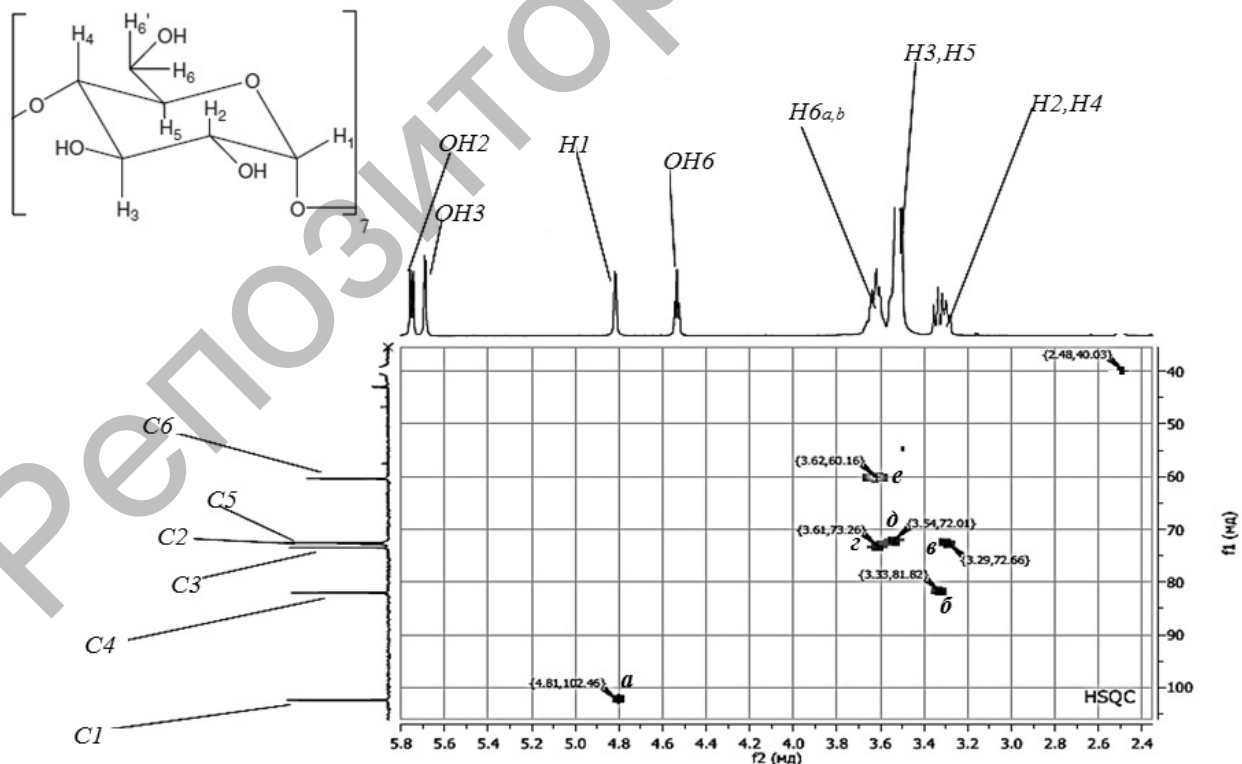


Рисунок 4. HMQC (^1H - ^{13}C) ЯМР спектр β-циклодекстрина

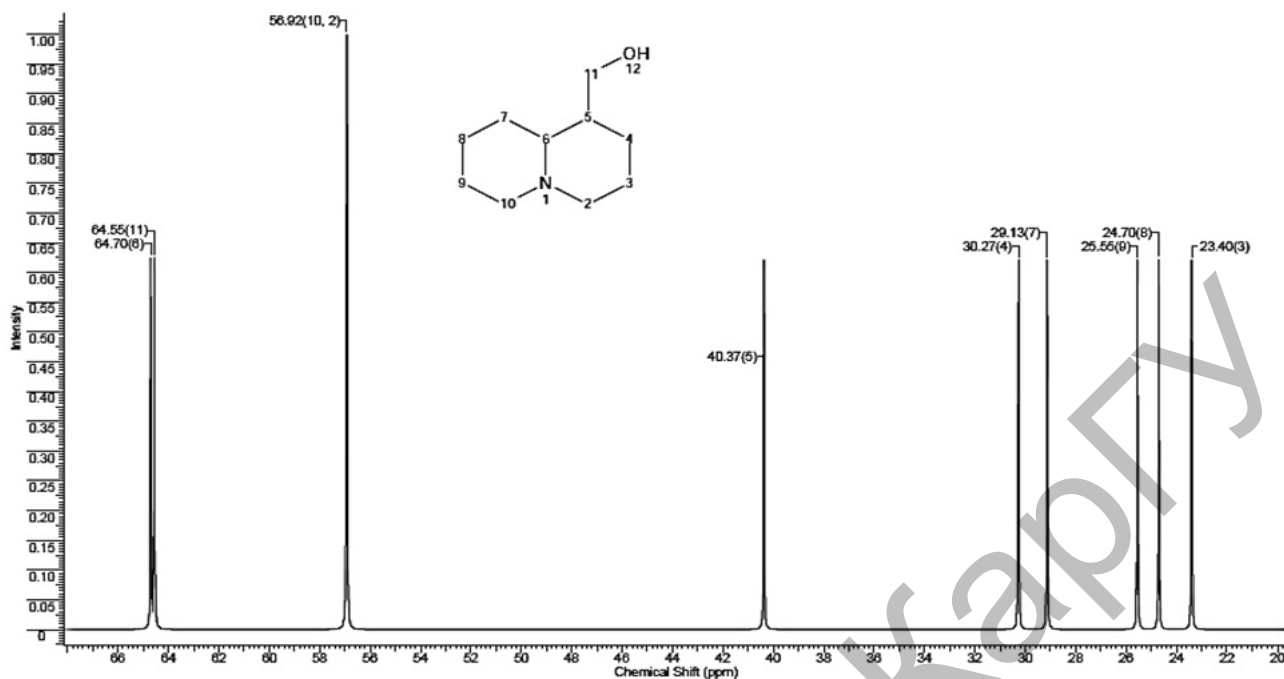


Рисунок 7. Моделированный ЯМР ^{13}C спектр лупинина

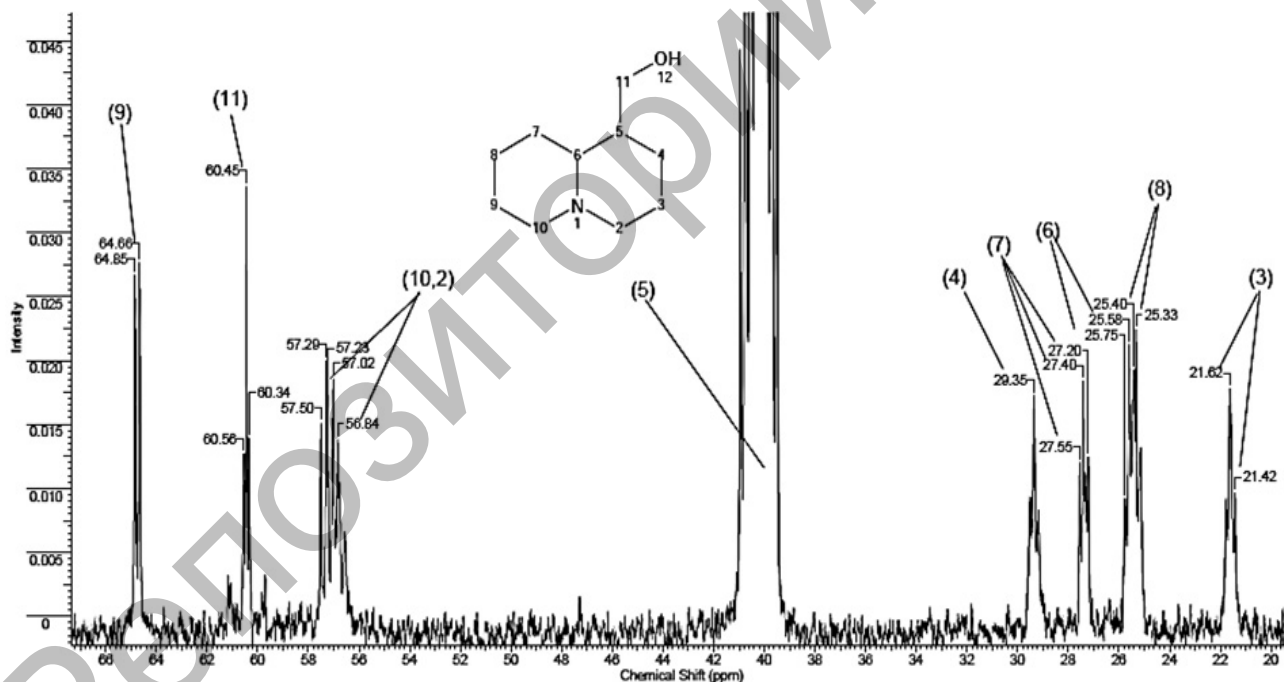


Рисунок 8. ЯМР ^{13}C спектр лупинина

Анализ двумерных спектров COSY (^1H - ^1H) и HMQC (^1H - ^{13}C) (рис. 9, 10) позволил установить гомо- и гетероядерные взаимодействия в молекуле субстрата. Корреляции COSY, осуществляемые через три связи, определены между протонами системы конденсированных ядер молекулы лупинина (рис. 11). Взаимодействия углеродных атомов с протонами через одну связь схематически отображены на рисунке 12.

