

P73

K. HÓLDERNA-NATKANIEC^a, I. NATKANIEC^{b,c}, D. NOWAK^a,
V.D. KHAVRYUTCHENKO^d i A. SZYCZEWSKI^a

^a Instytut Fizyki Uniwersytetu im Adama Mickiewicza, Umultowska 85, 61-614 Poznań, Polska

^b Zjednoczony Instytut Badań Jądrowych 141980 Dubna, Rosja

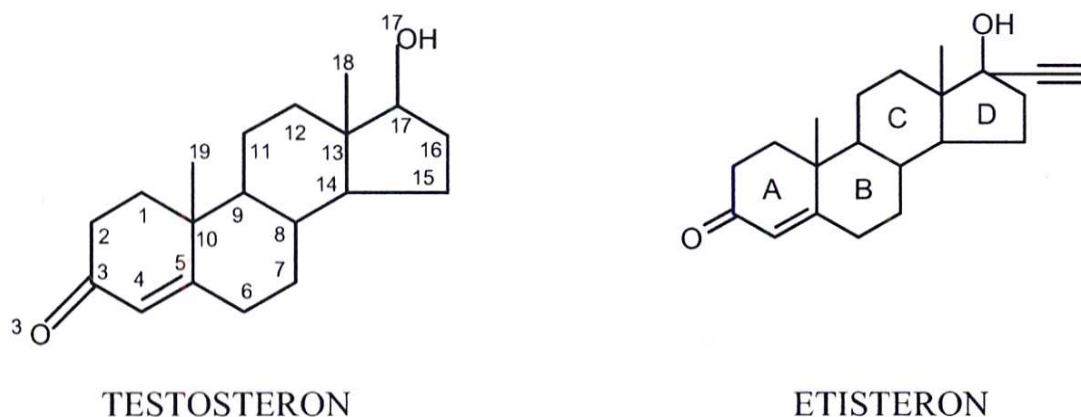
^c Instytut Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego PAN, ul. E. Radzikowskiego 152, 31-342 Kraków, Polska

^d Instytut Chemii Powierzchni, Państwowa Akademia Nauk Ukrainy, Kijów, Ukraina

Badania dynamiki molekularnej etisteronu metodami NMR i IINS

Etisteron (17 α -etynylo-17 β -hydroxy-androst-4-en-3-on) o wzorze chemicznym C₂₁H₂₈O₂ jest jednym z klasycznych pochodnych progesteronu. Jest to ważny produkt przejściowy w syntezie urologicznych i nasercowych leków spirolaktowych.

Molekuła etisteronu, jednego z wielu hormonów sterydowych, jest zbudowana z trzech węglowych pierścieni cykloheksanowych (oznaczanych dalej A, B, C) i jednego pierścienia cyklopentanowego (D). Pierścienie B i C molekuły sterydu są stabilne, podczas gdy główne zmiany konformacji pociągające za sobą zmiany właściwości biologicznych są obserwowane w pierścieniach A i D. Na rys. 1 porównano budowę szkieletu węglowego molekuły etisteronu i testosteronu. Po podstawieniu testosteronu przez grupę etynylową (C \equiv CH), następuje radykalna zmiana własności biologicznych od androgennych do progestennych, czyli do cech hormonów żeńskich. We wszystkich sterydach najważniejszą grupą krytyczną dla aktywności hormonalnej jest element enonowy znajdujący się w pierścieniu A.



