

ŽARKO MITIĆ¹
MILORAD CAKIĆ²
GORAN S. NIKOLIĆ²
LJUBOMIR ILIĆ³
MIHAJLO STANKOVIĆ²

¹Odsek za farmaciju, Medicinski
fakultet Univerziteta u Nišu,
Niš, Srbija

²Tehnološki fakultet Univerziteta u
Nišu, Leskovac, Srbija

³Farmaceutsko-hemijska
industrija "Zdravlje Actavis Co.",
Leskovac, Srbija

NAUČNI RAD

UDK 543.456:547.458:661.12

DOI: 10.2298/HEMIND1001009M

SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA BIOAKTIVNIH Cu(II) KOMPLEKSA SA POLISAHARIDIMA SAVREMENOM FTIR MIKROSPEKTROSKOPIJOM

Ispitivanja bioaktivnih kompleksa bakra su od farmaceutskog interesa sa aspekta njihove primene u terapiji hipohromne mikrocitne anemije i hipokupremije. Struktura bioaktivnih kompleksa bakra sa oligosaharidima još uvek nije u potpunosti razjašnjena. Razvoju i farmaceutskoj primeni kompleksnih jedinjenja umnogome doprinosi stalno proučavanje uzajamnog odnosa hemijske strukture i farmakobiološke aktivnosti. U radu su spektroskopski okarakterisani bioaktivni kompleksi bakra sa oligosaharidima dekstrana i pululana i njihovim redukovanim derivatima, različitih molar-
nih masa. Karakterizacija kompleksa vršena je savremenim IR spektroskopskim tehnikama: RT-FTIR, LNT-FTIR, D₂O-FTIR, ATR-FTIR i FTIR mikrospektroskopijom. Rezultati FTIR mikrospektroskopskih ispitivanja pokazali su da konstitucija i konformacija liganda, stepen kristaličnosti, stepen polimerizacije, stepen polidisperznosti i linearnost makromolekula znatno utiču na sadržaj vezanog bakra i strukturnu formu kompleksa. Zaključeno je da od ovih faktora u velikoj meri zavisi i sama stabilnost dobijenih kompleksa, kao i njihov farmakobiološki učinak. Na osnovu rezultata IR ispitivanja data je potvrda predloženih struktura sintetisanih kompleksa bakra sa polisaharidima.

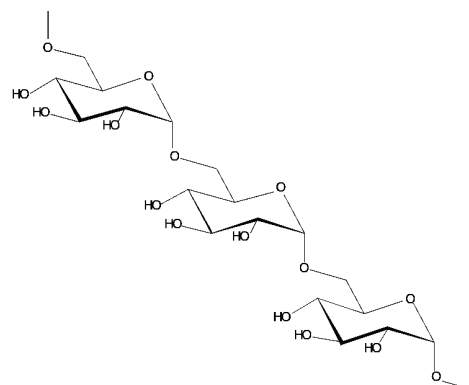
Proučavanje interakcije između polisaharida, kao potencijalnih liganada, sa jonima biometala ima značaja zbog postojanja takvih interakcija u biološkim sistemima [1]. Sintetisana su, izolovana i okarakterisana različita jedinjenja saharida sa Ti(IV) [2], VO(II) [3], Cr(III) [4], Mn(II) [5], Fe(III) [6,7], Zn(II) [8], Cu(II) [9], Co(II) [10] i drugim jonima prelaznih metala prve serije.

Dekstran je homopolisaharid koji se može dobiti mikrobiološkom sintezom, i predstavlja molekularni lanac D-glukopiranoznih jedinica povezanih uglavnom α -(1→6) O-glikozidnim vezama. U makromolekulima dekstrana, osim α -(1→6) veza, prisutan je različit sadržaj α -(1→2), α -(1→3) ili α -(1→4) O-glikozidnih veza (slika 1).

Dekstran pripada klasi veoma fleksibilnih polimera, i u rastvoru se ponaša kao spirala koja se širi [11]. Kako fazno stanje i struktura polisaharida u značajnoj meri određuju fizičko-hemijska svojstva i utiču na ishod hemijske reakcije, koja se odvija u heterogenoj sredini, veoma je bitno ustanoviti tip konformacije polisaharida. Dekstran poseduje višestruki potencijal za intramolekulske vodonične veze unutar kristala [12,13]. Reaktivnost dekstrana prvenstveno zavisi od reaktivnosti i orijentacije sekundarnih hidroksidnih grupa (OH-2, OH-3 i OH-4).

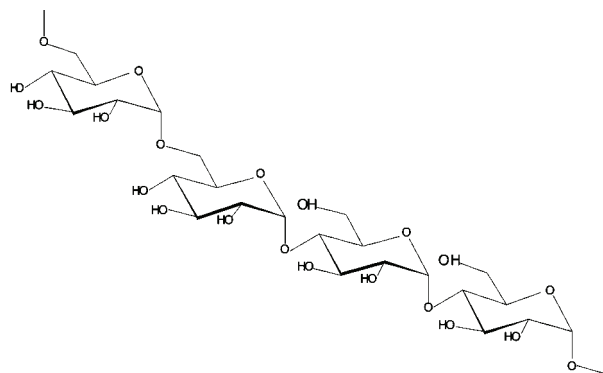
Po svom sastavu, strukturi i tipu glikozidne veze, dekstranu je veoma sličan amorfni vodorastvorni linearni polisaharid pululan. Na osnovu rezultata analize strukture, pululan se često opisuje kao polimer α -(1→6)

povezane maltotrioze (slika 2), što čini njegovu dominantnu primarnu strukturu [14].



Slika 1. Struktura polisaharida dekstrana sa α -(1→6) glikozidnim vezama u osnovnom lancu.

Figure 1. Structure of polysaccharide dextran with α -(1→6) glycosidic linkages in main chain.



Slika 2. Primarna struktura polisaharida pululana, α -(1→6) povezanog polimera dominantnog maltotrioznog sastava.

Figure 2. The primary structure of polysaccharide pullulan with α -(1→6) repeating maltotriose units.

Autor za prepisku: Ž. Mitić, Odsek za farmaciju, Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu, Bulevar dr Zorana Đinđića 81, 18000 Niš, Srbija.
E-pošta: zak_chem2001@yahoo.com
Rad primljen: 3. jul 2009.
Rad prihvaćen: 16. novembar 2009.

Mnogobrojnim ispitivanjima je utvrđeno da pululan sadrži i tetrozne supstituente, kao dodate dominantnim maltotrioznim supstituentima. Učestalost maltotetroznih supstutienata zavisi od specifičnosti korišćenog soja i kreće se od 1 do 7% ukupnih ostataka. U molekulu pululana maltotetroze su raspoređene nasumično duž molekula [15]. Nasuprot maltotrioznim supstituentima, maltotetrozni ostaci u pululanu čine sekundarnu strukturu (slika 3).

FTIR spektroskopske tehnike se dosta primenjuju u strukturnoj analizi polisaharida. FTIR spektroskopija otvara nove mogućnosti za strukturnu analizu polisaharida i njihovih derivata, kao i uspostavljanje tipa veze između osnovnih jedinica i njihovih rotacionih izomera. Slabe intermolekulske interakcije imaju znatan uticaj na neka vrlo značajna svojstva bioloških molekula i polimera [16–18]. Konformacija glukopiranoznog prstena pokazuje bitan uticaj na IR spektre u oblasti od 1000 do 700 cm^{-1} , zato što je taj spektralni interval osetljiv na izmenu uzajamnog rasporeda C–H grupa u elementarnom prstenu polisaharida i može se iskoristiti za istraživanje konformacionih prelaza d-glukopiranoznih prstenova u polisaharidu. Izotopska izmena vodonikovih atoma deuterijumom kombinovana sa FTIR spektroskopijom ima značajnu ulogu u određivanju strukture polisaharida. Metodom IR spektroskopije uz primenu deuteriranja uzoraka, može se odrediti i stepen kristaličnosti polisaharida.

