

PACS numbers: 78.30.Na, 81.05.ub, 81.07.Nb, 81.16.Fg, 87.15.ag, 87.64.K-, 87.85.Qr

Модифікація свойств алкалоидов препарата Conium фуллеренами C₆₀

М. А. Заболотный, А. И. Момот, Г. И. Довбешко*, Е. П. Гнатюк*,
Г. И. Соляник**, Л. Н. Киркилевская***, О. П. Дмитренко, Н. П. Кулиш,
Е. В. Фузик, М. О. Кузьменко

*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,
ул. Владимирская, 64,
01033 Киев, Украина*

**Институт физики НАН Украины,
просп. Науки 46,
03650, ГСП, Киев-39, Украина*

***Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии
им. Р. Е. Кавецкого,
ул. Васильковская, 45,
03022 Киев, Украина*

****Киевский университет УАНМ,
ул. Толстого, 9,
01033 Киев, Украина*

Исследуются электронно-оптические свойства алкалоидов Кониума и его модификаций с фуллереном (C₆₀). Установлены энергетические конфигурации γ -коницеина и N-метилкониина с помощью численного моделирования. Доказана возможность комплексообразования γ -коницеина с фуллереном. Выполнен сравнительный анализ результатов моделирования, а также ИК- и КР-спектromетрии.

Досліджуються електронно-оптичні властивості алкалоїдів Коніуму і його модифікацій з фуллереном (C₆₀). Встановлено енергетичні конфігурації γ -коницеїну та N-метилкониїну за допомогою числового моделювання. Доведено можливість комплексоутворення γ -коницеїну з фуллереном. Виконано порівняльну аналізу результатів моделювання та ІЧ- і КР-спектromетрії.

The electron-optical properties of alkaloids of Conium and its modifications with fullerenes (C₆₀) are investigated. Energy configurations of γ -coniceine and N-methylconiine are determined by numerical simulations. The possibility of complexation of γ -coniceine with fullerene is proved. Comparative analysis of simulation results and IR and Raman spectrometry is performed.

Ключевые слова: Кониум, алкалоиды, фуллерен, γ -коницеин, конформации, комплекс.

(Получено 9 июня 2011 г.; окончательная версия — 30 мая 2012 г.)

1. ВВЕДЕНИЕ

Можно считать достаточно твердо установленным, что основные физические, химические и биологические свойства как органических соединений, биологических полимеров, так и малых молекул определяются пространственной организацией этих молекул. Открытия последних лет в таких отдаленных областях науки как механизмы реакций органических соединений, реакций ферментативного катализа, процессы туннельно-конформационного переноса электронов в бактериальных реакционных центрах, механизмы действия лекарственных препаратов, во многом обусловлены внедрением в физику молекул концепций молекулярного конформационного анализа [1–4]. Целенаправленная модификация конформационных и связанных с ними энергетических характеристик биологически активных органических молекул предоставляет возможность отказаться от биоскрининга при разработке новых лекарственных препаратов. Известными результатами таких разработок могут служить — синтезированный при использовании алкалоидов в Украинском противораковом институте в Вене противоопухолевый препарат «Украин» и созданный в Институте фитохимии МН-АН Республики Казахстан «Арглабин». Оба препарата успешно используются в клинике. Отметим, что, несмотря на стремительное развитие молекулярной биологии и химии, обеспечивающих быструю эскалацию синтезируемых *de novo* препаратов, растения остаются традиционным и богатым источником фармакологически активных веществ. Так, почти половина современных лекарственных средств, используемых в медицине, получены при использовании растительных экстрактов.

Сказанное в полной мере относится и к противоопухолевым препаратам. Основными биологически активными агентами растений, используемых в медицине для лечения злокачественных новообразований, являются алкалоиды, проявляющие выраженное цитостатическое действие на опухолевые клетки.

Опыт применения противоопухолевой химиотерапии при использовании традиционных препаратов показал [5] ограниченность ее возможностей и низкую эффективность при лечении местнораспространенных и диссеминированных форм злокачественных новообразований. В этом случае, недостаточная эффективность цитостатической терапии обусловлена низкой избирательностью противоопухолевого действия и высокой токсичностью в отношении

нормальных и, как правило, жизненно важных органов и тканей. В связи с этим, создание новых лекарственных средств, равно как и повышение эффективности (и/или снижение токсичности) широко используемых противоопухолевых препаратов является одной из наиболее актуальных задач современной онкологии. В основе модификации фармакологических свойств противоопухолевых препаратов может лежать изменение структуры и свойств молекулы активного ингредиента за счет образования комплексов с фуллеренами [5–7]. Известно, что молекулы фуллеренов C₆₀, вследствие их высокосимметричного строения и обусловленных этим электронных характеристик, являются эффективными акцепторами электронов, способными существенно влиять на кинетику опухолевых процессов [6].