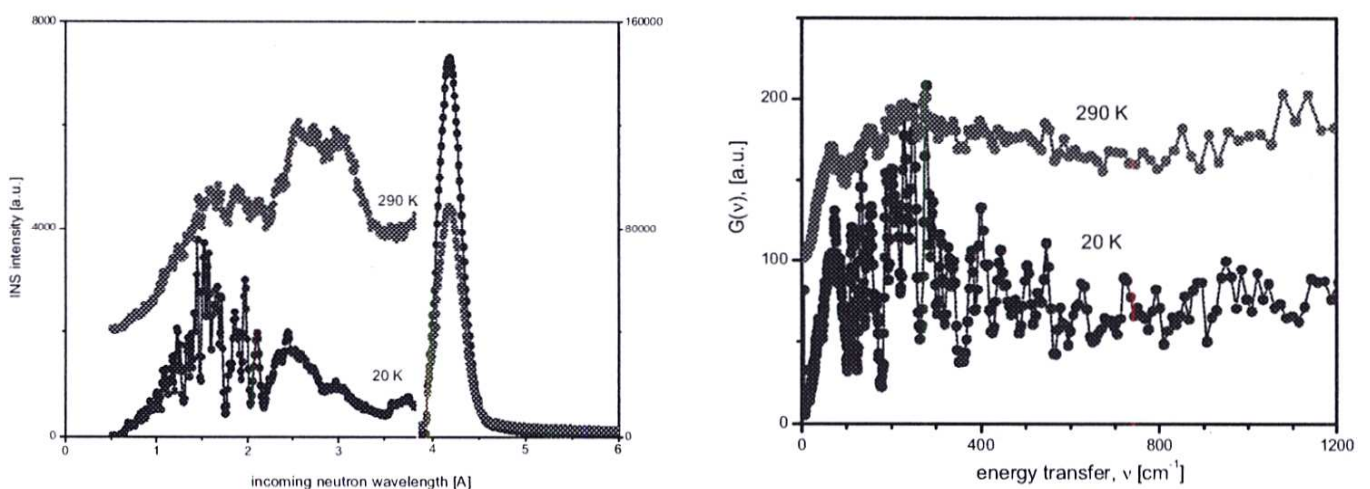
Rys. 1. Szkielet węglowy testosteronu i etisteronu wraz z przyjętymi oznaczeniami atomów węgla

Zastosowano metody spektroskopii rozpraszania neutronów i magnetycznego rezonansu jądrowego w zestawieniu z obliczeniami prowadzonymi zarówno metodami półempirycznymi, jak i funkcjonału gęstości chemii kwantowej dla zbadania dynamiki wewnętrznej protonów.

Widma niekoherentnego nieelastycznego rozpraszania neutronów (IINS) zostały zarejestrowane przy użyciu spektrometru NERA-PR, który wykorzystuje metodę czasu przelotu i jest spektrometrem o odwrotnej geometrii pracującym na impulsowym reaktorze IBR-2 w Dubnej. Spektrometr umożliwia jednoczesną rejestrację widm nieelastycznego niekoherentnego rozpraszania neutronów (IINS) oraz widm dyfrakcji neutronowej (NPD) [1].

Widmo dyfrakcyjne otrzymane w temperaturze pokojowej potwierdziło jednoskośną symetrię komórki elementarnej $P2_1$ wyznaczoną metodami dyfrakcji promieni X przez Gałdeckiego [2]. Przy chłodzeniu próbki do 20 K nie zaobserwowano zmian symetrii komórki elementarnej. Parametry komórki elementarnej w obu temperaturach są następujące: $a = 6,493$, $b = 21,065$, $c = 6,478$, (w Å) $\beta = 105,97^\circ$ w 290 K, oraz $a = 6,41$, $b = 21,09$, $c = 6,44$, $\beta = 105,9^\circ$ w 20 K.

Widma IINS, uzyskane po zsumowaniu z 16 detektorów znajdujących się pod kątami rozpraszania z zakresu od 20° do 160° , odjęciu tła i uwzględnieniu czasu eksperymentu przedstawiono w funkcji długości fali padających neutronów na rys. 2. W widmie IINS obserwuje się pik elastyczny przy długości fali padających neutronów wynoszącej 4,2 Å, a część nieelastyczną poniżej. W temperaturze pokojowej mody optyczne i akustyczne w widmie IINS są słabo oddzielone. Natomiast w 20 K mody sieciowe widoczne są w zakresie 2,2 do 3,8 Å i są dobrze odseparowane od pasm wewnętrznych wibracji leżących poniżej 2,2 Å. Odseparowanie modów sieciowych i wewnątrzcząsteczkowych świadczy o uporządkowaniu tej fazy krystalicznej.