Nastavljajući istraživanja na polju primene ove grupe kompleksa, ispitivana su koordinaciona jedinjenja bakra sa polisaharidima dekstranom i pululanom i njihovim redukovanim derivatima, srednje molarne mase $M_w = 5000\text{--}6000$ g/mol. Karakterizacija sintetisanih kompleksa vršena je savremenim spektroskopskim tehnikama RT-, LNT-, D_2O -, ATR-FTIR spektroskopijom i FTIR mikroskopijom. U radu su analizirani dekonvolucioni IR spektri kompleksa dekstrana i pululana sa

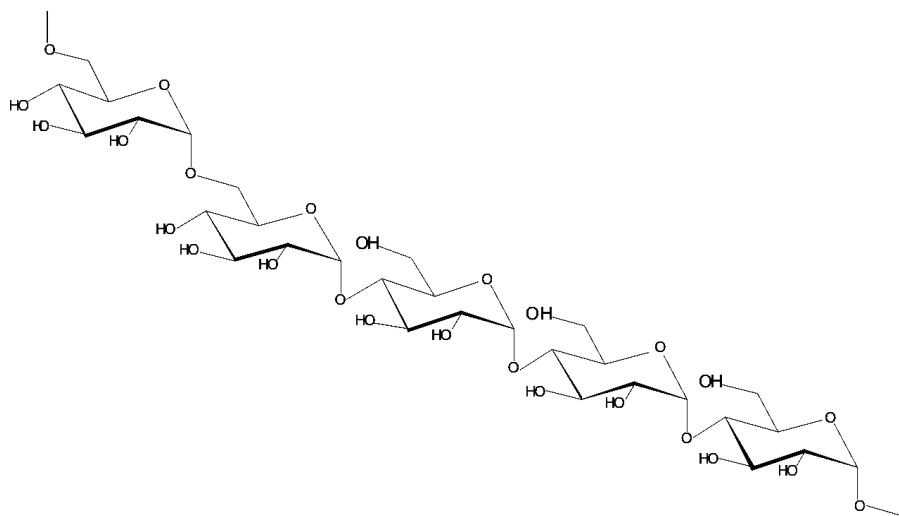
bakrom radi identifikacije spektralnih markera koji bi mogli biti korišćeni u karakterizaciji strukturnih razlika ovih kompleksa. Sa velikom pažnjom su proučavane trake u oblasti IR spektra od 1250–900 cm^{-1} zato što je raspored traka, od skeletnih vibracija, u ovoj spektralnoj oblasti jedinstven za svaki polisaharid [19].

EKSPERIMENTALNI DEO

Sintezu kompleksnih jedinjenja Cu(II) jona sa redukovanim niskomolarnim dekstranom (RNMD) detaljno su opisali Mitić i saradnici [20], dok su sintezu kompleksnih jedinjenja Cu(II) jona sa redukovanim niskomolarnim pululanom (RNMP) detaljno opisali Nikolić i saradnici [21].

FTIR spektroskopija

IR spektri čvrstih uzoraka snimani su metodom presovanja supstance sa kristalnim KBr u pastilu. IR spektri čvrstih uzoraka snimani su na FTIR spektrometru BOMEM MB-100 (Hartmann&Braun, Canada), koji je opremljen standardnim DTGS/KBr detektorom, u oblasti talasnih brojeva od 4000–400 cm^{-1} i pri rezoluciji 2 cm^{-1} . Za LNT-FTIR snimanja korišćena je ćelija Graseby Specac P/N 21525 sa promenljivom temperaturom. Čvrsti uzorci sintetisanih kompleksa biometala Cu sa polisaharidima neposredno pre pripremanja KBr pastile, za FTIR karakterizaciju, deuterirani su 2 h na sobnoj temperaturi u vakuumu. Metoda izotopske izmene sa D_2O je veoma osetljiva za ispitivanje koordinacije HOH molekula i povezana je sa jačinom vodonične veze. U oblasti 4000–400 cm^{-1} , svim spektrima je bazna linija korigovana i područje je normalizovano. Fourier-ova dekonvolucija utemeljena na Griffiths/Pariante metodi je bila primenjena radi povećanja rezolucije u ovoj spektralnoj oblasti. Dekonvolucionirani spektri su bili poravnani na 30 tačaka prema Savitzky/Golay



Slika 3. Sekundarna struktura polisaharida pululana, α -(1→6) povezanog polimera maltotetroznog sastava.
Figure 3. The secondary structure of polysaccharide pullulan with α -(1→6) repeating maltotetraose units.

filter metodi. Kompjuterska obrada snimljenih IR spektara vršena je softverskom primenom Win-Bomem Easy™ 3.01C Level II (Copyright © 1991–1994, Galactic Industries Corporation) pod Windows XP OS podrškom.

ATR-FTIR spektroskopija i FTIR mikroskopija

ATR-FTIR spektri čvrstih uzoraka snimani su neposredno na IR sistemu za mikrospektroskopiju, ATR-FTIR spektrometar Bruker Tensor-27 povezanim sa FTIR Bruker Hyperion-1000/2000 mikroskopom sa 15× objektivom i 250- μ m MCT detektorom koji je hlađen tečnim N₂ (ATR objective GMBH, Germany), u oblasti talasnih brojeva od 4000 do 400 cm⁻¹. Spektri su snimani u refleksionom modu 320 skeniranja sa rezolucijom 4 cm⁻¹. U oblasti od 4000–400 cm⁻¹, svim spektrima je bazna linija interaktivno polinomialno korigovana, a područje je normalizovano. Kubelka/Munk aritmetička metoda je bila primenjena za povećanje rezolucije u ovoj spektralnoj oblasti. Dekonvolucionirani spektri su bili poravnani na 40 tačaka prema Fourier-ovoj filter metodi. Kompjuterska obrada snimljenih ATR-FTIR spektara i FTIR mikroskopskih slika vršena je softverskom primenom Bruker Hyperion™ (Copyright © 2007, Bruker) pod Windows XP OS podrškom.