Одним из необходимых условий успешного изучения новых (или модифицированных известных) лекарственных препаратов является установление строения полученных соединений. Информация о пространственной структуре соединений имеет важное значение для установления корреляции структура — биоактивность, установления механизмов действия препаратов на организм и решения задач направленного синтеза эффективных лекарственных препаратов, новых веществ с практически ценными свойствами. Поэтому является актуальной задача комплексного исследования строения молекул, их конформационных состояний, путей и барьеров конформационных переходов в них. Кроме того, анализ строения полициклических и каркасных соединений, особенно содержащих десятичленный карбоцикл, представляет самостоятельный интерес для стереохимии. Полученная информация имеет и самостоятельное значение, так как расширяет круг знаний о конформационном поведении некоторых структурных типов важных природных соединений — алкалоидов.

Цель работы — изучить возможность комплексообразования алкалоидов Кониума с биоинертным допантом фуллереном C₆₀, определение энергетических и конформационных характеристик аддуктов алкалоидов Кониума.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализ возможности образования аддуктов молекул алкалоидов с фуллеренами C₆₀ выполняли с помощью численного моделирования и анализа спектров поглощения в ИК-области. При экспериментальных исследованиях использовался препарат Кониума (**Conium maculatum D3** производства фирмы **Weleda**, Германия) и 2% водный раствор фуллерена C₆₀, изготовленного в Техническом университете г. Ильменау (Германия) [8]. Смесь фуллерена с Кониумом готовилась путем смешивания исходных веществ в разных соотно-

шениях: 0,2 мл C_{60} + 0,05 мл Кониума, 0,2 мл C_{60} + 0,1 мл Кониума, 0,2 мл C_{60} + 0,2 мл Кониума, с дальнейшим их перемешиванием в ультразвуковой мешалке в течение 30 мин.

Выбор препаратов фирмы **Weleda** обуславливался стабильностью их образцов, что доказывают ИК спектры при замене образцов. Для регистрации спектров фуллерена, Кониума и смеси (фуллерен + Кониум) были приготовлены таблетки в KBr. ИК-спектры были зарегистрированы с помощью ИК-фурье-спектрометра Bruker IFS 66 (Германия) в геометрии на пропускание. Точность определения волнового числа составляла $0,2 \text{ см}^{-1}$, точность определения пропускания 0,1%. Регистрация и обработка спектров выполнялись при помощи программы OPUS 5.5.

Спектры комбинационного рассеяния были зарегистрированы с помощью раман-спектрометра Jobin Yvon.

Численный анализ выполнялся с помощью программы Gaussian 03, методом функционала плотности с гибридным функционалом Becke 3 Lee Yang Parr (B3LYP) с базисом 6-31 G(d).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что болиголов пятнистый (*Conium maculatum*), из которого изготавливают препарат Кониум, в своем составе содержит ряд алкалоидов, основными из которых являются конииин ($C_8H_{17}N$), N-метилкониин ($C_9H_{19}N$), γ -коницеин ($C_8H_{15}N$), конгидрин ($C_8H_{17}NO$) и псевдоконгидрин ($C_8H_{17}NO$) [9]. Относительно N-метилкониина известно, что он может быть в двух конформационных состояниях (1 и 2), что нами и учитывается при анализе.

Выполненные нами расчеты дипольных моментов и энергии основных состояний молекул алкалоидов показали (см. табл. 1), что только три алкалоида из шести исследуемых (γ -коницеин, конгидрин, псевдоконгидрин) имеют высокие значения дипольных моментов, что указывает на значительную вероятность образования

ТАБЛИЦА 1. Дипольные моменты и энергия основного состояния алкалоидов, входящих в состав Кониума.

Название алкалоида	Дипольный момент, [дебай]	Энергия основного состояния, [хартри]
Кониин	0,82	-369,84826676
N-метилкониин 1	0,44	-409,15251784
N-метилкониин 2	0,46	-409,15225083
γ -коницеин	1,77	-368,63751857
Конгидрин	1,28	-445,05545681
Псевдоконгидрин	2,37	-445,05760847

аддуктов с участием этих молекул за счет сил Ван дер Ваальса. Отметим, что образование аддуктов алкалоидов по этому каналу может представлять значительный практический интерес. Так как при образовании соединений, за счет слабых межмолекулярных взаимодействий, могут оставаться практически неизменными индивидуальные физические свойства молекул алкалоидов при одновременной модификации их как биологической активности, за счет изменения конформационного состояния, так и транспортных свойств. Более значительные изменения свойств алкалоидов возможны при установлении более сильных их связей с модифицирующими примесями. Оценить возможность таких процессов можно при использовании энергетических характеристик молекул алкалоидов, представленных в табл. 1.