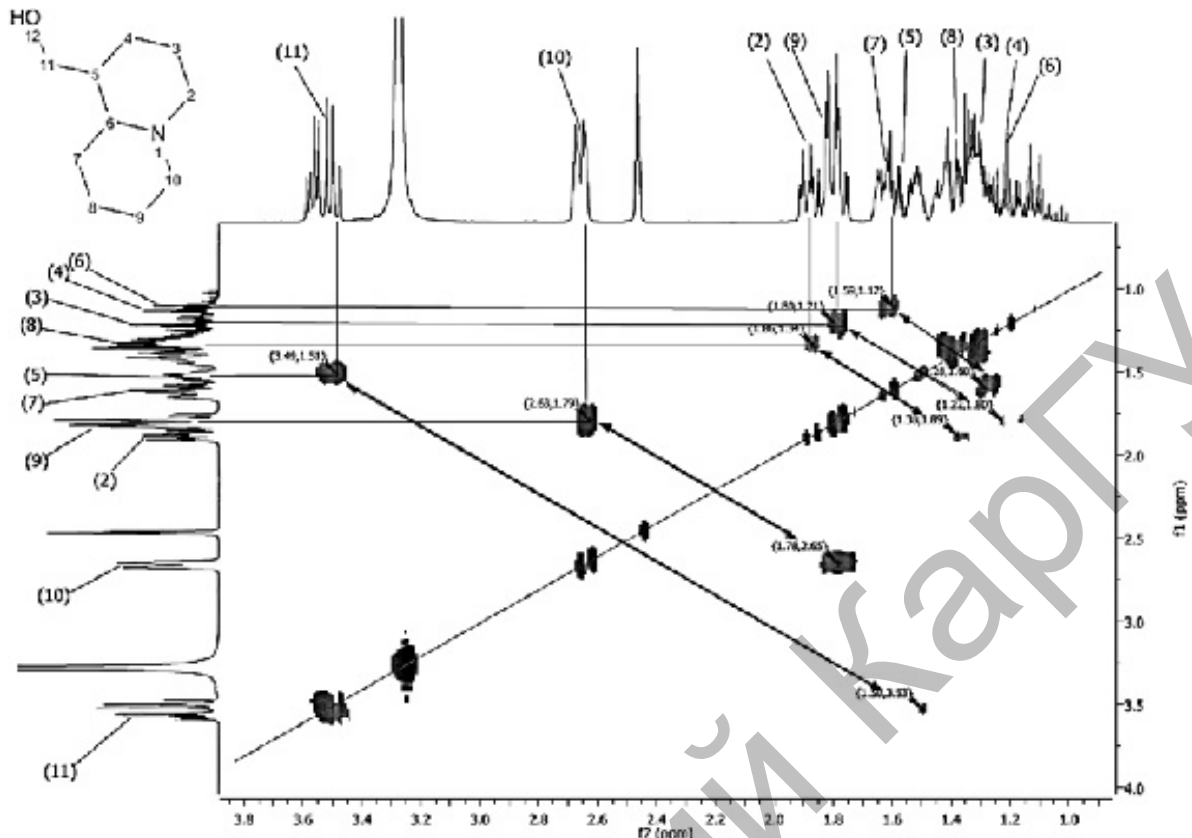


Рисунок 9. COSY (^1H - ^1H) спектр лупинина

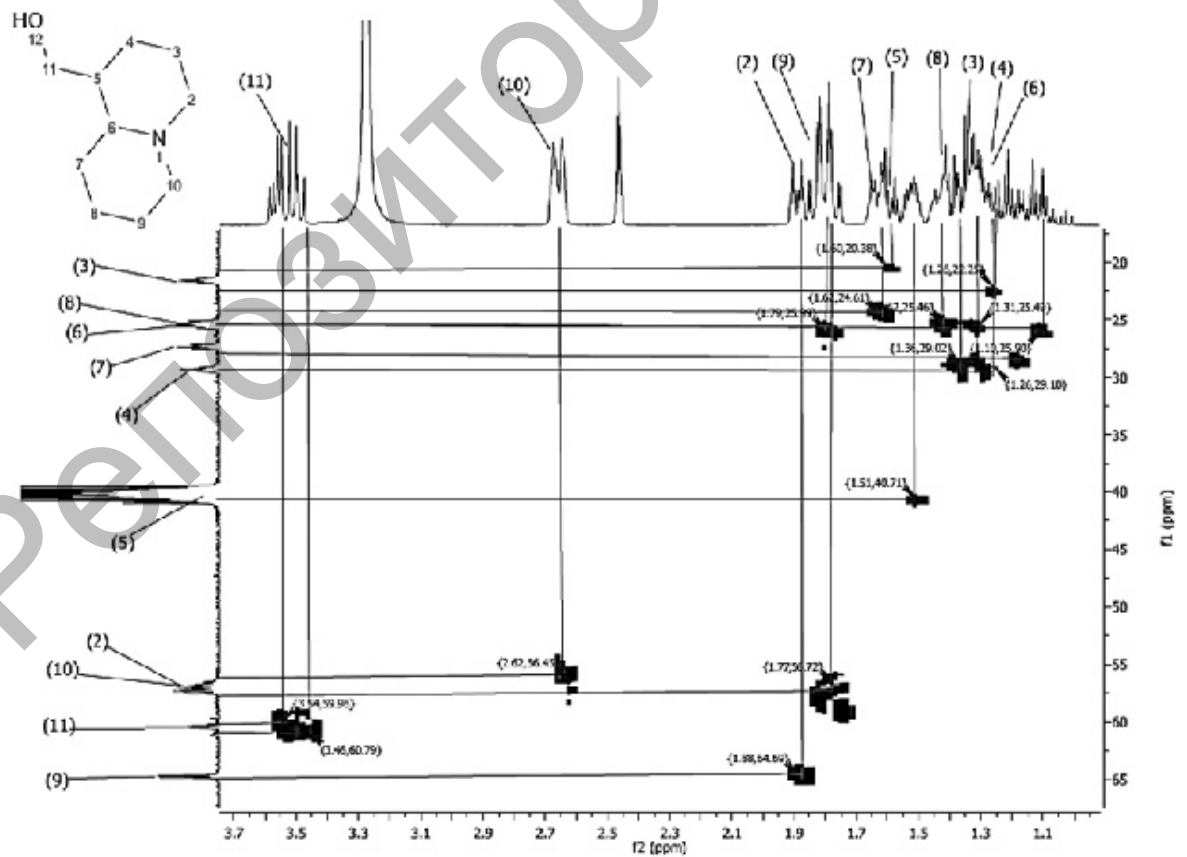


Рисунок 10. НМОС (^1H - ^{13}C) спектр лупинина

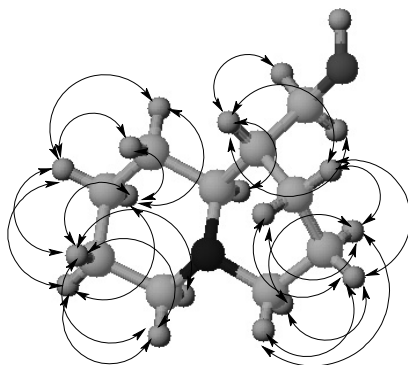


Рисунок 11. Схема корреляций COSY (^1H - ^1H) молекулы лупинина

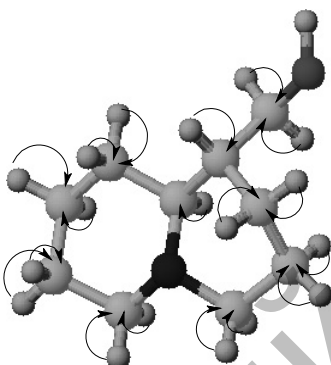


Рисунок 12. Схема корреляций HMQC (^1H - ^{13}C) молекулы лупинина

В процессе инкапсулирования происходит невалентное связывание атомов, что отражается на химических сдвигах сигналов. Эквивалентные сигналы протонов конденсированных ядер лупинина проявляются в спектре комплекса включения с β -ЦД в диапазонах 1,00–1,62 и 1,76–1,92 м.д. (рис. 13). Сигнал метиленового протона при OH-группе в результате комплексообразования смещается в область 3,49–3,50 м.д.