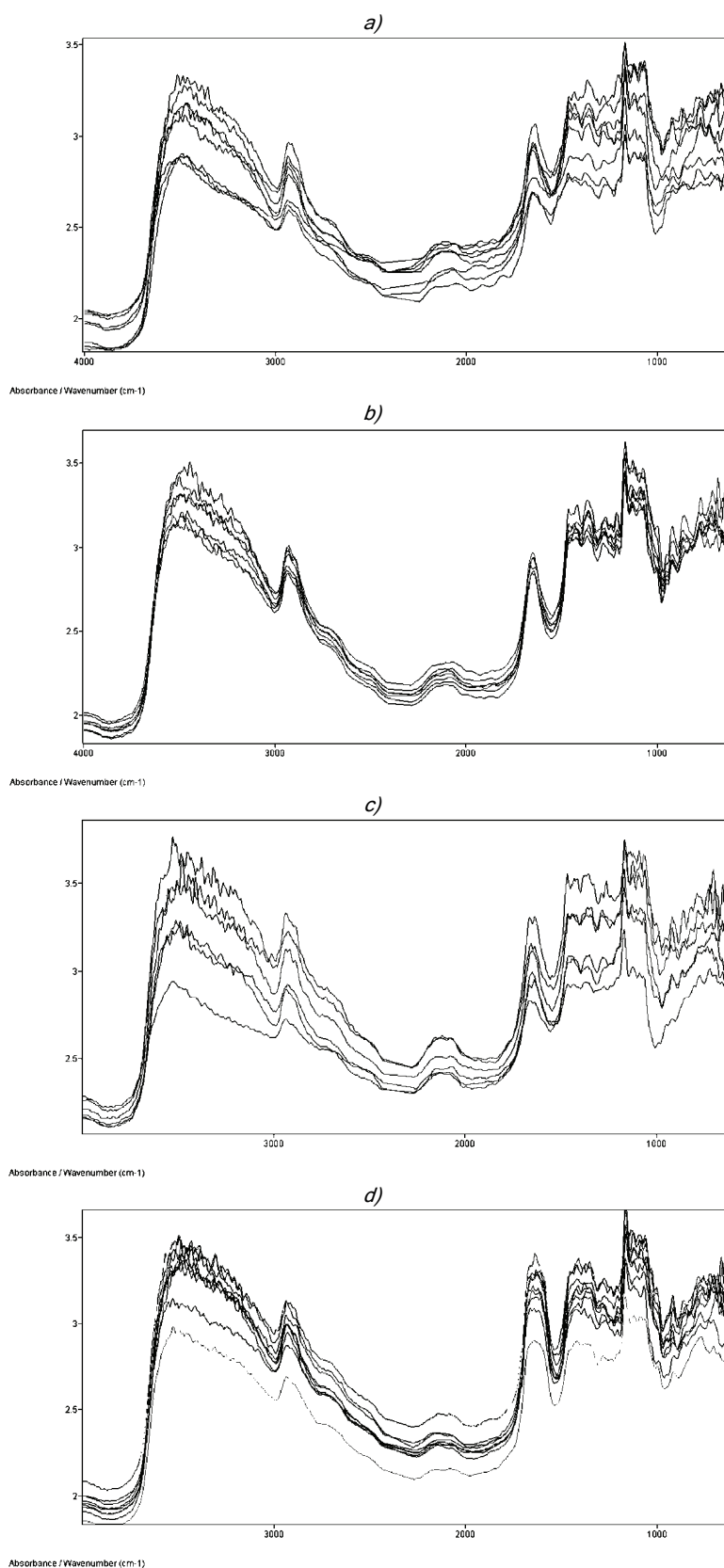
REZULTATI I DISKUSIJA

Na oko 3400 cm⁻¹ u IR spektrima Cu(II) kompleksa dekstrana (slika 4) i pululana (slika 5), nalazi se široka, kompleksna traka, koja je rezultat valentnih vibracija OH grupa koje učestvuju u formiranju različitih po jačini vodoničnih veza, kao i valentnih vibracija OH grupa molekula konstitucione vode. Manje intenzivne trake u oblasti 2980–2800 cm⁻¹ potiču od valentnih vibracija metinskih (CH) i metilenskih (CH₂) grupa. Karakteristična IR traka na oko 1640 cm⁻¹ od δ (HOH) u spektrima ispitivanih kompleksa kao i u IR spektru RNMP i RNMD, ukazuje na prisustvo vode u strukturi kompleksa [22,23]. Relativno jasna ali i kompleksna traka u oblasti 1500–1300 cm⁻¹ povezana je s jedne strane, sa deformacionim u ravni vibracijama CH₂ grupa iz bočne CH₂OH grupe [16–19]. Ranije je bilo pokazano da su u spektrima polisaharida frekvencije deformacionih vibracija metilenskih grupa veoma osetljive na strukturne promene, pa ih treba pripisati samo pululanskim CH₂ grupama u delu određenih električnih polja koja okružuju strukturne elemente, a ne svim CH₂ grupama. Sa druge strane, u istoj IR oblasti nalaze se i deformacione vibracije C–O–H grupa iz CH₂OH. Jake trake u oblasti 1200–1000 cm⁻¹ uslovljene su valentnim vibracijama C–O grupa, kako skeletnih tako i glikozidnih.

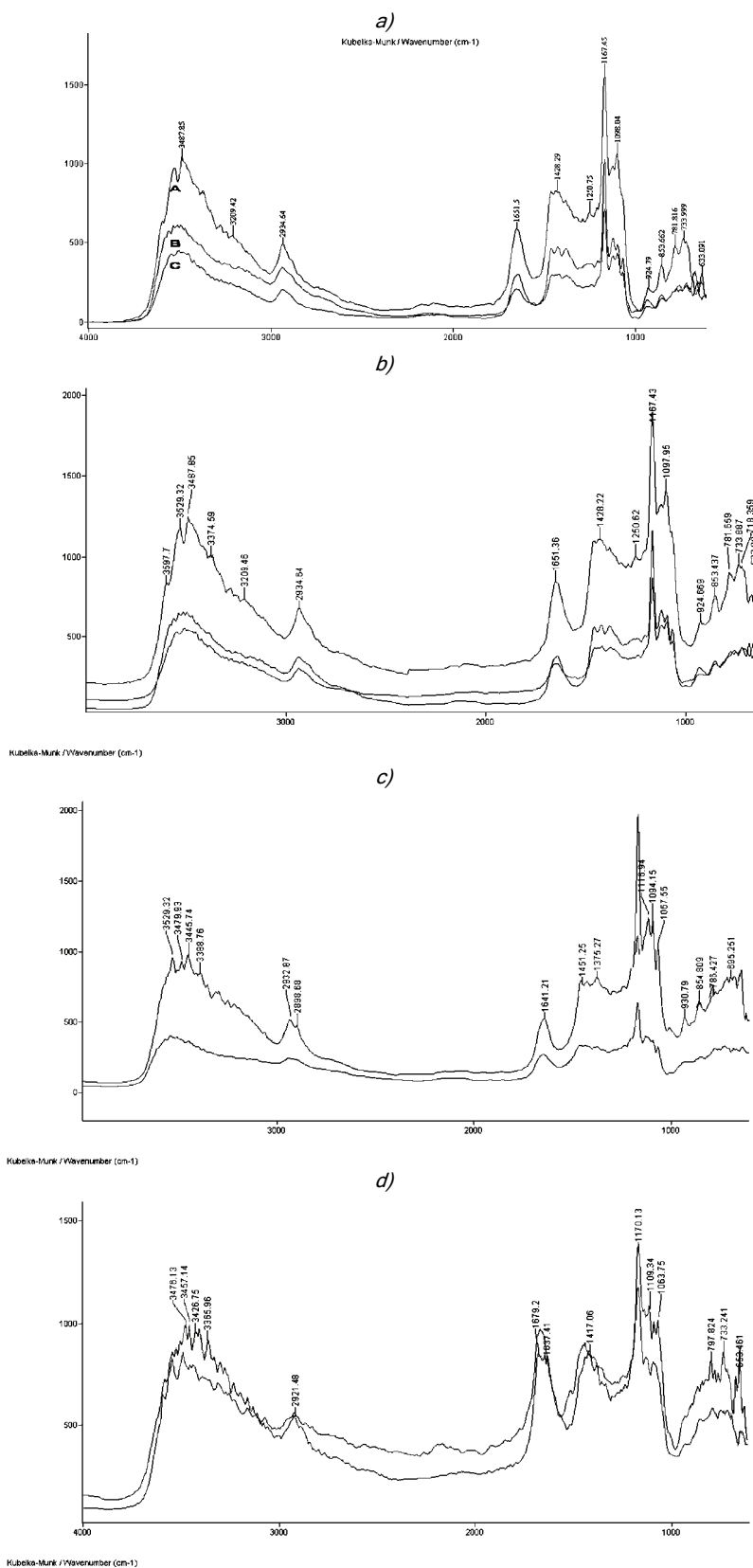
U oblasti od 1175 do 975 cm⁻¹ IR spektri kompleksa Cu(II) jona sa pululanom i dekstranom se sastoje od velikog broja preklapljenih traka (slike 4 i 5). Pove-

ćanje rezolucije korišćenjem Fourier-ove samodekonvolucije dozvoljava jasnije razdvajanje ovih traka. Glavne trake u dekonvolucioniranim IR spektrima kompleksa pululana i dekstrana javljaju se na oko 1155, 1107, 1080, 1020 i 1000 cm⁻¹ koje se mogu pripisati valentnim vibracijama C–O i C–C veza kao i deformacionim vibracijama CCH, COH i HCO veza [24]. Traka na oko 1150 cm⁻¹ je u ranijim radovima bila pripisivana valentnim vibracijama C–O–C veze i vibracijama glikozidnog mosta [19]. Međutim, Bose i saradnici [25] predložili su da ovu traku na 1150 cm⁻¹ treba pripisivati egzocikličnoj C–O valentnoj vibraciji. Nikonenko i saradnici [26] pokazali su da bi nekoliko traka u oblasti od 1175 do 1140 cm⁻¹ trebalo razmotriti kao manifestaciju prisustva glikozidne veze.

