

УДК 577.113+541.49

Д.Н. Чернышев, лаборант,

В.Л. Лучин, доцент, канд. техн. наук,

М.П. Никифорова, студентка

Севастопольский национальный технический университет,

Студгородок, г. Севастополь Украина, 99053

E-mail: piterbol@inbox.ru

**ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИИИ 7,8-ДИМЕТИЛ-10-N-(1'-D-РИБИТИЛ)
ИЗОАЛЛОКСАЗИНА, АЛКАЛОИДА 1,3,7-ТРИМЕТИЛКСАНТИНА И НАТРИЕВОГО
ЭФИРА САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ**

Методом UV-Vis спектрофотометрии исследована самоассоциация и гетероассоциация ароматических молекул рибофлавина (витамин В₂, 7,8-диметил-10-N-(1'-D-рибитил) изоаллоксазин), кофеина и салицилата натрия в водном растворе (pH=6.86) при T=298 K. Установлено влияние мочевины на комплексообразование молекул.

Введение

В последнее время в исследованиях, связанных с решением вопросов теоретической медицины, наиболее приоритетным становится направление по изучению использования природных эффекторов для лечения различных заболеваний человека. Вызвано это, прежде всего тем, что естественные метаболиты (или их аналоги) не только обладают высокой специфичностью к отдельным системам клеточного обмена, но и способны легко адаптироваться к системам транспорта через клеточную мембрану. Кроме того, при использовании натуральных компонентов не нарушается регуляция клеточного метаболизма: специфическое воздействие на конкретную систему не вызывает сдвига функционирования других обменных процессов по типу цепной реакции. Поэтому, преимущества регуляторного действия природных соединений, очевидно. В связи с вышесказанным, на фоне широкого использования соединений природного происхождения особое внимание специалистов, работающих в области создания лекарственных средств обращено на витамины, относящиеся к группе низкомолекулярных соединений.

Витаминные комплексы находят все более широкое применение в технологиях восстановительной медицины для коррекции функциональных состояний и повышения резервных возможностей человека при воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды. Гиповитаминозный фон отягощает течение основного заболевания и снижает эффективность терапевтических мероприятий [1]. При внедрении медицинских препаратов невозможно обойти вниманием дискуссионный вопрос, который относится к изучению принципов взаимодействия витаминных препаратов с другими лекарственными средствами. Принято считать, что витамины в комплексе с другими эффекторами выступают в клетке в качестве специфических лигандов, способствующих более активному включению основного вещества в системы гомеостаза, однако при этом соединения, связанные с витаминами, могут оказаться блокаторами действия самих витаминов. Определенные лекарственные вещества природного и синтетического происхождения, например, ксантины, салицилаты и др. с различным химическим строением и различным фармакологическим действием обладают способностью аккумулировать витамины, что может являться причиной многих осложнений [1].

Известно [2], что молекулы антрациклиновых антибиотиков в миллимолярном диапазоне концентраций проявляют сильную тенденцию к самоассоциации в растворе. Это выражается в образовании димеров и ассоциатов более высокого порядка, стабилизируемых за счет стэкинг - взаимодействия между ароматическими хромофорами молекул в агрегатах [2]. Подобные взаимодействия наблюдаются и при гетероассоциации антибиотиков с ароматическими биологически активными соединениями в растворе, например, с кофеином (CAF) и с рибофлавином (RFN, витамин В₂) [3]. Предполагается, что данный механизм является доминирующим в процессе деградации антрациклиновых антибиотиков, в частности, доксорубина, и некоторых ароматических канцерогенов при связывании с RFN. Ранее было обнаружено протекторное действие рибофлавина по отношению к ДНК [4], выражающееся в значительном уменьшении связывания ароматических мутагенов с нуклеиновой кислотой в присутствии витамина. Кроме этого, была доказана способность других ароматических веществ, таких, как CAF, перехватывать молекулы антибиотиков и мутагенов посредством гетероассоциации и конкурировать с ними за места связывания с ДНК.

В настоящей работе проведено исследование комплексообразования молекул органических соединений: рибофлавина, салицилата натрия (аналога аспирина) и кофеина в присутствии и отсутствии мочевины, которые могут поступать в организм человека, как пищевые ингредиенты, так и в качестве лекарственных препаратов. Их биологическая активность при поступлении в клетку в комбинации может существенно меняться.