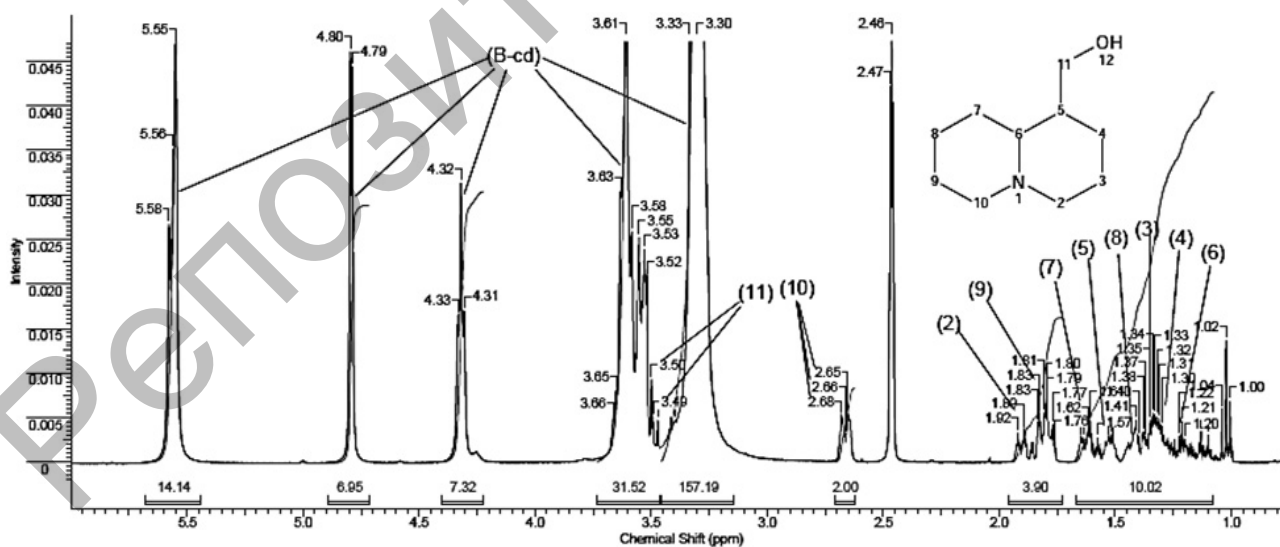


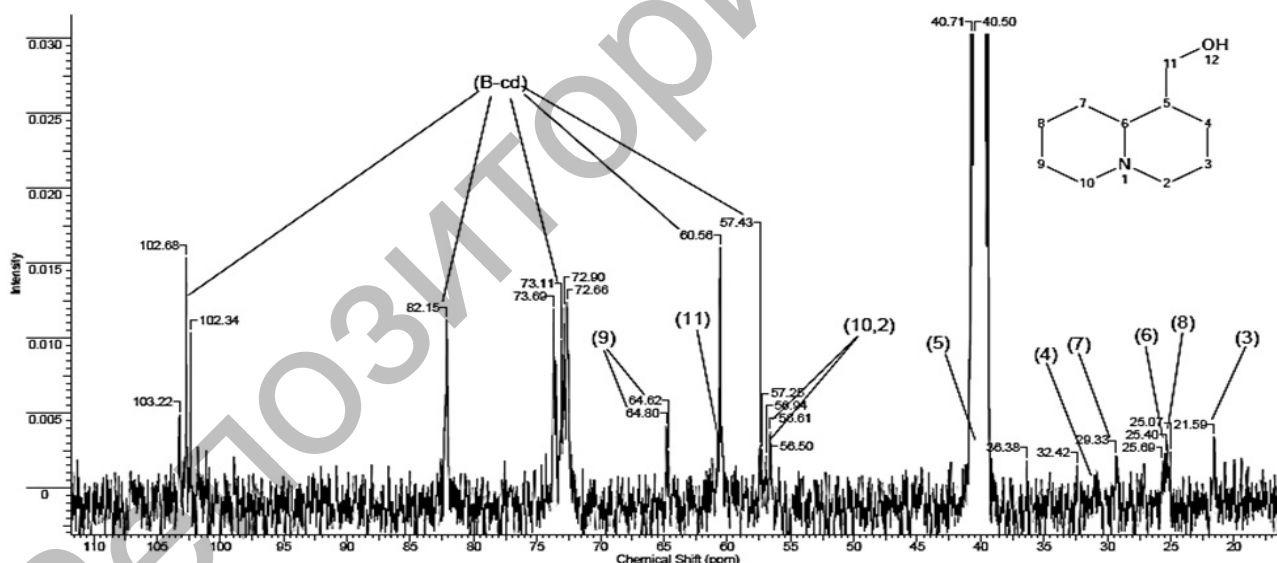
Рисунок 13. ЯМР ^1H спектр комплекса лупинина с β -ЦД

Для протонов β -ЦД образование комплекса включения сопровождается смещением всех ядер ^1H в область слабого поля. Наибольшая разница в значениях химического сдвига ($\Delta\delta=+0,10-0,12$ м.д.) характерна внутрисферным протонам Н-3 и Н-5, на основании чего можно сделать вывод об образовании внутреннего (инклюзионного) комплекса с лупинином (см. табл.).