При выполнении исследований алкалоидов болиголова пятнистого и оценке значения полученных результатов необходимо учитывать неравномерность распределения концентраций алкалоидов в исходном экстракте, который в основном содержит [10] конииин, N-метилконииин, γ -коницеин, структурные формулы которых приведены на рис. 1.

При определении приведенных структурных формул для молекулы каждого из алкалоидов была выполнена оптимизация ее геометрии и рассчитаны ИК- и КР-спектры. При расчете спектров использовался масштабный множитель 0,9613, рекомендованный программой Gaussian 03. Ниже приведены расчетные спектры ко-

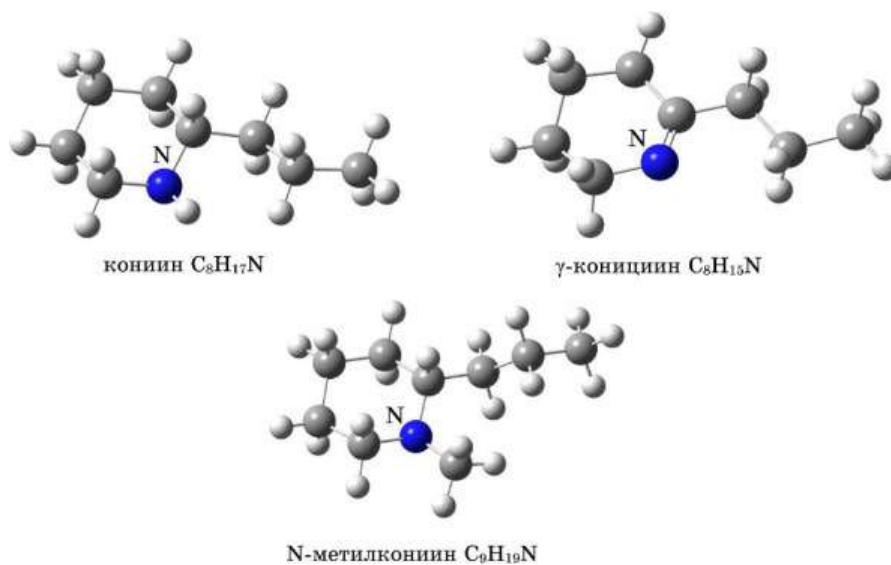


Рис. 1. Структурные формулы алкалоидов с наибольшей концентрацией в составе болиголова пятнистого.

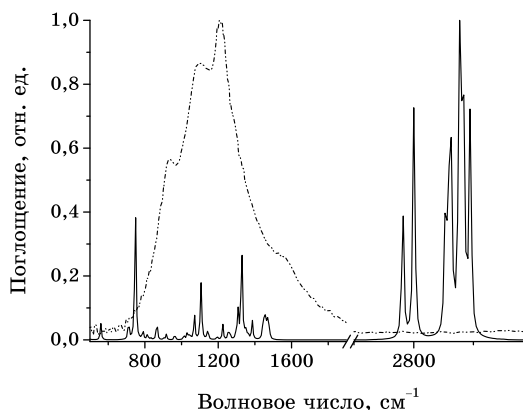


Рис. 2. ИК-спектры: сплошная линия — расчетные данные для молекулы кониина, пунктирная линия — экспериментальный спектр препарата Кониум.

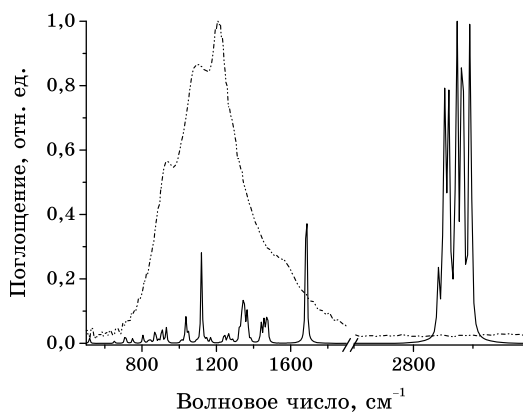


Рис. 3. ИК-спектры: сплошная линия — расчетные данные для γ -коницеина, пунктирная линия — экспериментальный спектр препарата Кониум.

ниина, γ -коницеина и N-метилкониина в сопоставлении с соответствующими измеренными спектрами препарата Кониум, определенными при использовании таблеток KBr (рис. 2–4).