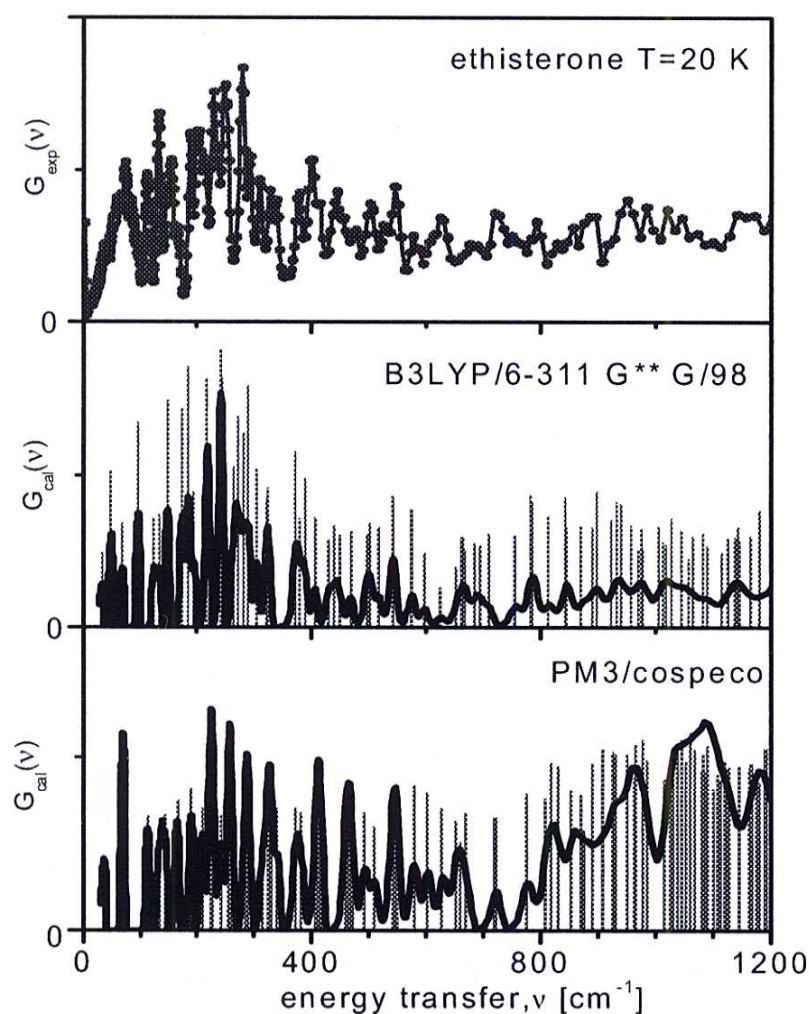


Rys. 2. Widma IINS (a) i gęstości stanów fononowych $G(v)$ (b) etisteronu w różnych temperaturach

Widma IINS zostały przetransformowane w przybliżeniu jednofonowego rozpraszania w widma gęstości stanów fononowych i przedstawione zostały na rys. 2b w zakresie transferu energii do 1200 cm^{-1} .

W widmie gęstości stanów fononowych etisteronu najbardziej intensywne pasma obserwuje się przy transferze energii leżącym w zakresie $180 - 300 \text{ cm}^{-1}$. Na intensywność pasm w tym widmie ma wpływ czynnik Debye'a Wallera, kwadrat amplitudy przemieszczeń atomów i wartość przekroju czynnego na niekoherentne rozpraszanie neutronów (który jest znacznie większy dla atomów wodoru niż dla pozostałych atomów molekuly).