Химические сдвиги ^1H и ^{13}C лупинина и β -ЦД в свободном состоянии и в составе комплекса

№ атома	Группа	Значение δ_0 в свободном состоянии, м.д.		Значение δ в составе комплекса, м.д.		Изменение химсдвига $\Delta\delta(\delta-\delta_0)$, м.д.	
		$\delta(^1\text{H})$	$\delta(^{13}\text{C})$	$\delta(^1\text{H})$	$\delta(^{13}\text{C})$	$\Delta\delta(^1\text{H})$	$\Delta\delta(^{13}\text{C})$
Лупинин							
2	$-\text{CH}_2-\text{N}$	1,90	57,29	1,92	57,28	0,02	-0,01
3	$-\text{CH}_2-$	1,36	21,62	1,34	21,59	-0,02	-0,03
4	$-\text{CH}_2-$	1,34	29,35	1,32	29,33	-0,02	-0,02
5	$>\text{CH}-$	1,58	41,01	1,57	41,03	-0,01	0,02
6	$>\text{CH}-$	1,17	25,58	1,20	25,69	0,03	0,11
7	$-\text{CH}_2-$	1,65	27,40	1,64	27,42	-0,01	0,02
8	$-\text{CH}_2-$	1,37	25,40	1,38	25,40	0,01	0
9	$-\text{CH}_2-$	1,82	64,66	1,83	64,62	0,01	-0,04
10	$-\text{CH}_2-\text{N}$	2,66	57,29	2,66	57,28	0	-0,01
11	$-\text{CH}_2-\text{OH}$	3,56	60,45	3,55	60,49	-0,01	0,04
β -Циклодекстрин							
1	$>\text{CH}-$	4,77	102,43	4,79	102,68	0,02	0,25
2	$>\text{CH}-$	3,27	72,87	3,30	72,90	0,03	0,03
3	$>\text{CH}-$	3,49	73,54	3,61	73,69	0,12	0,15
4	$>\text{CH}-$	3,30	82,00	3,33	82,15	0,03	0,15
5	$>\text{CH}-$	3,45	72,52	3,55	72,66	0,10	0,14
6	$-\text{CH}_2-$	3,57	60,40	3,61	60,56	0,04	0,16

В случае углеродных спектров субстрата, рецептора и их комплекса наблюдается более значительное смещение сигналов.

Рисунок 14. ЯМР ^{13}C спектр комплекса лупинина с β -ЦД

Углеродным вторичным атомам конденсированной системы молекулы лупинина соответствуют сигналы при 21,59, 25,40, 27,35 и 29,33 м.д. Сигнал С-6 метиновой группы наблюдается при 25,69 м.д. Высоочастотные сигналы атомов С-2, С-10, С-9 и С-11 также претерпели незначительные смещения по шкале химического сдвига и проявляются при 57,28, 64,62 и 60,56 м.д. Для углеродных атомов β -ЦД разница в значениях δ колеблется в пределах 0,03–0,25 м.д. (рис. 14, табл.). Структура супрамолекулярного комплекса подтверждена также данными COSY ($^1\text{H}-^1\text{H}$) (рис. 15).