Širok pik na 1107 cm⁻¹ trebalo bi najverovatnije pripisati vibracijama C–O veze na C–4 položaju glukopiranozne jedinice, dok složena vibracija koja uključuje kuplovanje valentne vibracije C–6–O–6 veze sa deformacionim vibracijama C–4–C–5 veze, rezultira pojavom trake na oko 1080 cm⁻¹ [27,28]. Traka na oko 1080 cm⁻¹ u spektrima kompleksa dekstrana je manje izražena nego u IR spektrima kompleksa pululana (slike 4 i 5). Glavna razlika u strukturi polisaharida dekstrana i pululana je tip glikozidne veze, tj. prisustvo samo α -(1→6) veze kod dekstrana i α -(1→4) i α -(1→6) u odnosu od 2:1 kod pululana; zato je važno pretpostaviti koja traka je IR osetljiva na takvu strukturnu razliku. U makromolekulu pululana prisutan je veliki broj primarnih CH₂–OH grupa na C–6 položaju glukopiranozne jedinice, pa je intenzivna traka na 1080 cm⁻¹ posmatrana u tom kontekstu (slika 5). Kada je u pitanju polisaharid dekstran, svi C–6 atomi imaju uдела u formiranju C–6–O–C–1 glikozidne veze; kao posledica toga intenzitet trake na oko 1080 cm⁻¹ kod dekstrana je redukovano u odnosu na pululan (slika 4). S druge strane, u spektrima Cu(II)-RNMP kompleksa koji su sintetisani na različitim pH, traka na 1080 cm⁻¹ nešto je slabijeg intenziteta, nego u spektrima liganda RNMP. Kada je reč o Cu(II)-pululanskim kompleksima, deo C-6 atoma učestvuje u formiranju C–6–O–Cu(II) veze; kao posledica, intenzitet trake na 1080 cm⁻¹ za Cu(II)-RNMP komplekse je više redukovano u odnosu na ligand RNMP. Traka na 1080 cm⁻¹ u FTIR spektru RNMP je označena kao antisimetrična valentna vibracija C–6–O–C–1 veze glikozidnog mosta. Ovi rezultati sugerišu da traka na oko 1080 cm⁻¹ za Cu(II)-RNMP komplekse može biti razmotrena kao karakteristična za tip glikozidne veze, kao i za vezu tipa ligand–metal [C–6–O–Cu(II)] [24,29]. Trake na oko 1047 i 1022 cm⁻¹, koje su detektovane u IR spektrima kompleksa polisaharida dekstrana i pululana, u IR spektrima skroba bile su opisane kao karakteristične za odnos kristalnog i amorfno oblika [30,31]. Promene u intenzitetu ovih traka snažno su povezane s



Slika 4. ATR-FTIR spektri Cu(II)–RNMD kompleksa koji su sintetisani na temperaturi ključanja i pH 7,5 (a), pH 8,0 (b), pH 10,0 (c) i pH 12,0 (d).
 Figure 4. ATR-FTIR spectra of Cu(II)–RLMD complexes synthesized on boiling point and: pH 7.5 (a), pH 8.0 (b), pH 10.0 (c) and pH 12.0 (d).



Slika 5. ATR-FTIR spektri Cu(II)-RNMP kompleksa koji su sintetisani na temperaturi. ključanja i pH 7,5 (a), pH 8,0 (b), pH 10,0 (c) i pH 12,0 (d).

Figure 5. ATR-FTIR spectra of Cu(II)-RLMP complexes synthesized on boiling point and pH 7.5 (a), pH 8.0 (b), pH 10.0 (c) and pH 12.0 (d).

promenama u makromolekulskom uređenju [32,33]. Zbog postojanja α -(1 $\rightarrow$ 6) glikozidnih veza, kao i velike fleksibilnosti u molekulima pululana i dekstrana, u literaturi se navodi [34] da u molekulu skroba postoji veća strukturna organizacija. Trake na oko 1043 i 1020 cm^{-1} u spektrima kompleksa dekstrana i pululana najverovatnije su odgovorne za više i manje uređenu strukturu. Otkriće da se traka na 1040 cm^{-1} u spektrima dekstrana u prisustvu alkalnih halogenida (npr. KCl) razdvaja na dve komponente oko 1030 i 1050 cm^{-1} [16–18], potvrđuje visoku osetljivost ove trake prema konformacionim prelazima u molekulu polisaharida. Traka koja se u IR spektrima kompleksa pululana javlja na 1024 cm^{-1} , u IR spektrima kompleksa dekstrana se javlja na 1018 cm^{-1} , u poređenju s pululanom, odvojena je od trake na oko 1043 cm^{-1} jasno istaknutim prevojem na oko 1035 cm^{-1} (slike 4 i 5). Druga zanimljiva traka je na 996 cm^{-1} , pronađena u spektru pululana nakon dekonvolucije kao visokofrekventni prevoj trake na 1024 cm^{-1} , koja izostaje u spektrima kompleksa dekstrana. Traka na 994 cm^{-1} pripisana je C–O–H deformacionoj vibraciji na C-6 poziciji, kod amiloze ukazuje na jačinu međulančane interakcije vodoničnom vezom [33]. Primarne OH grupe u α -(1 $\rightarrow$ 4) povezanim glukopiranoznim jedinicama pululana formiraju vodonične veze, slično kao kod amiloze [35,36]. Promena intenziteta trake na 996 cm^{-1} u spektrima pululana može ukazati na stepen polimerizacije.

Poseban interes u IR oblasti za strukturna ispitivanja polisaharida je u intervalu od 1000–700 cm^{-1} . Spektri kristalnih modifikacija dekstrana i pululana razlikuju se jedni od drugih, kao i od spektara amorfne modifikacije. U spektrima RNMP, RNMD i njihovih Cu(II) kompleksa, trake zanemarljivog intenziteta su nađene u oblasti 950, 916, 860 i 760 cm^{-1} . Prema analizi normalnih koordinata primenjenoj na RNMP i RNMD modelu, ove trake su interpretirane kao kombinovane CCH deformacione vibracije kuplovane sa CCO, OCO, i COC vibracijama [37]. Broj i frekvencija traka u ovoj oblasti IR spektra zavise od konformacije glukopiranozne jedinice. Poznato je da glukopiranozna jedinica može imati šest različitih konformacija (1C, C1, 1B, B1, 3B i B3) [16–18]. Analizom niskofrekventnog dela FTIR spektra Cu(II) kompleksa RNMP i RNMD (slike 4 i 5), u kojoj se registruju γ (C–H) vibracije, prisustvom traka na oko 915 i 845 cm^{-1} može se utvrditi C1 konformacija glukopiranozne jedinice. Ovo je direktna potvrda da kompleksiranje ne dovodi do promena C1 konformacije glukopiranozne jedinice. U saglasnosti sa ovim je i promena intenziteta IR traka u oblasti oko 1350 cm^{-1} koja potiče od δ (C–H) i δ (O–H) vibracija. Trake ispod 900 cm^{-1} potiču od deformacionih vibracija metilenskih grupa van ravni CH veza kao i od samog piranoznog prstena. U oblasti 700–400 cm^{-1} izražene su deformacione vibracije van ravni od OH grupa. U IR spektrima pululanskih kompleksa može se uočiti traka na 900 cm^{-1}

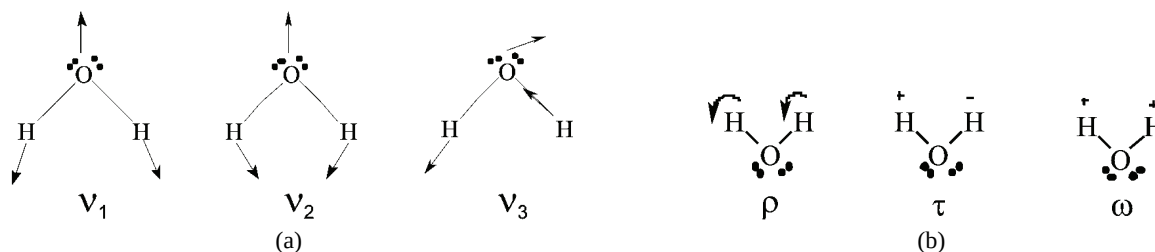
(uslovljena prisustvom α -(1 $\rightarrow$ 6) veza) i traka na 925 cm^{-1} (uslovljena prisustvom α -(1 $\rightarrow$ 4) veza). Meranjem intenziteta trake na 900 cm^{-1} može se odrediti sadržaj ovog tipa veze kod različitih preparata. U IR spektrima dekstranskih kompleksa može se uočiti različit intenzitet trake od γ (C–H) na 794 cm^{-1} (uslovljen prisustvom α -(1 $\rightarrow$ 3) veza u makromolekulu dekstrana). Meranje intenziteta traka pri 794 cm^{-1} može biti korišćeno za određivanje sadržaja tog tipa veze kod različitih preparata dekstrana [16–18].

Kako je napred navedeno, RNMD u svojoj strukturi sadrži i molekule vode, što dokazuje postojanje trake na oko 1640 cm^{-1} čiji se intenzitet ne smanjuje sušenjem uzorka na temperaturama višim od 120 °C. Opšte je prihvaćeno da se trake od δ (H–O–H) vibracija u IR spektrima kristalne vode, javljaju na nešto višim frekvencijama (>1600 cm^{-1}) što je slučaj u IR spektru RNMD, u odnosu na slobodnu vodu (<1600 cm^{-1}), kao što pokazuju i rezultati NCT analize. Neki izuzeci od ovog pravila ipak postoje i detaljno su ih objasnili Šoptrajanov i saradnici [22–23].

