

УДК 529.213.29; 541.515. 615.02/14; 615.281; 615.31

**РЕНТГЕНОГРАФІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ
ПРОМІЖНИХ ПРОДУКТІВ
РЕАКЦІЇ ВЗАЄМОДІЇ БУРШТИНОВОГО
АНГІДРИДУ ТА
β-ЦИКЛОДЕКСТРИНУ У ВОДНОМУ
СЕРЕДОВИЩІ**

Мартинів А.В., Баумер В.М.* , Лісняк Ю.В.
ДУ "ІМІ ім. І.І. Мечникова АМН України", м.
Харків,
*ДУ "НТК "Інститут монокристалів" НАН
України", м. Харків

Значною перешкодою при використанні цього ацилюючого агента є його невисока розчиненість у воді, а також – неможливість застосування для багатьох біополімерів значного нагріву в реакції ацилювання. Проте, в присутності β-циклодекстрину реактивність бурштинового ангідриду можна значно

підвищити і проводити реакцію у воді при кімнатній температурі [6].

Бурштиновий ангідрид та інші ангідриди карбонових кислот є одними з найпоширеніших і привабливіших ацилюючих агентів, які використовуються в супрамолекулярній хімії для спрямованої функціоналізації біологічних макромолекул (в тому числі, білків, нуклеїнових кислот і полісахаридів) [1-3]. Зокрема, бурштиновий ангідрид був використаний в наших дослідженнях для одержання функціоналізованих похідних сукцинільованого β-циклодекстрину [4-5]. Рисунок 1 ілюструє реакцію ацилювання нуклеофілів бурштиновим ангідридом. Реакція потребує тривалого нагріву.

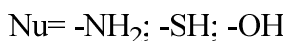
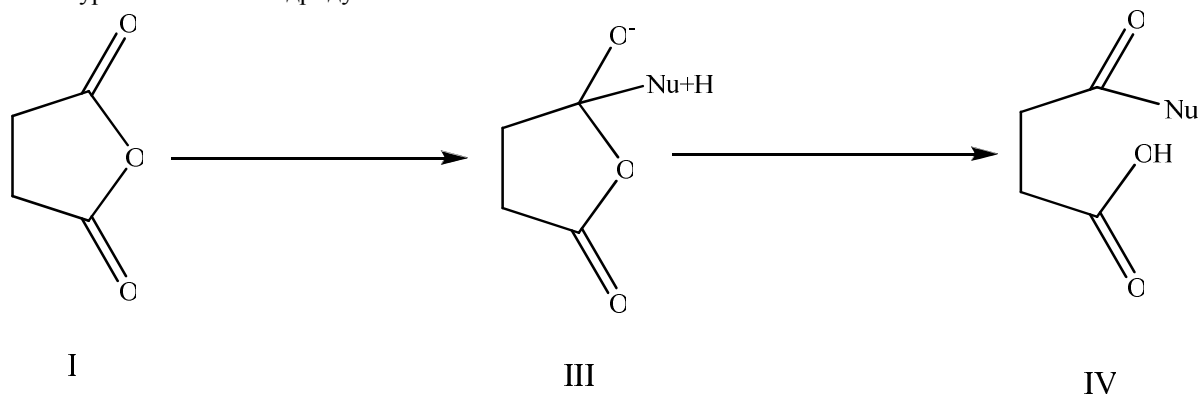


Рисунок 1 - Ацилювання нуклеофілів бурштиновим ангідридом з розкриттям циклу останнього: I – бурштиновий ангідрид; II – нуклеофіл, NuH = -NH₂, -OH, -SH; III – проміжний продукт реакції; IV – бурштинова кислота.