Из рисунков 2–4 видно, что спектры трех исследуемых алкалоидов подобны. Линии в высокочастотной области спектра связаны с колебаниями C–N- и C–H-групп. В низкочастотной области спектров проявляются колебания связей C–N, C–H, и C–C, которые имеют коллективный характер, а также деформационные колебания C–N и C–H. В спектре γ -коницеина присутствует четко выраженная линия 1684 см^{-1} , которая отвечает колебаниям двойной связи C=N, в спектрах двух других алкалоидов подобная линия от-

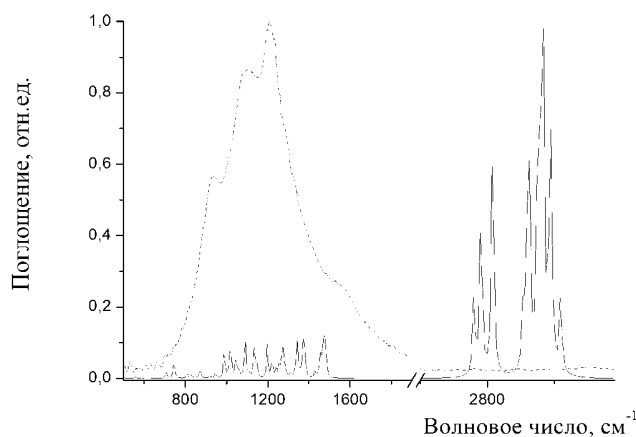


Рис. 4. ИК-спектры: сплошная линия — результаты вычислений для N-метилкониина, пунктирная линия — экспериментальный спектр препарата Кониум.

существует.

Вычисленные спектры алкалоидов качественно совпадают с экспериментальным спектром ИК-поглощения таблетки Кониума (пунктирная линия на рис. 2–4). По наличию пиков в экспериментальном спектре в области $\cong 1600\text{--}1800\text{ см}^{-1}$ можно сделать вывод о присутствии γ -коницеина в препарате Кониум. Присутствие кониина можно определить по КР-спектру, так как расчеты указывают на наличие линии 3369 см^{-1} , связанной с колебаниями в которых изменяется длина связи N–H.

Особый интерес представляет γ -коницеин, единственный из алкалоидов, входящих в состав Кониума, обладающий двойной связью, соединяющей атомы N и C (рис. 1.). Наличие у γ -коницеина двойной связи может указывать на возможность образования им устойчивых химические комплексов без деструкции.

Численный анализ, выполненный с помощью программы Gaussian, показал наличие минимум шести устойчивых конформаций γ -коницеина, структурные формулы которых представлены на рис. 5.

Конформации 1–4, 6, 7 являются устойчивыми (частоты их колебаний действительные числа), конформация (5) — неустойчивая (присутствует одна комплексная частота колебаний, мнимая часть которой говорит о скорости исчезновения этой конформации) (табл. 2). Молекула в конформации 1 обладает наименьшим значением энергии основного состояния (E_1). Из этого следует, что в равновесном состоянии конформация 1 встречается наиболее часто. (Относительная вероятность нахождения остальных конформаций молекул γ -коницеина может быть оценена при использовании значений их энергий, приведенных в табл. 2, и распределения Больцмана.)