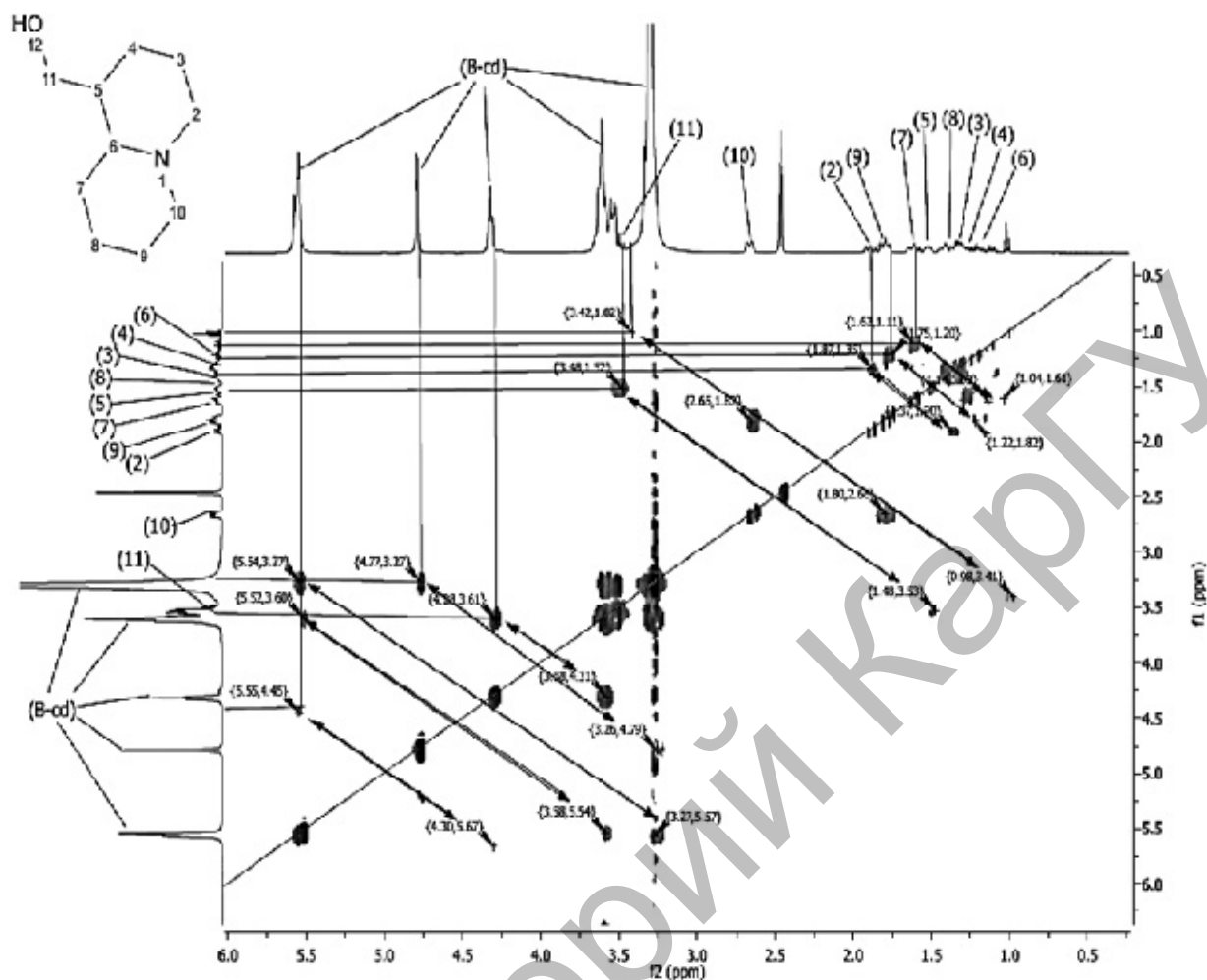


Рисунок 15. COSY ($^1\text{H}-^1\text{H}$) спектр комплекса лупинина с β -ЦД

Таким образом, на основании полученных ЯМР данных, а также с учетом структурных особенностей молекул субстрата и рецептора можно предположить следующую схему включения лупинина в полость β -ЦД (рис. 16).

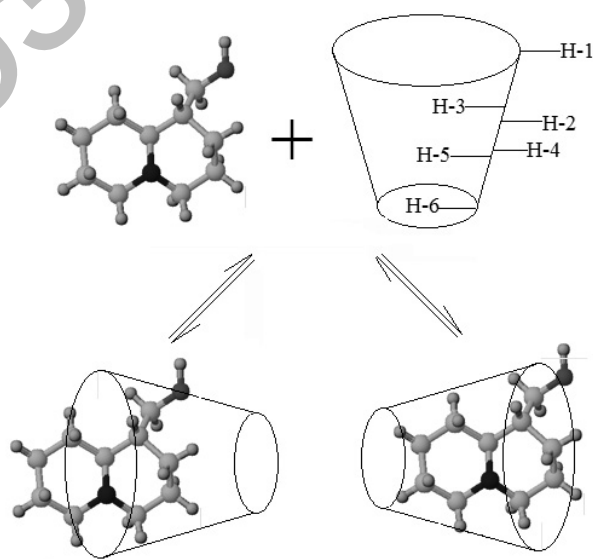


Рисунок 16. Образование комплекса включения лупинина с β -ЦД

Таким образом, по результатам одно- и двумерных гомо- и гетероядерных корреляций, а также ЯМР-спектроскопических исследований показано, что полученные супрамолекулярные комплексы включения лупинина с β -циклодекстрином имеют состав 1:1 с полным входением молекулы лупинина во внутреннюю сферу рецептора.