β-Циклодекстрини (β-ЦД) - циклічний полісахарид, побудований із семи глюкопіранозних кілець. Макроцикл β-ЦД має форму усіченого конусу з отвором специфічного об'єму (рис.2). Найбільш важливу структурною

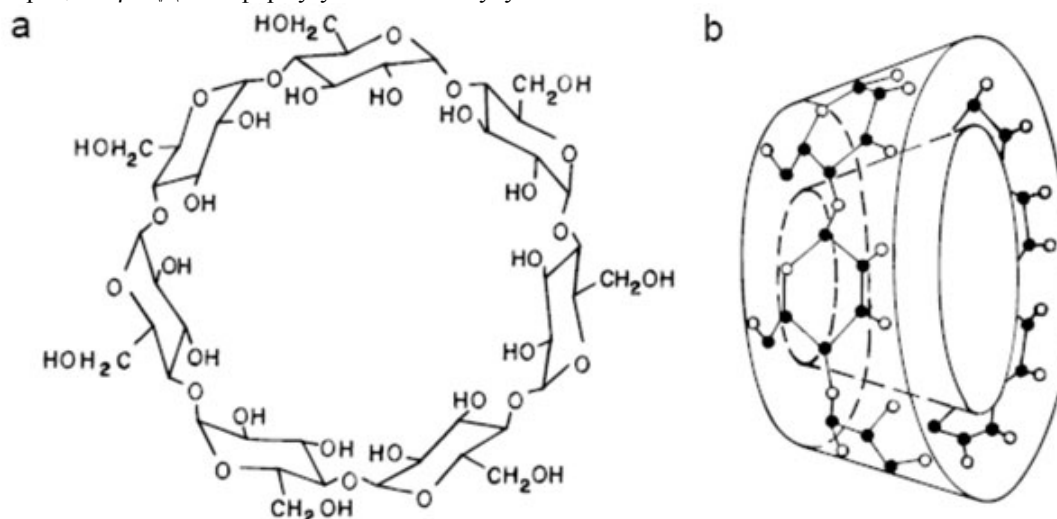


Рисунок 2 – Хімічна (а) і просторова (b) структура молекули β-циклодекстрину.

характеристикою β-циклодекстрину є його спроможність формувати трьохвимірні комплекси включення з різноманітними "гостьовими" молекулами придатного розміру шляхом інкапсулювання цих молекул у отвір макроциклу. Включення в β-ЦД значно впливає на фізико-хімічні властивості гостьових молекул, поки вони тимчасово зв'язані з порожниною "хазяїна", надаючи їм властивості, не досяжні іншим чином (наприклад, підвищення розчинності, стабілізацію лабільних "гостей" проти деградаційних ефектів окислення, видимого і ультрафіолетового світла та тепла, контроль летучості та сублимації, фізична ізоляція несумісних сполук, хроматографічне розділення та інші) [7-8]. В цьому сенсі функціоналізація β-ЦД (тобто модифікація структури, яка породжує певну функцію) дає можливість значно поширити спектр його впливу на фізико-хімічні властивості гостьових молекул і таким чином суттєво поширити сферу застосування β-ЦД в медицині та фармакології [9-10].

Наші попередні дослідження впливу β-ЦД на реакцію водного гідролізу бурштинового ангідриду [6] вказують на складний характер перебігу цієї реакції. Необхідною умовою встановлення її механізму є перш за все чітка ідентифікація продуктів реакції. Мета даної роботи - вивчити за допомогою рентгенографії проміжні продукти реакції сукцинілювання β-ЦД, виділені в кристалічному стані на різних ланках реакції.

Матеріали та методи

Рентгенографія монокристалів

Дослідження рентгенівської дифракції монокристалічних зразків проводили при кімнатній температурі (до $t^{\circ} = +25^{\circ}\text{C}$) на автоматичному

дифрактометрі "X-Calibur-3" (Oxford Diffraction Ltd), обладнаному детектором "Sapphire-3" CCD (MoK α випромінювання, графітовий монохроматор, $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). Структура розшифровувалась за допомогою прямого методу (програма SIR-97 [11]) та уточнювалась по $F^2(hkl)$ за допомогою програмного пакету Shelx-97 [12]. Водневі атоми на CH₂ групах розміщувались в ідеалізованих положеннях і уточнювались з використанням райдінг-моделі [12]. Остаточні водневі атоми локалізувались на різностній карті та ізотропічно уточнювались. Досліджено по 2 монокристалічних зразка.