Przeprowadzona optymalizacja struktury molekuly oraz obliczenia pola siłowego metodami chemii kwantowej pozwalają wyznaczyć położenie pasm drgań normalnych w widmie wibracyjnym. W konsekwencji możliwe staje się zaproponowanie opisanie każdego z modów na gruncie dynamiki molekularnej. Na rys. 3 zestawiono niskotemperaturowe widma gęstości stanów fononowych etisteronu z obliczonymi metodą funkcjonału gęstości B3LYP z bazą 6-311 G** za pomocą programu Gaussian 98 i półempiryczną PM3. Rezultaty obliczeń przeprowadzonych tymi dwoma metodami są porównywalne w zakresie transferu energii do 600 cm^{-1} , o czym świadczy wartość średniego kwadratu odchylenia częstości pasm drgań normalnych σ wynosząca odpowiednio 18 i 9.

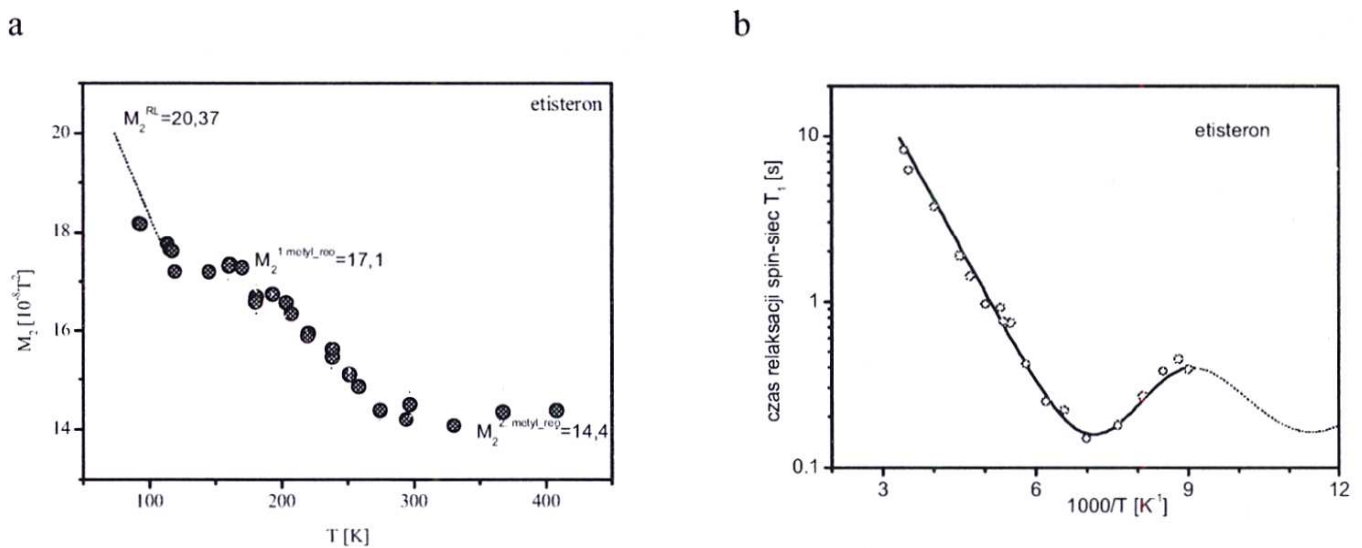


Rys. 3. Zestawienie widm gęstości stanów fononowych etisteronu w 20 K z obliczonymi metodami funkcjonału gęstości B3LYP/6-311G**

Obserwowane w zakresie $180 - 300 \text{ cm}^{-1}$ silne pasma można scharakteryzować jako torsyjne pozapłaszczyznowe mody grup metylowych. Przypisanie charakteru wibracji dla widm obliczonych metodą DFT przeprowadzono na drodze

wizualizacji modów za pomocą programu gopenmol [7]. Przy czym mod torsyjny $\chi[\text{CC}(18)\text{H}_3]$ został przewidziany na podstawie obu metod obliczeniowych przy 187 cm^{-1} , natomiast $\chi[\text{CC}(19)\text{H}_3]$ przy $251, 278, 289$ i 294 cm^{-1} . Taki rezultat zdaje się sugerować, że grupy metylowe etisteronu są nierównoważne dynamicznie.