Za razliku od RNMD, sintetisani kompleksi sa Cu(II) jonom mogu da pored ovakvog tipa vode sadrže i molekule vode koji su koordinirani na centralni metalni jon, dopunjujući njegovu prvu koordinacionu sferu [24,29,38]. U takvom slučaju, teško je na osnovu izgleda spektra u oblasti ν (OH) i δ (HOH) vibracija razlikovati kristalnu i koordinativno vezanu vodu. Razlika je moguća na osnovu činjenice da koordinirani molekuli vode imaju tzv. libracije (sprečene rotacije) u niskofrekventnoj oblasti IR spektra, čiji broj i intenzitet traka zavisi od broja koordiniranih molekula H₂O i njihove simetrije. Na slici 6a prikazane su normalne vibracije u molekulu H₂O. Velicione vibracije ν_1 i ν_2 kod vode u gasovitom stanju su IR aktivne ($\nu_1 = 3657 \text{ cm}^{-1}$; $\nu_3 = 3756 \text{ cm}^{-1}$), dok je ν_2 deformaciona vibracija $\nu_2 = 1595 \text{ cm}^{-1}$.

Kod supstanci koje sadrže kristalnu vodu, pored tri normalne vibracije vode (dve valentne i jedna deformaciona), u niskofrekventnom delu spektra treba očekivati i pojavu traka od libracija molekula H₂O (slika 6b). Obično se javljaju dve ovakve trake jedna između 1000 i 600 cm^{-1} , a druga između 600 i 400 cm^{-1} . Slobodan molekul vode pripada simetrijskoj grupi tačke C_{2v} , dok je u sintetisanom kompleksu Cu(II) jona veoma niske simetrije i pripada simetrijskoj grupi tačke C_s . Na osnovu raspoloživih podataka, moguće je izvesti analizu primenom teorije grupa.

Ukoliko je pretpostavljena struktura sa dva molekula H₂O verovatna, kod ovog tipa kompleksa [31,36], trebalo bi očekivati trake od vibracija svih tipova molekula vode, ali i od libracija koje se očekuju u niskofrekventnoj oblasti IR spektra (<1000 cm^{-1}). Ukoliko je niska simetrija koordiniranih molekula vode moguće su tri libracije (ω – wagging, ρ – rocking, τ – twisting; slika

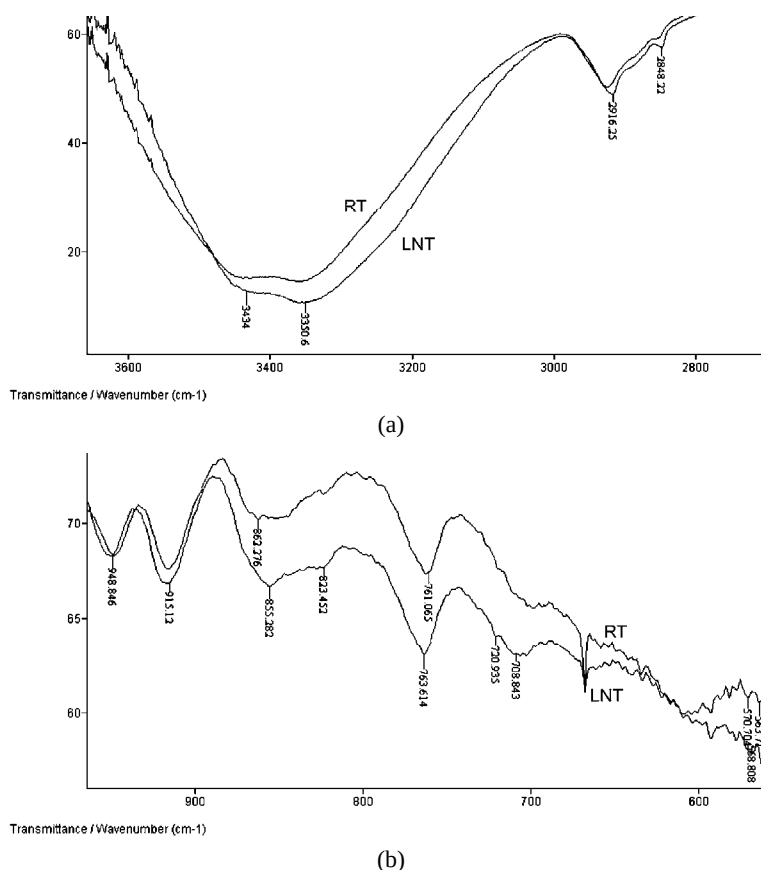


Slika 6. Moguće normalne vibracije (a) i libracije (b) uglovnog molekula H_2O .
Figure 6. Normal vibrations (a) and librations (b) of angular water molecule.

6b). Kod kompleksa sa pretpostavljenom strukturom bez molekula vode [24,29], u prvoj koordinacionoj sferi Cu(II) jona učestvuju dve OH grupe, pa su trake od vibracija molekula vode odsutne. Imajući u vidu činjenicu da su trake od libracija molekula vode slabijeg intenziteta, njihovo lociranje u FTIR spektru se može izvršiti primenom metode izotopske izmene (npr. deuteriranjem) ili efektom sniženja temperature (low nitrogen temperature) [31,36].

Na slici 7b prikazana je oblast libracija molekula vode u FTIR spektru Cu(II)–RNMD kompleksa koji je sintetisan u slabo alkalnoj sredini (pH 7,5). Poređenjem

spektara na sobnoj temperaturi (RT) i niskotemperaturnih (LNT) spektara, vidi se da sniženje temperature izaziva jasno povećanje intenziteta i promenu frekvencija ka višim vrednostima (plavo pomeranje traka na 855, 823, 763, 720, 708 i 570 cm^{-1}). Prema ovom kriterijumu, ove trake mogu biti rezultat $\gamma(OH)$ vibracija ili libracija koordiniranih molekula vode. Pojava većeg broja traka od libracija molekula vode ukazuje na prisustvo najmanje dva kristalografski različita tipa molekula vode u strukturi Cu(II)–RNMD kompleksa sintetisanog u slabo alkalnoj sredini.



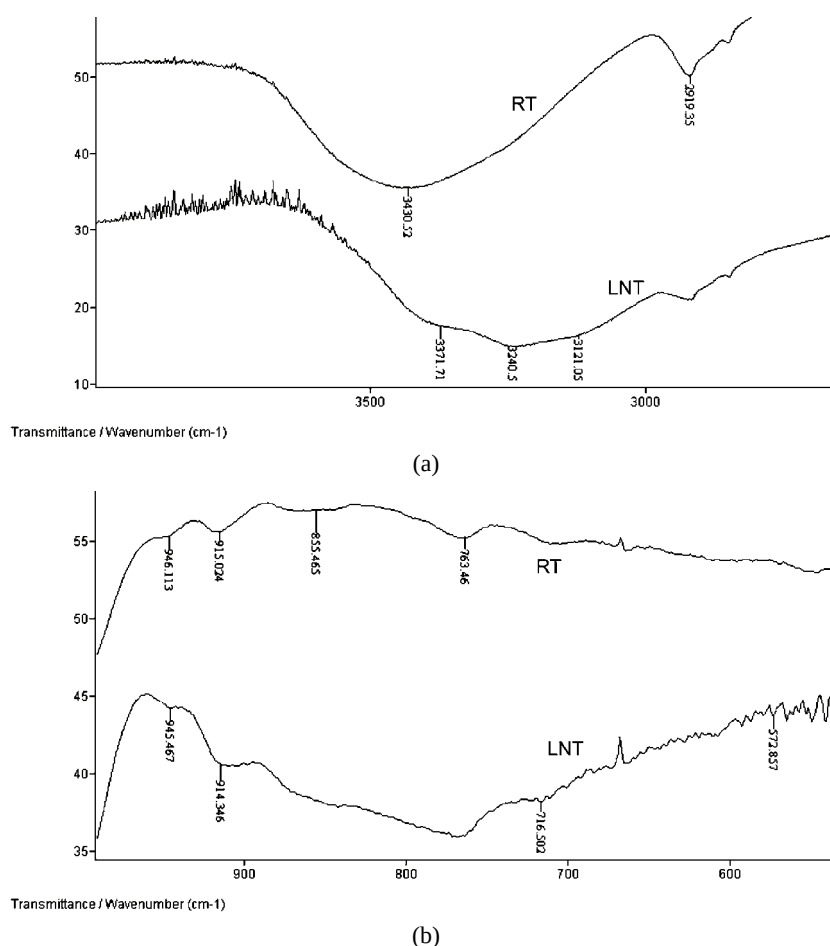
Slika 7. FTIR spektri u oblasti valencionih OH vibracija ($3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$) (a) i u oblasti libracija molekula vode ($850\text{--}500\text{ cm}^{-1}$) (b) Cu(II)–RNMD kompleksa koji je sintetisan u slabo alkalnoj sredini (pH 7,5); RT – na sobnoj temperaturi (298 K), LNT – niskotemperaturni (77 K).