Рентгенографія кристалічних порошків

Дослідження зразків кристалічних порошків проводили на порошковому дифрактометрі "Siemens D500" по геометричній схемі Бреґга-Брентано в інтервалі кутів $2^{\circ} \leq 2\theta \leq 90^{\circ}$ (CuK α випромінювання, нікелевий фільтр, сканування з кроком 0.02° , час накопичення 10 сек в кожній точці, горизонтальна розбіжність первинного пучку 1° , прийомна щіль 0.1°). Обробка рентгенограмми проведена за методом Рітвельда з використанням програм «WinPLOTR» та «FullProf» [13]. У якості стандартної рентгенограми для визначення інструментальних параметрів профілю ліній застосовані результати обробки рентгенограми порошку бориду лантана LaB₆. Для описання профіля піків застосована функція Фойгта.

Результати та обговорення

Реакція взаємодії бурштинового ангідриду та β-ЦД у водному середовищі

На рисунку 3 представлена схема реакції взаємодії бурштинового ангідриду та β-циклодекстрину у водному середовищі.

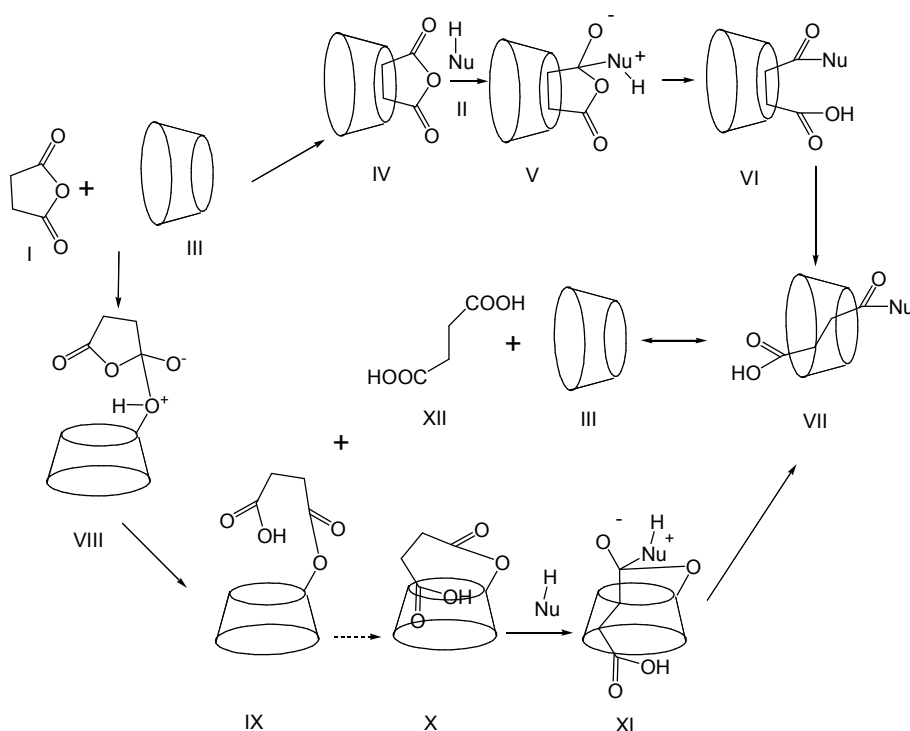


Рисунок 3 – Схема хімічних перетворень в реакції взаємодії бурштинового ангідриду та β -циклодекстрину у воді.

Одним з вірогідних напрямків реакції гідролізу бурштинового ангідриду в присутності β -ЦД, як медіатора реакції, є створення комплексу включення між β -ЦД і бурштиновим ангідридом. При цьому молекула ангідриду в порожнині β -ЦД (сполука (IV)) є гідрофілізованою, і реакція йде класичним шляхом через (IV-XII) до рівноваги (VII)+(XII) без утворення ковалентних зв'язків з медіатором (III). Механізм реакції в даному випадку базується лише на гідрофілізації бурштинового ангідриду (I) та збільшенні його розчиненості. Альтернативний механізм перебігу реакції, на наш погляд, - менш вірогідний, може базуватися на попередньому ацилюванні спиртових груп β -ЦД з подальшим "затягуванням" залишку бурштинової кислоти і гідролізом (IX) до (XII). Проте дуже висока стабільність сполуки (IX) робить сумнівним такий шлях реакції. Слід звернути увагу на аномальні властивості сполуки (IX). Вона не кристалізується (тому нам не вдалося здійснити її рентгеноструктурний аналіз) і, скоріш за все, є в'язкою рідиною. Ця сполука має максимальну температуру кипіння з розкладенням, яка перевищує $t^\circ = 310^\circ\text{C}$. Дослідження сполуки (IX) в даний час продовжується. Третій варіант перебігу реакції, на наш погляд – найвірогідніший, базується на перебігу