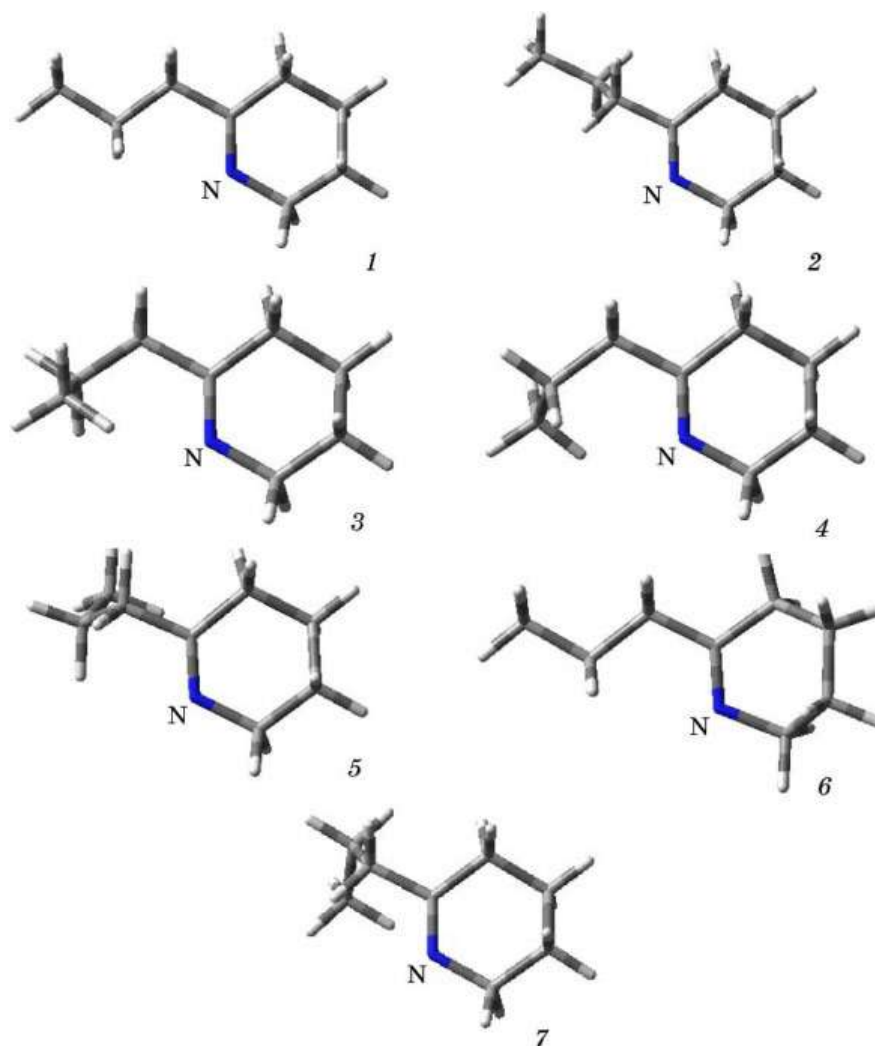


Рис. 5. Пространственные схемы конформационных форм молекулы γ -коницина.

Различия в конформационных состояниях γ -коницина можно охарактеризовать, изучая их угловые различия. С целью детализации выполненного нами анализа, для характеристики конформационного состояния были выбраны три двугранных угла, которые принимают существенно разные значения для разных конформаций. А именно, α — двугранный угол между плоскостью, которая проходит через атомы N1, C1, C2 и плоскостью C1, C2, C3, β — двугранный угол между C1, C2, C3 и C2, C3, C4, γ — двугранный угол между N1, C1, C5 и C1, C5, C6 (рис. 6).

ТАБЛИЦА 2. Характеристики молекулы γ -коницина в различных конформационных состояниях.

№	$E - E_1, \text{эВ}$	Число комплексных частот	Дипольный момент	Положение пика x_i в ИК-спектре, который отвечает колебаниям C=N, см^{-1}	Разность в положении пиков $x_i - x_1, \text{см}^{-1}$
1	0	0	1,7718	1683,76	0
2	0,034231649	0	1,7773	1678,48	-5,28
3	0,022138541	0	1,8422	1685,70	1,94
4	0,02827639	0	1,8799	1684,92	1,16
5		1	1,6616		
6	0,134273463	0	1,9221	1665,75	-18,01
7	0,053040306	0	1,7924	1675,39	-8,37

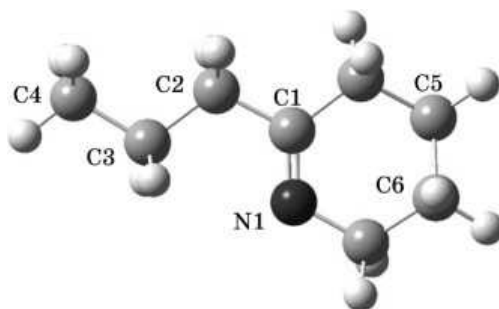


Рис. 6. Нумерация атомов конформационно зависимой части молекулы γ -коницеина.

ТАБЛИЦА 3. Структурные характеристики молекулы γ -коницеина в различных конформационных состояниях.

№	Максимальные линейные размеры, Å	α , °	β , °	γ , °
1	8,4	6,5	-179,8	-28,7
2	8,3	-97,8	-179,4	-28,6
3	7,5	11,97	71,9	-28,7
4	7,6	-2,95	-73,6	-28,7
5	7,2	-93,2	-65,5	-28,8
6	8,3	-1,23	180	-7,6
7	7,2	-105	63,9	-28,6

Различия линейных и угловых параметров конформационных состояний γ -коницеина приведены в табл. 3. Из представленных данных видно, что конформация с наименьшей энергией имеет наибольшие из возможных линейные размеры и наименьшее значение (для устойчивых состояний) дипольного момента.

На рисунке 7 представлено сравнение инфракрасных спектров двух конформеров γ -коницеина, а именно конформеров с минимальными энергиями: спектры конформеров различаются, наблюдаются изменения как положения полос так и их интенсивности.

В ИК-спектре фуллерена наблюдаются четыре узких полосы поглощения 527, 576, 1182, 1429 см^{-1} , что подтверждает природу исходного препарата. В ИК-спектре полосы обусловлены внутримолекулярными колебаниями ИК-активной моды $4T_{1u}$. Полоса 576 см^{-1} менее чувствительна к действию внешних факторов. Характеристикой межмолекулярного расстояния есть мода 1182 см^{-1} , а частота 1429 см^{-1} — чувствительна к влиянию заряда. Обе эти моды относятся к валентным колебаниям, причем колебания по касательной к сфере одиночной связи C–C наблюдаются в области $\cong 1183 \text{ см}^{-1}$, а двойной C=C связи (общей стороны шестиугольников) — в области

$\cong 1426 \text{ см}^{-1}$. Кроме того, в области $3500\text{--}3400 \text{ см}^{-1}$ есть две линии водородосвязанных валентных колебаний ОН, которые отвечают более сильным (3520 см^{-1}) и слабым (3415 см^{-1}) водородным связям.