Figure 7. FTIR spectra in the region of valent OH vibrations ($3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$) (a), and the region of water molecule librations ($850\text{--}500\text{ cm}^{-1}$) (b) of Cu(II)–RLMD complex was synthesized in weak alkaline solution (pH 7,5); RT – room temperature (298 K), LNT – low nitrogen temperature (77 K).

Kod kompleksa koji je sintetisan u jako baznoj sredini (pH 12), izgled FTIR spektra koji je snimljen na RT i LNT (slika 8b) u oblasti $\gamma(\text{OH})$ i libracija molekula vode je nešto drugačiji u odnosu na FTIR spektre sa slike 7b. Na gore pomenutim frekvencijama 855, 823, 720, 708 i 570 cm^{-1} , u LNT-FTIR spektru ne postoje trake koje su osetljive na sniženje temperature s jedne strane, a s druge strane intenzitet trake na 763 cm^{-1} znatno je manji u spektru ovog uzorka, pa se može zaključiti da njen sumarni intenzitet kod ovog kompleksa potiče od $\gamma(\text{CH})$ i $\gamma(\text{OH})$ vibracija, što je saglasno pretpostavljenoj strukturi bez molekula vode. S obzirom da su ovi Cu(II)-RNMD kompleksi sintetisani u jako alkalnoj sredini (pH 12), verovatno su molekuli vode zamenjeni OH^- jonima iz rastvora, tako da su sada u prvoj koordinacionoj sferi Cu(II) jona dve OH grupe iz rastvora [24,29]. Gore navedene trake ($855, 823, 720, 708\text{ i }570\text{ cm}^{-1}$), kod kompleksa koji je sintetisan na pH 7,5, trebalo bi pripisati libracijama molekula H_2O , a pojava većeg broja traka od libracija ukazuje na prisustvo najmanje dva kri-

stalografski različita tipa molekula H_2O , sa nižom simetrijom od C_{2v} .

Razlike u FTIR spektrima sintetisanih kompleksa Cu(II) jona u slabo baznoj (pH 7,5) i baznijoj sredini (pH 12), mogu se uočiti i u oblasti valentnih $\nu(\text{OH})$ vibracija ($3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$). Kod kompleksa Cu(II)-RNMD koji je sintetisan na pH 7,5, u oblasti $\nu(\text{OH})$ vibracija, spektra koji je prikazan na slici 7a, na RT registrovane dve trake na $3430\text{ i }3355\text{ cm}^{-1}$, koje su osetljive na sniženje temperature i potiču od valentnih vibracija OH grupa molekula vode, ali u sumarnom intenzitetu ove trake imaju udela i $\nu(\text{OH})$ vibracije OH grupa. Sniženjem temperature, uz nepromenjenu frekvenciju, intenzitet niskofrekventne trake se povećava. Činjenica je da je izgled spektra u ovoj oblasti različit kod polaznog RNMD i Cu(II) kompleksa, ali nije moguće tačno označiti trake bez dodatnih analiza (npr. izotopska izmena), jer su kod sintetisanog Cu(II) kompleksa dobijeni uzorci sa vrlo malim procentom izotopske izmene, pa detaljnija analiza nije bila moguća. U FTIR spektru,



Slika 8. FTIR spektri u oblasti valencionih OH vibracija ($3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$) (a) i u oblasti libracija molekula vode ($850\text{--}500\text{ cm}^{-1}$) (b) Cu(II)-RNMD kompleksa koji je sintetisan u jako alkalnoj sredini (pH 12); RT – na sobnoj temperaturi (298 K), LNT – niskotemperaturnski (77 K).

Figure 8. FTIR spectra in the region of valent OH vibrations ($3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$) (a) and the region of water molecule librations ($850\text{--}500\text{ cm}^{-1}$) (b) of Cu(II)-RLMD complex was synthesized in strong alkaline solution (pH 7,5); RT – room temperature (298 K), LNT – low nitrogen temperature (77 K).

koji je prikazan na slici 8a, za Cu(II)–RNMD kompleks sintetisan u jako baznoj sredini (pH 12), u oblasti valentnih OH vibracija sniženje temperature izaziva izdvajanje najmanje tri trake na sledećim frekvencijama 3120, 3240 i 3371 cm^{-1} . U LNT-FTIR spektru postoji najmanje jedna traka više, koja se eventualno može pripisati frekvenciji OH grupe uključene u prvu koordinacionu sferu Cu(II) jona, za predloženi tip kompleksa bez molekula vode [31,36].

ATR-FTIR spektri koji su predstavljeni na slikama 4 i 5, odgovaraju različitim delovima uzorka Cu(II)–RNMD i Cu(II)–RNMP kompleksa (slika 9.2.A–C), koji pokazuju visoku homogenost uzorka. Primena FTIR mikroskopije na Cu(II) komplekse, koji su sintetisani pod različitim reakcionim uslovima, prikazana je na slici 9.

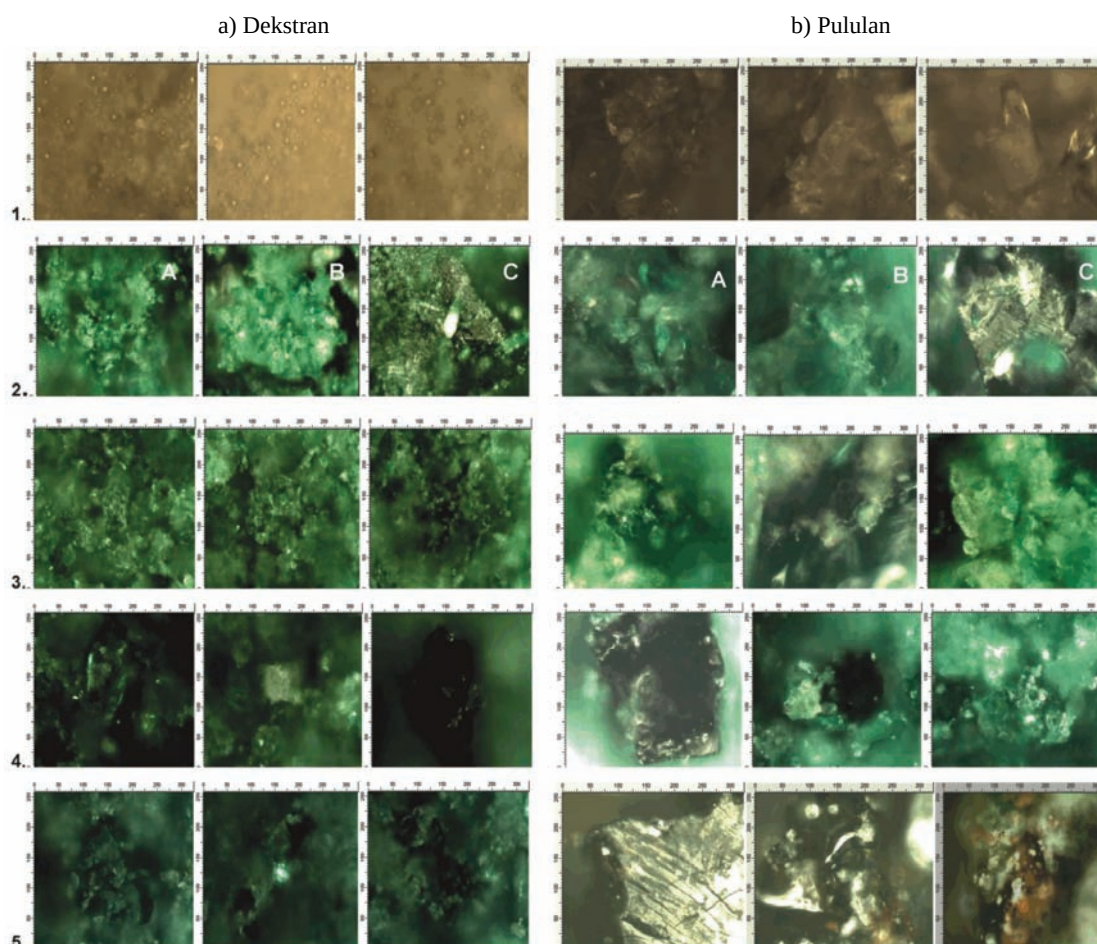
FTIR mikroskopske slike liganada RNMD i RNMP, kao i slike sintetisanih Cu(II) kompleksa (slika 9) međusobno se razlikuju što takođe pokazuje da je došlo do procesa kompleksiranja, tj. stvaranja koordinacionih jedinjenja. FTIR mikroskopske slike su potvrdile da su

promene u intenzitetu analiziranih traka snažno povezane s promenama u makromolekulskom uređenju. Ove trake u spektrima kompleksa mogu biti odgovorne za više ili manje uređene mikro strukture. Promene u boji kontura pojedinih delova slika pokazuju sadržaj i distribuciju bakra i polisaharida u Cu(II)-uzorcima [39,40].