одночасно двох реакцій: через (IV) до суміші (XII) і (III) та через (XII) до (IX), де реакція зупиняється. В результаті, в реакційному середовищі залишаються чотири продукти: β -ЦД (III), комплекс включення β -ЦД із бурштиною кислотою (VI), бурштинова кислота (XII) та сукциніл- β -ЦД (IX).

За допомогою рентгенографії нами були досліджені проміжні продукти реакції, які були виділені в кристалічному стані на ланці реакції (V-XII).

Рентгенографія монокристалів

Аналізувались монокристалічні зразки двох типів. Перший тип монокристалів був виділений із кристалічного осаду і, як показав рентгеноструктурний аналіз, представляв собою кристали бурштинової кислоти (сполука XII). Другий тип монокристалів (ромбовидної форми) випав в осад із супернатантної рідини [6]. Аналіз цих зразків показав, що вони представляють собою комплекс включення β -ЦД і бурштинової кислоти (тобто сполука VI), який існує в кристалічному стані у вигляді гептагідрату [6]. На рисунку 4 показана його молекулярна упаковка в елементарній коміріці монокристалу.

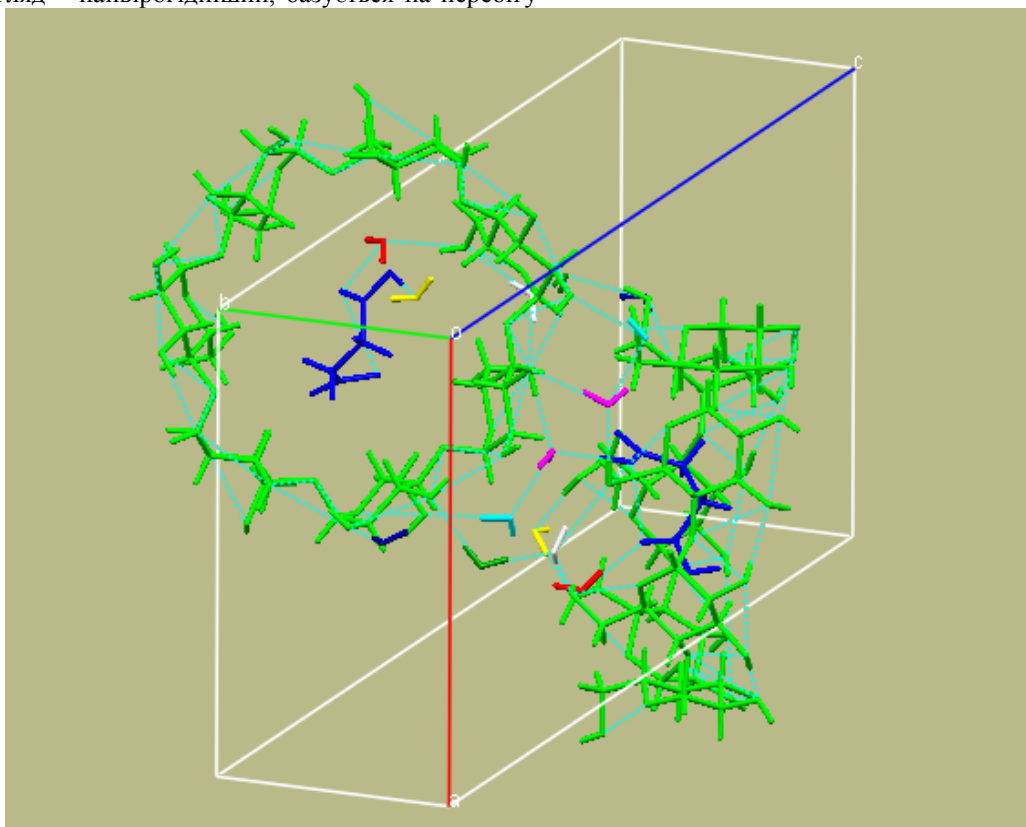


Рисунок 4 - Молекулярна упаковка в елементарній коміріці комплексу β -ЦД з бурштиною кислотою.