В спектрах комбинационного рассеяния также наблюдаются характеристичные колебания для C₆₀ (рис. 8) В спектре комбинационного рассеяния регистрируются маркерные линии фуллереина 1574 , 1466 , 1424 , 270 см^{-1} .

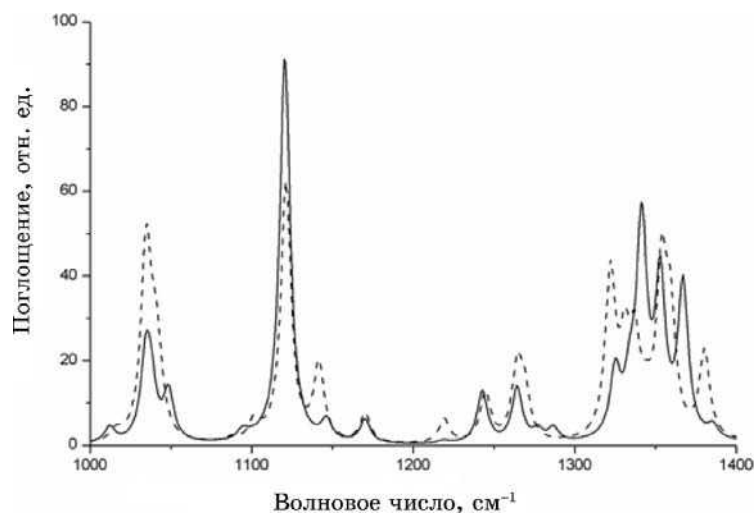


Рис. 7. Сравнение ИК-спектров двух конформеров (1 и 3) γ -коницеина.

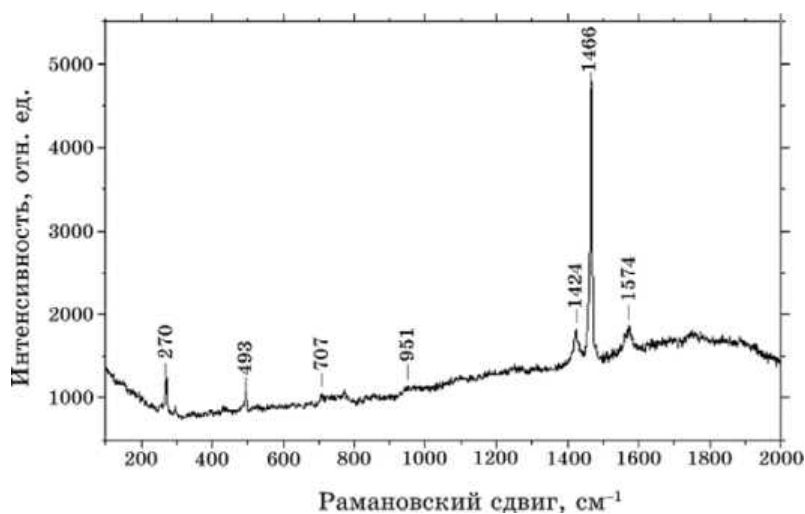


Рис. 8. Спектр комбинационного рассеяния фуллереина, осажденного на золотую подложку из водного раствора.

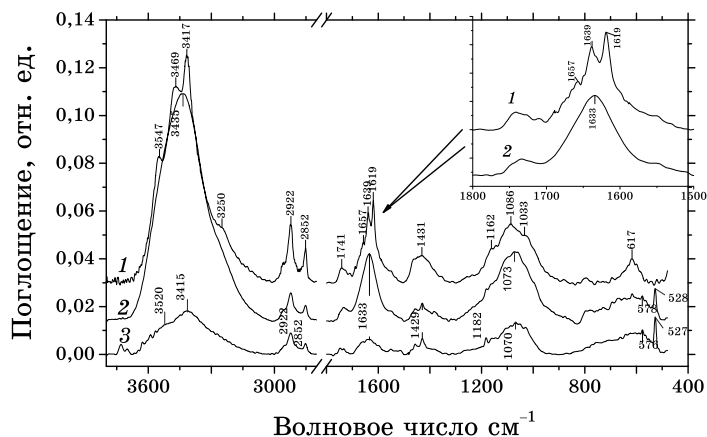


Рис. 9. ИК-фурье спектры препарата Кониум (1), фуллера (3) и комплекса Кониума с фуллереном (2).