ATR-FTIR mikrospektroskopski podaci pokazuju homogenost uzoraka, a zelena boja Cu(II) kompleksa potvrđuje prisustvo Cu(II)-jona (rezultati dobijeni drugim spektroskopskim tehnikama) [9,10,20,24].

Poređenjem IR spektara pululana i njegovog kompleksa (slika 10), uočava se dolazi do izražaja promena intenziteta kompleksne trake u kojoj imaju udela i C–H i O–H deformacione vibracije iz CH_2OH grupe.

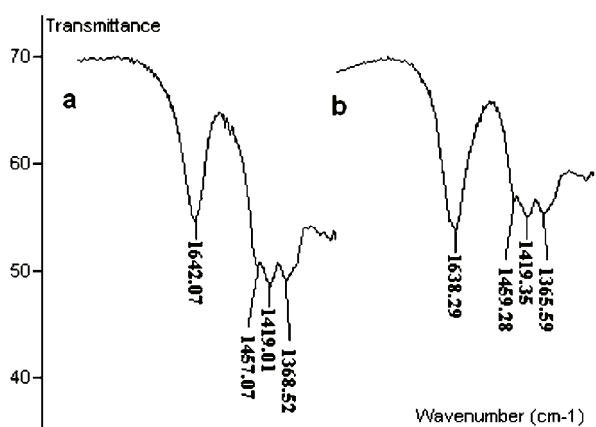
Frekvencija deformacionih vibracija CH_2 grupa u posmatranim IR spektrima nalazi se na oko 1450 cm^{-1} . Ova traka je karakteristična samo za jedan od mogućih položaja CH_2OH grupe, pri rotiranju oko veze C–5–C–6. Prema tome, smanjenje intenziteta ove trake jednoznačno je povezano s deformacionim vibracijama metilenske



Slika 9. FTIR mikroskopske slike (300x250) μm RNMD i RNMP (1), i Cu(II)–RNMD i Cu(II)–RNMP kompleksa koji su sintetisani na temperaturi ključanja i pH 7,5 (2), pH 8,0 (3), pH 10,0 (4) i pH 12,0 (5).

Figure 9. FTIR microscopic images of RLMD and RLMP (1), and Cu(II)–RLMD and Cu(II)–RLMP complexes synthesized on boiling point and pH 7.5 (2), pH 8.0 (3), pH 10.0 (4) and pH 12.0 (5).

grupe i odvija se ili na račun smanjenja broja CH₂ grupa ili je uslovljeno njenom rotacijom kod izomera elementarnog prstena. Polazeći sa stanovišta IR dihroizma u objašnjavanju ove činjenice, jasno je da se intenzitet trake može promeniti usled promene dipolnog momenta posmatrane grupe. Do njegove promene može doći rotacijom cele grupe oko C-5–C-6 veze. S obzirom da do smanjenja intenziteta složene trake na oko 1430 cm⁻¹ dolazi kod kompleksa, razumljivo je da do rotacije CH₂OH grupe dolazi zbog uticaja OH grupa iz Cu(II) komponente prisutne u sistemu, kao i njihovog međumolekulskog dejstva. Pri tome dolazi do raskidanja intramolekulskih vodoničnih veza makromolekula pululana (verovatno O6–H...O1) kao manje stabilnije zbog male verovatnoće postojanja *trans*–*cis* konformacije. Pri tom u makromolekulu i dalje ostaju kao stabilnije O3–H...O5 vodonične veze. Tako slobodnija CH₂OH grupa započinje rotaciju, usmeravajući se prema OH grupama iz Cu(II) jona, saglasno slobodi kretanja koja je ograničena rotacijom ostalog dela polisaharidnog lanca. Promena ugla prema osi lanca, koji CH₂OH grupa čini rotacijom, dobija se energetski povoljnija konformacija u novonastaloj strukturi kompleksa, što će za posledicu imati smanjenje intenziteta odgovarajuće trake u IR spektru. Identična pojava zabeležena je i kod drugih metalnih kompleksa sa sličnim polisaharidima, koji poseduju nevezane CH₂OH grupe (npr. inulin) [41]. Međutim, kod IR spektara kompleksa redukovano niskomolarnog dekstrana ovakve promene nisu uočene, što se i očekuje ako se ima u vidu da su CH₂OH grupe zauzete građenjem glikozidnih α-(1→6) veza. Pod uticajem Cu(II) jona sada dolazi do razaranja vodoničnih veza unutar i između polisaharidnih makromolekula, što doprinosi promeni uzajamnog rasporeda sekundarnih OH grupa na elementarnoj ćeliji polisaharida.



Slika 10. Oblast α (CH) i δ (OH) vibracija CH₂OH grupa u FTIR spektrima: a) redukovano niskomolarnog pululana i b) kompleksa Cu(II) jona sa RNMP.
Figure 10. Region of α (CH) and δ (OH) CH₂OH group vibrations in FTIR spectra of: a) –RLMP and b) Cu(II)–RLMP complexes.

ZAKLJUČAK

– Prema rezultatima FTIR ispitivanja, kod redukovano niskomolarnog dekstrana i pululana $M_w = 5000$ – 6000 g/mol, kao liganada, posle hidrolize i redukcije ne dolazi do promene konformacije niti do bilo kakvih hemijskih promena. Trake u oblasti γ (C–H) vibracija na oko 915 i 860 cm⁻¹ ukazuju na *ax*–*eq* i *ax*–*ax* raspored susednih CH grupa, tj. na C1 konformaciju glukopiranozne jedinice i kod dekstrana i kod pululana. Analiza FTIR spektara sintetisanih kompleksa Cu(II) jona sa RNMD i RNMP kao ligandima pokazuje da kompleksiranje takođe ne dovodi do konformacionih promena glukopiranozne jedinice.

– Karakteristična IR traka od δ (HOH) na oko 1640 cm⁻¹ u spektrima ispitivanih kompleksa, ukazuje na prisustvo kristalne vode u strukturi kompleksa. Primenom metode sniženja temperature (LNT-FTIR), kod Cu(II) kompleksa koji su sintetisani u slabo alkalnoj sredini, utvrđeno je prisustvo traka od libracija molekula H₂O, što potvrđuje predložene modele strukture tipa ML₂(H₂O)₂. Kod Cu(II) kompleksa koji su sintetisani u jako alkalnoj sredini, identifikovana je traka od ν (O–H) vibracija hidroksidnih grupa, koja govori u prilog pretpostavljenih struktura tipa ML₂(H₂O)(OH) i ML₂(OH)₂.

– FTIR mikroskopske slike liganada, kao i slike sintetisanih kompleksa međusobno se razlikuju što nam takođe pokazuje da je došlo do procesa kompleksiranja. Promene u boji kontura pojedinih delova FTIR slika pokazuju sadržaj i distribuciju bakra i polisaharida u uzorcima kompleksa. ATR-FTIR spektroskopski podaci pokazuju homogenost uzoraka, a zelena boja kompleksa potvrđuje prisustvo Cu(II) jona.