Структура кристалічного комплексу має моноклінну просторову групу $P2_1$, $a = 15.1977(7) \text{ \AA}$, $b = 10.1763(5) \text{ \AA}$, $c = 20.6943(6) \text{ \AA}$, $\beta = 109.239(4)^\circ$, $V =$

$3021.8(2) \text{ \AA}^3$, $Z = 2$, $R_1 = 0.0359$, $wR_2 = 0.0947$. Молекула бурштинової кислоти повністю поринена у порожнину β -ЦД, тоді як молекули води знаходяться на границях ободків β -ЦД та у просторі між

сусідніми молекулами β -ЦД і приймають участь у створенні міжмолекулярних водневих зв'язків. Карбоксильні групи бурштинової кислоти доступні для молекул води. Отримані результати свідчать про те, що гідроліз бурштинового ангідриду може здійснюватись у порожнині β -ЦД поблизу її вузького входу, де забезпечується наближеність ангідридного

зв'язку гостьової молекули до високо реактивних первинних гідроксилів β -ЦД. При цьому взаємне розташування молекул β -ЦД і бурштинової кислоти є достатньо тісним (рис. 5).

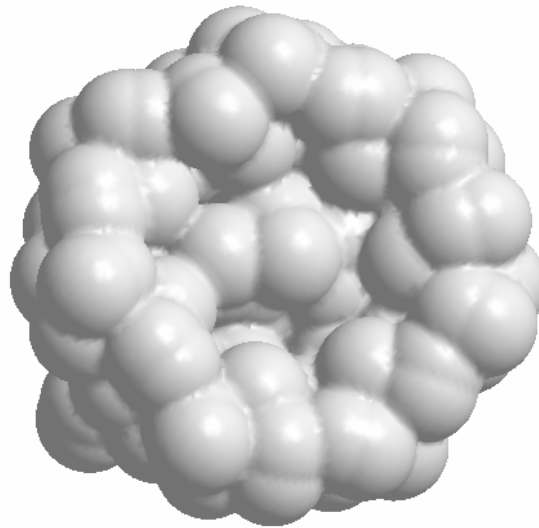


Рисунок 5 - Доступна розчиннику поверхня комплексу β -ЦД з бурштиною кислотою.

Рентгенографія кристалічних порошків

На рисунку 6 наведені результати розрахунку отриманої порошкової рентгенограми по програмі FullProf, а на рисунку 7 наведений мало кутовий фрагмент цієї рентгенограми. Експериментальна рентгенограма показана кружками, теоретично розрахована – суцільною лінією, вертикальними

штрихами показані розраховані положення максимумів, а знизу на різностній кривій показані значення різниць між експериментальною та розрахованою кривими у кожній точці. Видно, що спостерігається добра відповідність поміж спостерігаємою та розрахованою кривими. Таким чином, проведений за методами Рітвельда аналіз встановлює, що досліджувана система є двохфазною і