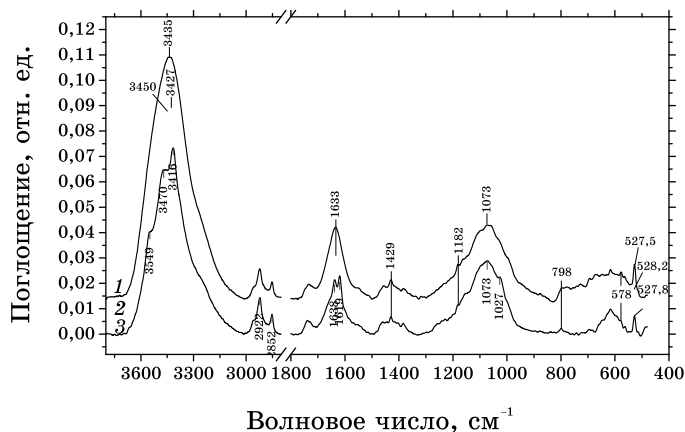


Рис. 10. ИК-спектры комплекса фуллера с препаратом Кониум в разных концентрациях: 0,2 мл C_{60} + 0,05 мл Кониума (1), 0,2 мл C_{60} + 0,1 мл Кониума (2), 0,2 мл C_{60} + 0,2 мл Кониума (3).

В спектре Кониума видим (рис. 9) три линии водородсвязанных валентных колебаний OH, которые отвечают разного рода водородным связям (3547, 3469, 3417), а также плечо на 3250 см^{-1} , которое отвечает водородсвязанным колебаниям NH молекулярных групп. Характерной особенностью является присутствие двух линий 1639 и 1619 см^{-1} , которые относятся к поглощению C=N молекулярных групп. Так как рассчитанное положение линии поглощения C=N зависит от конформации (табл. 2), то можно утверждать, что γ -коницеин присутствует в препарате Кониум в различных конформациях. Экс-

периментальные данные хорошо согласуются с данными расчетов, полученных квантово-химическими методами. При создании комплекса Кониум–фуллерен линия 1619 исчезает (рис. 10), но остается линия 1633, вклад в которую главным образом дает вода в КВг. Это может свидетельствовать о разрыве связи $C=N$ в γ -коницеине.

Программа Gaussian также использовалась для исследования возможности комплексообразования молекулы γ -коницеина и фуллера C_{60} . Произведенные расчеты показали возможность образования устойчивого комплекса, представленного на рис. 11.

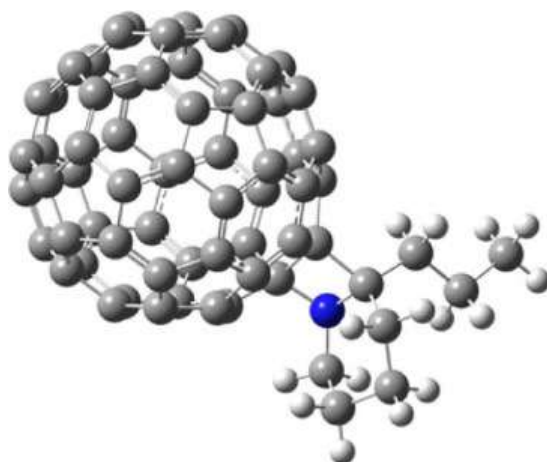


Рис. 11. Молекулярный комплекс γ -коницеина и C_{60} .

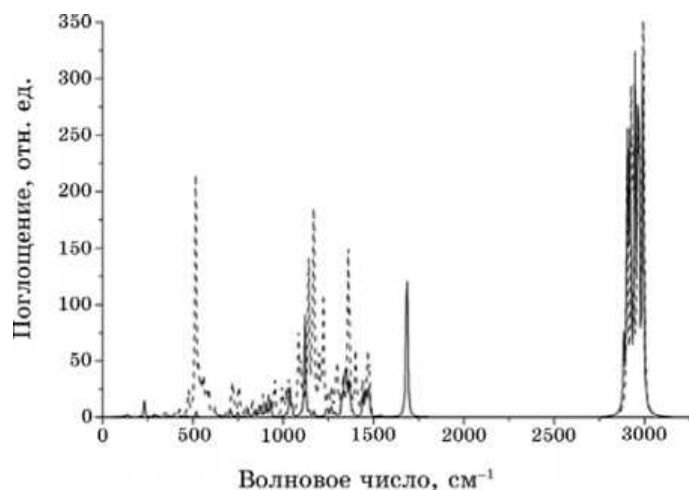


Рис. 12. Сравнительный ИК-спектр: сплошная линия — γ -коницеин в конформации 1, пунктирная линия — комплекс.

Рисунок 12 (табл. 4) иллюстрирует деформационное изменение γ -коницеина относительно наиболее энергетически выгодной конформации *1* в процессе комплексообразования. Оптимизация приведенной на рис. 11 структуры и расчет спектра колебаний комплекса предварительно выполнялись с помощью метода Хартри–Фока с базисом G3-21. Для оптимизированной структуры при использовании метода функционала плотности (B3LYP) с базисом 6-31G(d) определена энергия основного состояния комплекса; после чего с помощью метода функционала плотности выполнялась оптимизация геометрии молекулярного комплекса, и выполнялся расчет спектра колебаний. Отсутствие мнимых частот свидетельствовало об устойчивости комплекса при комнатной температуре. К рассчитанным значениям энергий основного состояния прибавлялась поправка, связанная с нулевыми колебаниями. Результаты расчетов иллюстрируют данные, приведенные в табл. 4.