O dynamice molekularnej protonów następującej w innej skali czasowej można wnioskować na podstawie badań prowadzonych metodami protonowego rezonansu paramagnetycznego. Wyniki temperaturowych badań drugiego momentu linii ^1H NMR i czasu relaksacji spin-sieć T_1 przedstawiono na rys. 4.



Rys. 4. Temperaturowa zależność drugiego momentu linii ^1H NMR i czasu relaksacji spin-sieć

Prezentowana (rys. 4a) temperaturowa zależność drugiego momentu linii ^1H NMR pokazuje dwa plateau o wartościach 17 i 14 Gs^2 osiągnięte odpowiednio w zakresach temperatur: (120 K, 150 K) oraz (300 K, 400 K). Dla interpretacji wyznaczonych wartości obliczono drugi moment linii przy uwzględnieniu oddziaływań dipolowych, na podstawie wzoru van Vlecka [5]:

$$M_2 = 358,081 N_0^{-1} \sum r_{jk}^{-6},$$

gdzie N_0 jest ilością protonów w molekułe, a r_{jk} ma znaczenie odległości międzyprotonowych. Struktura krystaliczna wyznaczona metodą dyfrakcji promieni X [2] podaje położenia atomów węgla i tlenu szkieletu sterydowego. Natomiast położenia atomów wodoru przyjęto uwzględniając długość wiązania C-H równą $1,09\text{ \AA}$ oraz fakt, że wiązania C-H są zorientowane tetraedrycznie do szkieletu węglowego. Taka budowa jest zgodna z otrzymaną w procesie optymalizacji, przeprowadzonej w przybliżeniu izolowanej molekule metodami chemii kwantowej. Otrzymana wartość M_2 dla struktury sztywnej wynosi $M_2^{\text{RL}} = 20,3\text{ Gs}^2$. Uruchomienie reorientacji jednej grupy metylowej z częstością większą niż szerokość linii redukuje wartość drugiego momentu do $M_2^{1\text{metyl_reo}} = 17,1\text{ Gs}^2$, podczas gdy uwzględnienie reorientacji obu grup metylowych daje wartość $M_2^{2\text{metyl_reo}} = 14,4\text{ Gs}^2$. Zmniejszanie wartości drugiego momentu linii obserwuje się, kiedy czas korelacji reorientacji odpowiedniej grupy molekularnej jest rzędu

$(M_2)^{1/2}$. Pozwala to sugerować różne wartości energii aktywacji procesu reorientacji grup metylowych etisteronu względem trójrotnej osi symetrii wiązania C-C.

Wyznaczona dotychczas metodą nasyceniową przy częstotliwości 30 MHz temperaturowa zależność czasu relaksacji spin-sieć w zakresie temperatur (300 K, 110 K) wykazuje jedno minimum (rys. 4b). Obliczona wartość minimalna czasu relaksacji 0,15 s w 140 K sugeruje relaksację jednej z dwu grup metylowych etisteronu. Przyjmując, że proces reorientacji grupy metylowej jest aktywowany termicznie zgodnie z relacją Arrheniusa, określono wysokość bariery dla reorientacji wzgl. osi trójrotnej wiązania C-CH₃ na 10,9 kJ/mol a czas $\tau_0 = 3 \cdot 10^{-13}$ s. Lokalne minimum związane z hamowaniem rotacji drugiej grupy metylowej można oczekiwać w niższych temperaturach, jak przedstawiono linią przerywaną na rys. 4b.