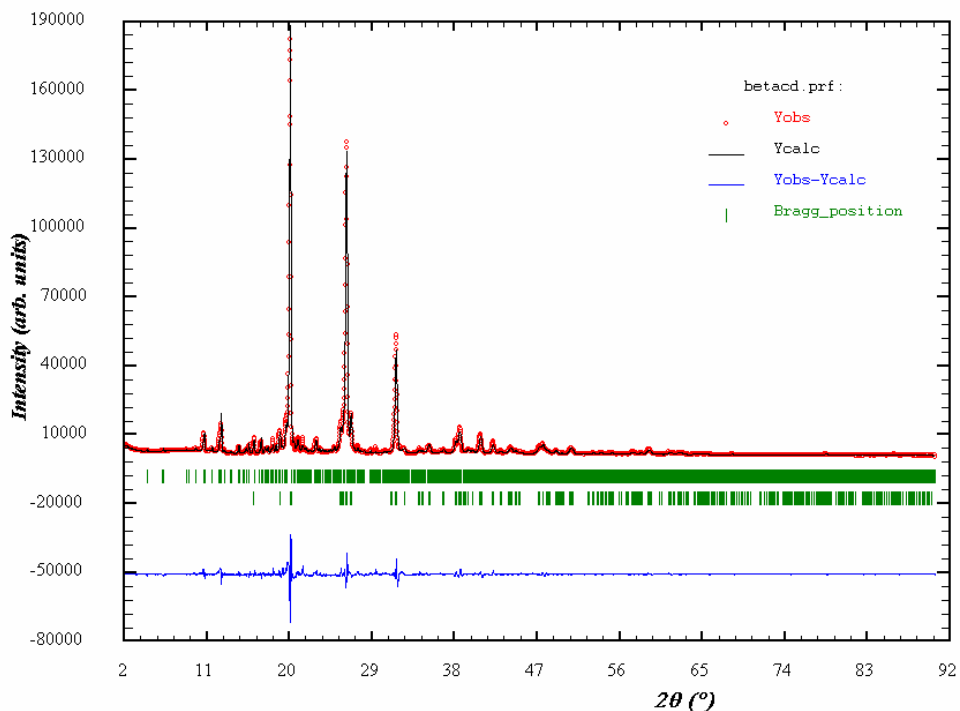


Рисунок 6 - Результати уточнення дифрактограми зразку по методу Рітвельда.

BetaCD_L301080215F1S3008m6.2x10

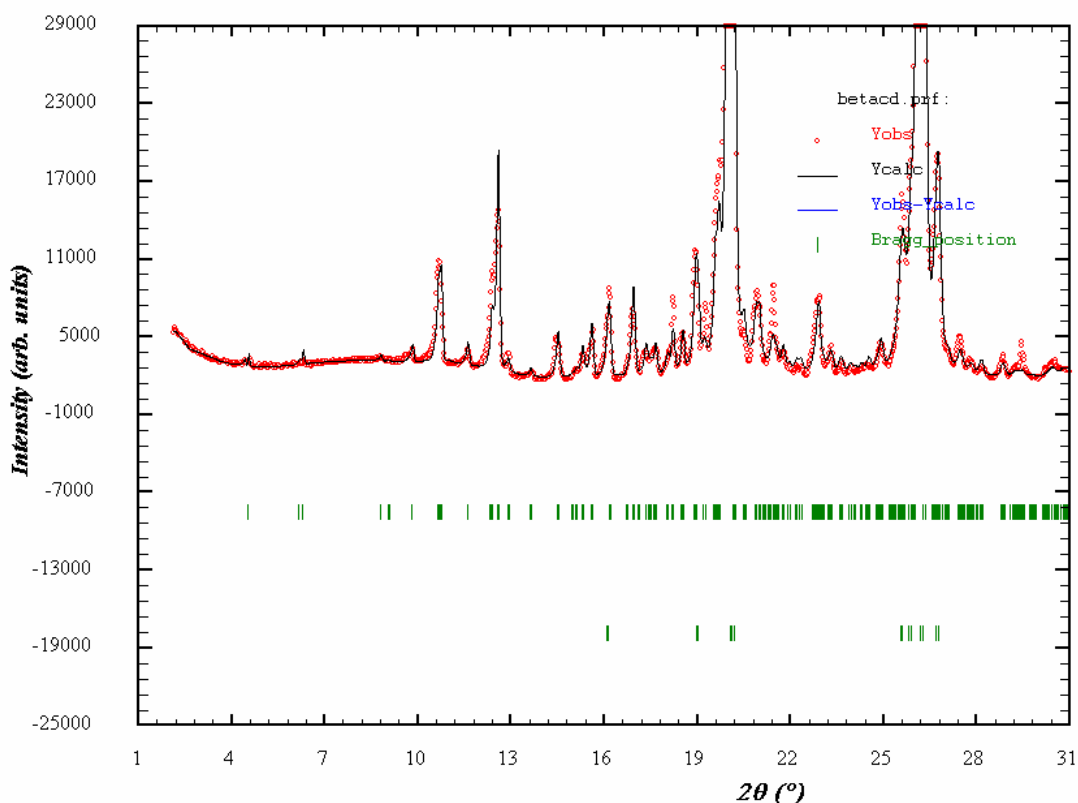


Рисунок 7 - Малокутова частина рентгенограми, показаної на рисунку 6.