В спектре комплекса присутствуют также характерные линии фуллерепа. В инфракрасном спектре комплекса отсутствует линия 1684 см^{-1} , характерная для γ -коницеина и отвечающая за колебания двойной связи C=N. Очевидно, это обусловлено гибридизацией состояния кольцевых колебаний C_{60} коницеина при образовании комплекса.

Таким образом, показана возможность модификации конформационных характеристик алкалоидов Кониума с помощью фуллерепа C_{60} . Подобная модификация конформационных характеристик алкалоидов Кониума может существенно повлиять на его фармакологические свойства, характер которых нуждается в специальных исследованиях. Это предположение согласуется с отмеченным [6] влиянием препарата Кониум–фуллерен на ингибицию роста опухоли самок белых беспородных мышей: было зарегистрировано замедление роста опухоли при использовании этого препарата.

4. ВЫВОДЫ

1. Методами квантовой химии при использовании программы Gaussian определены структурные формы, рассчитаны значения дипольных моментов и значения энергии основного состояния алкалоидов, входящих в состав Кониума: кониина, N-метилкониина, γ -коницеина, конгидрина и псевдоконгидрина.
2. Определена пространственная структура и энергетические характеристики стабильных и нестабильных конформаций молекулы γ -коницеина.
3. Выполнен расчет спектров ИК-поглощения двух наиболее низкоэнергетических молекулярных конформаций γ -коницеина; выполнен сравнительный анализ модельных предсказаний и экспериментальных спектров Кониума.

ТАБЛИЦА 4. Характеристики комплекса γ -конициин-C₆₀.

Метод оптимизации и расчета колебаний	Метод расчета энергии основного состояния	Энергия основного состояния, хартри				Энергия связи	
		Фуллерен C ₆₀	γ -конициин	Сумма C ₆₀ + γ -конициин	Комплекс C ₆₀ + γ -конициин	хартри	эВ
Хартри-Фок 3-21G	Хартри-Фок 3-21G	-2258,672019	-363,8686635	-2622,540683	-2622,541273	-0,0004635	0,0160682
Хартри-Фок 3-21G	Функционал плотности 6-31 G(d)	-2285,758509	-368,4130659	-2654,171575	-2654,171111	-0,0004635	0,012614
Функционал плотности 6-31 G(d)	Функционал плотности 6-31 G(d)	-2285,799071	-368,4171536	-2654,216225	-2654,195391	-0,0208339	-0,566923

4. С использованием методов квантово-химических расчетов и экспериментального исследования спектров поглощения в ИК-диапазоне доказана возможность комплексообразования γ -коницеина и фуллерена C_{60} . Установлен характер конформационных изменений низкоэнергетического состояния γ -коницеина при образовании его комплекса с C_{60} .

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. И. М. Перцева, И. А. Зупанца, *Фармацевтические и медико-биологические аспекты лекарств* (Харьков: УкрФА: 1999), т. 1–2, с. 903.
2. В. Й. Гольданский, Л. И. Трахтенберг, В. Н. Флеров, *Туннельные явления в химической физике* (Москва: Наука: 1986).
3. Д. Кларк, Л. Рассел, *Молекулярная биология* (Москва: ЗАО «Компания КОНД»: 2004).
4. W. Elliott and D. C. Elliott, *Biochemistry and Molecular Biology* (Oxford: University Press: 2001).
5. В. Ф. Чехун, *Онкология*, **10**, № 4: 414 (2008).
6. М. А. Заболотный, Н. В. Башмакова, Ю. М. Барабаш, Г. И. Довбешко, Л. Н. Киркилевская, Е. П. Гнатюк, О. П. Дмитренко, М. П. Кулиш, А. И. Момот, *Тез. II Межд. Научн. конф. «Наноструктурные материалы — 2010: Беларусь–Россия–Украина» (19–22 октября 2010 г., Киев)* (Киев: ИМФ им. Г. В. Курдюмова НАН Украины: 2010), с. 677.
7. Thakral Seema and R. M. Mehta, *Pharmaceutical Sciences*, **68**, No. 1: 13 (2006).
8. P. Scharff, K. Risch, L. Carta-Abelmann, I. M. Dmytruk, M. M. Bilyi, O. A. Golub, A. V. Khavryuchenko, E. V. Buzaneva, V. L. Aksenov, M. V. Avdeev, Yu. I. Prylutskyy, and S. S. Durov, *Carbon*, **42**: 1203 (2004).
9. D. T. Cromwell, *Biochem.*, **64**: 259 (1956).