Trake na 2950 i 1450 cm⁻¹ karakteristične su samo za jedan od mogućih položaja CH₂OH grupe pululana, pri okretanju oko veze C5–C6. Smanjenje intenziteta ove trake u FTIR spektrima pululanskih kompleksa jednoznačno je povezano s deformacionim vibracijama metilenske grupe i odvija se ili na račun smanjenja broja CH₂ grupa ili je uslovljeno njenom rotacijom kod izomera elementarnog prstena, što je najverovatnije uslovljeno prisustvom Cu(II) jona.

Zahvalnost

Rad je realizovan u okviru projekta TR-19048 i TR-19035, koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

LITERATURA

- [1] P.F. Predki, D.M. Whitfield, B. Sarkar, *Biochem. J.* **281** (1992) 835.
- [2] S.P. Kaiwar, C.P. Rao, *Carbohydr. Res.* **237** (1992) 203.
- [3] C.P. Rao, S.P. Kaiwar, M.S.S. Raghavan, *Polyhedron* **13** (1994) 1895.
- [4] R.P. Bandwar, C.P. Rao, *Carbohydr. Res.* **287** (1996) 157.

- [5] C.P. Rao, K. Geetha, M.S.S. Raghavan, *BioMetals* **7** (1994) 25.
- [6] R.P. Bandwar, M. Giralt, J. Hidalgo, C.P. Rao, *Carbohydr. Res.* **284** (1996) 73.
- [7] G. Nikolić, M. Cakić, Lj. Ilić, S. Ristić, Ž. Cakić, *Die Pharmazie* **57** (3) (2002) 155.
- [8] R.P. Bandwar, C.P. Rao, *Carbohydr. Res.* **297** (1997) 341.
- [9] G. Nikolić, M. Cakić, Ž. Mitić, R. Nikolić, Lj. Ilić, *Hem. Ind.* **59** (1–2) (2005) 9.
- [10] Ž.J. Mitić, G.S. Nikolić, M.D. Cakić, R.S. Nikolić, Lj.A. Ilić, *Hem. Ind.* **61** (5) (2007) 257.
- [11] A.N. de Belder, Dextran, Pharmacia AB, Uppsala, Sweden, 1985, 12–48.
- [12] V.P. Kiselev, I.J. Carevskaja, A.D. Virnik, Z.A. Rogovin, *Vysokomol. Soedin. A* **18** (1) (1976) 234.
- [13] H. Chanzy, G. Excoffier, C. Guyizard, *Carbohydr. Polym.* **1** (1981) 67.
- [14] B.J. Catley, *FEBS Lett.* **10** (1970) 190.
- [15] T.D. Leathers, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62** (5–6) (2003) 468.
- [16] V.P. Panov, R.G. Zhabankov, *Conformations of Sugars*, Nauka i Tekhnika, Minsk, Belarus, 1976.
- [17] R.G. Zhabankov, *Infrared Spectra and Structure of Carbohydrates*, Nauka i Tekhnika, Minsk, Belarus, 1972.
- [18] V.P. Panov, R.G. Zhabankov, *Intra- and Intermolecular Interactions in Carbohydrates*, Nauka i Tekhnika, Minsk, Belarus, 1988.
- [19] M. Kačurakova, P. Capek, V. Sasinkova, N. Wellner, A. Ebringerova, *Carbohydr. Polym.* **43** (2000) 195.
- [20] Ž. Mitić, G.S. Nikolić, M. Cakić, R. Nikolić, Lj. Ilić, *Russ. J. Phys. Chem.* **81** (9) (2007) 1433.
- [21] G.S. Nikolić, M. Cakić, Ž. Mitić, Lj. Ilić, *Complex compounds of Cu(II) ions with pullulan and its reduced and oxidized derivatives*, Serbian Pat. P–0223/2008, Belgrade, Serbia, 2008.
- [22] Lj. Pejov, B. Šoptrajanov, G. Jovanovski, *J. Mol. Struct.* **563–564** (2001) 321.
- [23] B. Šoptrajanov, G. Jovanovski, Lj. Pejov, *J. Mol. Struct.* **613** (2002) 47.
- [24] Ž. Mitić, G.S. Nikolić, M. Cakić, P. Premović, Lj. Ilić, *J. Mol. Struct.* **924–926** (2009) 264.
- [25] P.K. Bose, P.L. Polavarapu, *Carbohydr. Res.* **323** (2000) 63.
- [26] N.A. Nikonenko, D.K. Buslov, N.I. Sushko, R.G. Zhabankov, *Biopolymers* **57** (2000) 257.
- [27] M. Kačurakova, M. Mathlouthi, *Carbohydr. Res.* **284** (1996) 145.
- [28] V.V. Sivchik, R.G. Zhabankov, M. V. Astreiko, *Acta Polym.* **30** (1979) 689.
- [29] G.S. Nikolić, M. Cakić, Ž. Mitić, Lj. Ilić, *Russ. J. Coord. Chem.* **34** (5) (2008) 322.
- [30] J.J.G. van Soest, H. Tournois, D. de Wit, J.F.G. Vliegthart, *Carbohydr. Res.* **279** (1995) 201.
- [31] A.L.M. Smits, F.C. Ruhnau, J.F. Vliegthart, J.J.G. van Soest, *Starch* **50** (1998) 478.
- [32] P. Rubens, J. Snauwaert, K. Heremans, R. Stute, *Carbohydr. Polym.* **39** (1999) 231.
- [33] J.J.G. van Soest, K. Benes, D. de Wit, J.F.G. Vliegthart, *Polymer* **37** (1996) 3543.
- [34] P. Dais, S. Vlachou, F.R. Taravel, *Biomacromolecules* **2** (2001) 1137.
- [35] M. Bosco, F. Picotti, A. Radoicovich, R. Rizzo, *Biopolymers* **53** (2000) 272.
- [36] J.H.-Y. Liu, D.A. Brant, S. Kitamura, K. Kajiura, M. Mimura, *Macromolecules* **32** (1999) 8611.
- [37] R.G. Zhabankov, *J. Mol. Struct.* **275** (1992), 65.
- [38] M. Cakić, Ž. Mitić, G.S. Nikolić, Lj. Ilić, G.M. Nikolić, *Spectroscopy* **22** (2–3) (2008) 177.
- [39] Ž. Mitić, G.S. Nikolić, M. Cakić, P. Premović, Lj. Ilić, u: XXIX European Congress on Molecular Spectroscopy (EUCMOS 2008), Opatija, Croatia, 2008, P4–10, 197.
- [40] G.S. Nikolić, M. Cakić, Ž. Mitić, B. Ilić, P. Premović, *Russ. J. Phys. Chem.* **83** (9) (2009) 1520.
- [41] G. Nikolić, M. Cakić, *Colloid J.* **69**(4) (2007) 464.

SUMMARY**SPECTROSCOPIC CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE Cu(II) COMPLEXES WITH POLYSACCHARIDES BY MODERN FTIR MICROSPECTROSCOPY**Žarko Mitić¹, Milorad Cakić², Goran S. Nikolić², Ljubomir Ilić³, Mihajlo Stanković²¹Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, Bulevar Zorana Djindjića 81, Niš, Serbia²Faculty of Technology, Bulevar Oslobođenja 124, Leskovac, Serbia³Pharmaceutical and Chemical Industry "Zdravlje Actavis Co.", Leskovac, Serbia

(Scientific paper)

Investigations of bioactive copper complexes are of great interest for the pharmaceutical industry from the aspect of therapy of hypochromic microcitary anemia and hypocupremia. The structure of bioactive copper complexes with oligosaccharides has not yet been explained in details despite a number of studies. This work represents further development in the research of the complex structure and pharmacobiological activity of the copper complexes. Different copper complexes with dextran and pul-lulan oligosaccharides, as well as reduced derivatives, have been analyzed by IR spectroscopy. Characterization of the complexes has been performed by using modern spectroscopic techniques: RT-FTIR, LNT-FTIR, D₂O-FTIR, ATR-FTIR and FTIR microspectroscopy. Results of FTIR microspectroscopic investigations show that the structural form of complexes and copper content depend considerably on constitution and ligands conformation, degree of crystallinity, polymerization, polydispersity, and linearity of macromolecules. Also, stability of the synthesized complexes, as well as their pharmacological effect, depend on these parameters. Based on IR testing results, structures of the synthesized Cu(II) complexes with polysaccharides were confirmed.

Ključne reči: FTIR mikrospektroskopija • Polisaharidi • Dekstran • Pul-lulan • Cu(II) kompleksi

Key words: FTIR microspectroscopy • Polysaccharides • Dextran • Pul-lulan • Cu(II) complexes