складається з бурштинової кислоти (сполука XII) та комплексу включення β -ЦД з бурштиною кислотою (сполука VI). Інших фаз не виявлено. Незначні розбіжності, що спостерігаються на диференційній кривій, зумовлені недостатньою точністю математичної моделі, яка була використана для опису профілю і, можливо, - незначними кількостями домішей (порядку 0.1%), які могли бути у реактивах, застосованих для проведення реакції.

Висновки

1. Аналіз особливостей перебігу реакції взаємодії бурштинового ангідриду та β -ЦД у водному середовищі дозволяє вважати, що найвірогіднішим є варіант одночасного перебігу двох реакцій гідролізу бурштинового ангідриду: (1) у складі його невалентного комплексу включення із β -ЦД (сполука VI) та (2) - у складі його валентного комплексу із β -ЦД (сполука IX). В результаті, в реакційному середовищі залишаються 4 продукти: β -ЦД (III), комплекс включення β -ЦД із бурштиновим ангідридом (VI), бурштинова кислота (XII) та сукциніл- β -ЦД (IX).

2. Результати рентгенографічного дослідження проміжних кристалічних продуктів реакції взаємодії бурштинового ангідриду та β -ЦД (монокристалів та

кристалічних порошків) підтверджують принаймні перший шлях реакції: рентгенографія зразків монокристалів та кристалічних порошків виявляє в реакційному середовищі як комплекс включення β -ЦД із бурштиновим ангідридом (VI), так і бурштинову кислоту (XII). Досліджувані кристалічні порошки представляють собою двофазну систему, яка складається з бурштинової кислоти та комплексу включення циклодекстрину з бурштиною кислотою. Інших фаз не виявлено.

Список літератури

1. Berkhout B., Derksen G.C., Back N.K., Klaver B, de Kruijff C.G., and Visser S.: Structural and functional analysis of negatively charged milk proteins with anti-HIV activity. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **13**, 1101-1107 (1997).
2. Swart P.J., Beljaars E., Smit C., Pasma A., Schuitemaker H., and Meijer D.K.: Comparative pharmacokinetic, immunologic and hematologic studies on the anti-HIV-1/2 compounds aconitylated and succinylated HAS. *J. Drug Target.* **4**, 109-116 (1996).
3. Martynov A.V., Smelyanskaya M.V.: Antiproliferative properties of chemically modified α -2b-recombinant interferon. *J. of Interf. & Cytokine Res.* **25**, 414-417 (2005).
4. Мартынов А.В., Клемчук Л.В., Осолодченко Т.П., Батрак Е.А., Петрова Т.М., Штикер Л.Г., Завада Н.П., Лисняк Ю.В. Антимикробные и противогрибковые

свойства сукцинированного β -циклодекстрина и его комплекса включения с нистатином // *Аннали Мечниковського Інституту*. – 2006. - № 1. – С. 79-83. [On-line: <http://www.imiamn.org/j12006.htm>]

5. Лисняк Ю.В., Мартынов А.В., Клемчук Л.В. Синтез, свойства и стабильность к действию амилазы ацильных производных β -циклодекстрина // *Аннали Мечниковського Інституту*. – 2008. - № 1. – С. 38-41. [Online: <http://www.imiamn.org/j12008.htm>].

6. Lisnyak Yu.V., Martynov A.V., Baumer V.N., Shishkin O.V., Gubskaya A.V. Crystal and molecular structure of β -cyclodextrin inclusion complex with succinic acid // *J. Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. – 2007. – Vol. 58, N3. – P. 367-375.