Temperaturowe badania dynamiki wewnętrznej etisteronu metodami ¹H NMR dowodzą różnej dynamiki każdej z grup metylowych, podstawionych do pierścienia sterydowego w położeniach C10 i C13. W tabeli 1 zestawiono wysokości barier reorientacji grup metylowych oraz położenie torsyjnych pozapłaszczyznowych modów kolejnych grup metylowych etisteronu i testosteronu [3].

Tabela 1. Zestawienie wartości energii aktywacji procesu reorientacji grup metylowych wzgl. osi C3 z położeniami poza-płaszczyznowych pasm drgań torsyjnych (wyznaczonych z widm IINS i obliczeń chemii kwantowej) w testosteronie i etisteronie

Opisanie wybranych modów w widmie IINS	Etisteron		Testosteron [3]	
	[cm ⁻¹]	Energia aktywacji [kJ/mol]	[cm ⁻¹]	Energia aktywacji [6] [kJ/mol]
χ [CC(18)H ₃]	187	<10	189	6.1±0.5
χ [CC(19)H ₃]	251 278 289 294	10.8±0.8	189 235	11.9±0.9

Zarówno molekula etisteronu, jak i testosteronu zbudowane są z takich samych czterech pierścieni węglowych z dwoma grupami metylowymi przyłączonymi do atomów węgla oznaczonych C(10) i C(13), jak przedstawia rys. 1. W sieci krystalicznej obu związków występują międzymolekularne wiązanie wodorowe typu „głowa-do-ogona” O(17)-H...O(3), a w etisteronie dodatkowo kooperacyjne wiązanie wodorowe między grupą etynylową a hydroksylową i karbonylową sąsiednich molekuł. W niskotemperaturowym widmie gęstości stanów fononowych testosteronu widoczne są torsyjne pozapłaszczyznowe mody grup metylowych χ [CC(18)H₃] i χ [CC(19)H₃] odpowiednio przy 189 oraz 189 i 235 cm⁻¹ [3]. Wykonane przez Andrew [6] temperaturowe badania czasu relaksacji spin-sieć pokazują dwa lokalne minima tej funkcji, co dowodzi różnej dynamiki molekularnej każdej z grup metylowych testosteronu (wartości energii

aktywacji reorientacji grup metylowych określono na 6,1 i 11,9 kJ/mol). Zwraca uwagę fakt, że dla grupy metylowej o niższej wartości wysokości bariery reorientacji wzgl. osi C3, w widmie G(v) pasmo scharakteryzowane jako torsyjne pozapłaszczyznowe występuje przy niższej wartości transferu energii.

Uzyskane rezultaty pokazują, że o różnej dynamice grup metylowych w badanych związkach sterydowych można wnioskować zarówno na podstawie analizy widm ^1H NMR jak i IINS.

Obliczenia zostały wykonane w PCSC w Poznaniu.

Literatura

- [1] Natkaniec I., Bragin S.I., Brankowski J. and Mayer J., *Proceedings of the ICANS XII Meeting, Abington 1993, RAL Report 94-025*, Vol. I, p. 89 – 98.
- [2]. Galdecki Z., Grochulski P., Wawrzak Z., Duax W.L., *J. Cryst. Spectros. Res.*, **19** (1969) 941.
- [3]. Szczyewski A., Holderna-Natkaniec K., Natkaniec I., *J. Mol. Struct.*, **603** (2004) 49.
- [4]. *Gaussian 98 (Revision A.7)*, M.J. Frisch, et al, Gaussian Inc., Pittsburgh PA, 1998.
- [5] van Vleck J.H., *Phys. Rev.*, **74** (1948) 1168.
- [6] Andrew E.R., Radomski J.M., *Solid State NMR*, **2** (1993) 57.
- [7] Gopenmol Program Version 2.2 (Leif Laaksonen, Center for Scientific Computing, Espoo, Finland).