Список литературы

- 1 Martin Del Valle E.M. Cyclodextrins and their uses: a review // *Process Biochemistry*. — 2004. — Vol. 39. — P. 1033–1046.
- 2 Irie T., Uekama K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation // *J. Pharm. Sci.* — 1997. — Vol. 86. — P. 147–162.
- 3 Галин Ф.З., Карцев В.Г., Флехтер О.Б., Гиниятуллина Г.В., Толстикова Г.А. // *Химия природ. соед.* — 2004. — № 6. — С. 467–470.
- 4 Schneider H.-J., Hacket F., Rudiger V. NMR Studies of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes // *Chem. Rev.* — 1998. — Vol. 98, No. 5. — P. 1755–1785.
- 5 Carofiglio T., Fornasier R., Jicsinszky L., Saielli G., Tonellato U., Vetta, R. Capillary electrophoresis, ROESY NMR and molecular modeling study of the inclusion complex β -cyclodextrin/lipoic acid // *Eur. J. Org. Chem.* — 2002. — No. 7. — P. 1191–1196.

О.А.Нуркенов, Т.М.Сейілханов, С.Д.Фазылов, А.Ж.Исаева,
С.К.Қабиева, А.Т.Тақыбаева, А.Б.Татеева, А.Е.Арынова

ЯМР спектроскопия әдісі арқылы лупининнің β -циклодекстринге енгізілген супрамолекулярлық кешенін алу және зерттеу

Лупининнің, β -циклодекстриннің және олардың енгізілген кешенінің бірөлшемді (^1H и ^{13}C) және екіөлшемді (COSY, HMQC) ЯМР спектрлері зерттелген. Бос күйдегі субстрат пен рецептордың және жиынтық құрамындағы ^1H және ^{13}C ядроларының химиялық жылжу мәндерінің өзгеруі анықталды. Лупинин мен β -циклодекстриннің бос күйіндегі және құрама жиынтықтар құрамының химиялық жылжу шамаларының өзгеруі бойынша ішкі молекулалық жиынтықтардың түзілуі дәлелденді. Бір-және екіөлшемді, гомо- және гетероядролы арақатынастылық нәтижесі арқылы, сонымен қатар ЯМР-спектроскопиялық интегралдардың берілгендері бойынша алынған лупининнің β -циклодекстринге енгізілген супрамолекулярлық жиынтығының құрамы лупинин молекуласы рецептордың ішкі саласына толық 1:1 қатынасында енетіні көрсетілген.

O.A.Nurkenov, T.M.Seilkhanov, S.D.Fazylov, A.Zh.Issayeva,
S.K.Kabieva, A.T.Takibayeva, A.B.Tateyeva, A.E.Arinova

Synthesis and studies of supramolecular inclusion complexes of lupinine with β -cyclodextrin by NMR spectroscopy

In this work dimensional (^1H and ^{13}C) and two-dimensional (COSY, HMQC) NMR spectra of lupinine, β -cyclodextrin and their inclusion complexes were studied. The changes in the values of ^1H and ^{13}C chemical shifts of receptor and substrate in the free state and in the complex were determined. The formation of intermolecular complexes was found to change the values of the chemical shifts of lupinine and β -cyclodextrin in the free state and in the composition of the inclusion complexes. The results of one and two-dimensional homo- and heteronuclear correlations and NMR spectroscopic integrated data showed that the resulting supramolecular inclusion complexes of lupinine with β -cyclodextrin have a composition of 1: 1 with entry methylamine lupinine fragment into the inner sphere of the receptor.

References

- 1 Martin Del Valle E.M. *Process Biochemistry*, 2004, 39, p. 1033–1046.
- 2 Irie T., Uekama K. *J. Pharm. Sci.*, 1997, 86, p. 147–162.
- 3 Galin F.Z., Kartsev V.G., Flekhter O.B., Giniyatullina G.V., Tolstikov G.A. *Chem. of Natur. comp.*, 2004, 6, p. 467–470.
- 4 Schneider H.-J., Hacket F., Rudiger V. *Chem. Rev.*, 1998, 98, 5, p. 1755–1785.
- 5 Carofiglio T., Fornasier R., Jicsinszky L., Saielli G., Tonellato U., Vetta R. *Eur. J. Org. Chem.*, 2002, 7, p. 1191–1196.