7. Szejtli J. Cyclodextrins and molecular encapsulation / *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, 2004, P. 283-304.

8. Cyclodextrins and Their Complexes / Eds. Helena Dodziuk., WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., 2006.-110 p.

9. Szejtli J. Cyclodextrins: applications / *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, Marcel Dekker, 2004. – P. 405-413.

10. Szejtli J. Past, present and future of cyclodextrin research // *Pure Appl. Chem.* – 2004. - Vol. 76. – P. 1825-1845.

11. Altomare A., Burla M.C., Camalli M., Cascarano G.L., Giacovazzo C., Guagliardi A., Moliterni A.G.G., Polidori G. and Spagna R. // *J. Appl. Cryst.* – 1999. – Vol. 32. – P.115-119.

12. Sheldrick G.M.: SHELXL-97, Release 97-2, University of Göttingen, Germany (1997).

13. Rodrigiez-Carvajal J., Roisnel T. FullProf.98 and WinPLOTR: New Windows95/NT Applications for Diffraction. Commission for Powder Diffraction, International Union of Crystallography, Newsletter N20 (May-August) Summer 1998.

УДК 529.213.29; 541.515. 615.02/14; 615.281; 615.31
РЕНТГЕНОГРАФІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ
ПРОМІЖНИХ ПРОДУКТІВ РЕАКЦІЇ
ВЗАЄМОДІЇ БУРШТИНОВОГО АНГІДРИДУ ТА
 β -ЦИКЛОДЕКСТРИНУ У ВОДНОМУ
СЕРЕДОВИЩІ

Мартынов А.В., Баумер В.М., Лисняк Ю.В.

В роботі аналізуються особливості перебігу реакції взаємодії бурштинового ангідриду та β -циклодекстрину (β -ЦД) у водному середовищі. За допомогою рентгенографії досліджені проміжні кристалічні продукти реакції, виділені на різних етапах реакції. Рентгенографія зразків монокристалів та кристалічних порошоків виявляє в реакційному середовищі як комплекс включення β -ЦД із бурштиною кислотою, так і саму бурштинову кислоту, і тим самим підтверджує, що одним з шляхів реакції є гідроліз бурштинового ангідриду у складі його невалентного комплексу включення із β -ЦД.

Ключові слова: бурштиновий ангідрид, β -циклодекстрин, рентгеноструктурний аналіз.

УДК 529.213.29; 541.515. 615.02/14; 615.281; 615.31
РЕНТГЕНОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЯНТАРНОГО АНГИДРИДА
С β -ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ В ВОДНОЙ СРЕДЕ
Мартынов А.В., Баумер В.Н., Лисняк Ю.В.

В работе анализируются особенности протекания реакции взаимодействия янтарного ангидрида с β -циклодекстрином (β -ЦД) в водной среде. С помощью рентгенографии исследованы промежуточные кристаллические продукты реакции, выделенные на разных этапах реакции. Рентгенография образцов монокристаллов и кристаллических порошков выявила в реакционной среде как комплекс включения β -ЦД с янтарной кислотой, так и саму янтарную кислоту, и тем самым подтверждает, что одним из путей реакции является гидролиз янтарного ангидрида в составе его невалентного комплекса включения с β -ЦД.

Ключевые слова: янтарный ангидрид, β -циклодекстрин, рентгеноструктурный анализ

UDC 529.213.29; 541.515. 615.02/14; 615.281; 615.31
X-RAY ANALYSIS OF INTERMEDIATES OF
SUCCINIC ANHYDRATE INTERACTION WITH
 β -CYCLODEXTRIN IN WATER

Martynov A.V., Baumer V.N., Lisnyak Yu.V.

The peculiarities of interaction of succinic anhydrate with β -cyclodextrin (β -CD) in water are discussed in the paper. Crystal intermediates isolated at different stages of the reaction have been studied by X-ray analysis. X-ray analysis of the samples of single crystals and crystal powders reveals both β -CD inclusion complex with succinic acid and free succinic acid in reaction media, and thus confirms that hydrolysis of succinic anhydrate being included in β -CD is one of the reaction path.

Key words: succinic anhydrate, β -cyclodextrin, X-ray analysis.