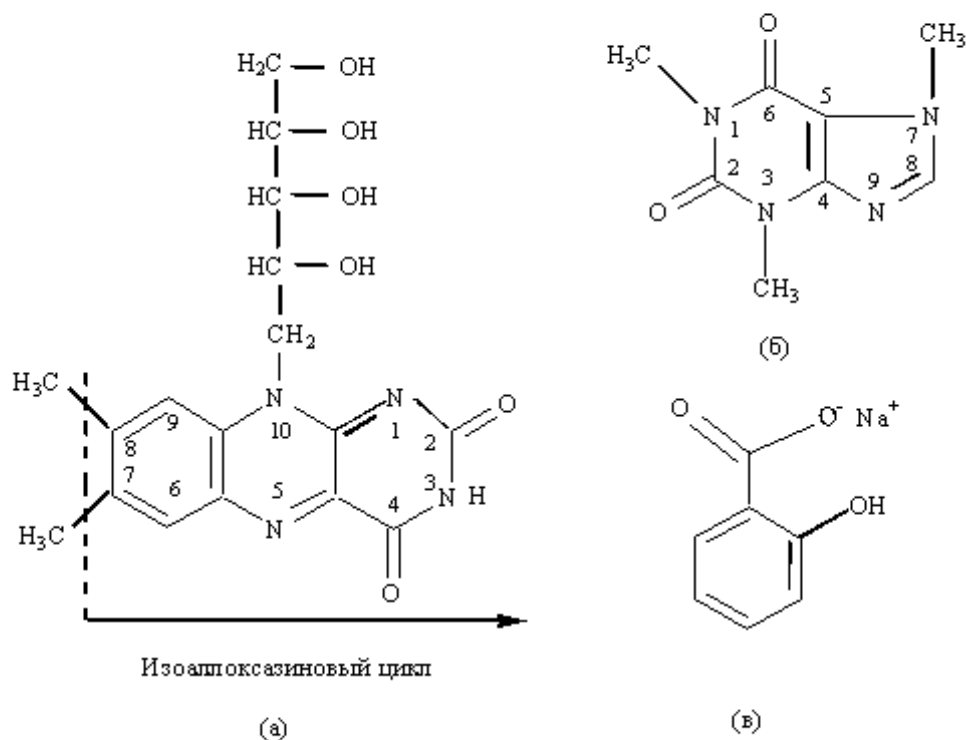


Рисунок 1 – Структурные формулы молекул: а) рибофлавина; б) кофеина; в) салицилата натрия

В основе флавиновых молекул лежит изоаллоксазиновый цикл (рисунок 1,а), представляющий собой птеридин, конденсированный с бензольным кольцом. Флавиновая структура имеет четыре гетероатома азота, метильные заместители в положениях 7 и 8 бензольного кольца, а также заместитель, присоединенный к гетероциклическому атому азота в положении 10. У широко распространенного в природе флавина – рибофлавина или рибитилфлавина (7,8-диметил-10-N-(1'-D-рибитил) изоаллоксазин), – последний заместитель представляет собой сахароспирт рибит. Этот сильно гидроксированный заместитель достаточно лабилен и выполняет роль связующего звена при формировании коферментов. Химическая структура рибофлавина высокоспецифична, так как даже незначительные модификации изоаллоксазинового цикла и остатка рибитила молекулы оказывают сильное влияние на каталитические свойства фермента, потерю витаминной активности или образование антагонистов.

Свободный RFN легко восстанавливается, а его восстановленная форма вновь легко окисляется. Это свойство используется при биологическом функционировании флавиновых коферментов в электрон-транспортной цепи.

Рибофлавин обладает фотохимической активностью, известен как типичный ¹O₂ сенсibiliзирующий фактор [5] и может быть использован для инактивации загрязненных медицинских образцов, например, плазмы крови. Дефицит RFN вызывает образование отдельных разрывов спирали ядерной ДНК, увеличивает связывание канцерогенов с ДНК и уменьшает содержание глутатиона в печени.

Кофеин (1,3,7-триметилксантин) – метилированное производное пурина – относится к классу метилксантинов. Молекулы CAF (рисунок 1,б) представляют собой плоские электронейтральные гетероциклические соединения, содержащие метильные группы в положениях 1, 3, 7; кислород в положениях 2,6 и четыре гетероатома азота. Биологическая активность CAF проявляется в его способности снижать канцерогенные эффекты мутагенных препаратов. В ряде работ сообщается о том, что CAF может служить как профилактическое антиканцерогенное средство, при риске возникновения рака пищеварительного тракта, грудной, поджелудочной и щитовидной желез. По современным данным, в механизме действия кофеина существенную роль играет его угнетающее влияние на фермент фосфодиэстеразу, что ведет к внутриклеточному накоплению циклического аденозинмонофосфата.

Натрия салицилат (NAS)- натриевый эфир салициловой кислоты (рисунок 1,в) – относится к группе нестероидных противовоспалительных средств, содержит в бензольном ядре карбоксиланион в положении 1 и гидроксильную группу в положении 2, что делает его хорошо растворимым в воде. NAS по фармакологическому действию близок к ацетилсалициловой кислоте (аспирин).

Мочевина (Urea), H₂N-CO-NH₂, амид карбаминовой кислоты, конечный продукт метаболизма белка позвоночных животных, широко используется в качестве денатурирующего средства. В водных растворах в концентрациях 6-8М мочевина разрушает третичную структуру белков. Молекулярный

механизм действия мочевины, который лежит в основе изменения природных свойств белков, все еще неясен. В работе [6] мочевина рассматривается, как “водно-структурный разрушитель”, который нарушает способность молекул воды поддерживать тетраэдрическую геометрию водородных связей и ослабляет гидрофобный эффект при ассоциации молекул.

Наряду с лечебными свойствами, салицилаты щелочных металлов, мочевина, алкалоиды, подобно кофеину, обладают гидротропными свойствами, что проявляется в их способности многократно увеличивать растворимость многих терапевтических средств [7], в том числе и рибофлавина. К механизмам, лежащим в основе их гидротропного действия, относят специфическое взаимодействие с растворителем, сомоассоциацию гидротропного агента и комплексообразование между молекулами гидротропных и лекарственных средств.

Целью настоящей работы являлось выяснение способности биологически активных молекул салицилата натрия и кофеина образовывать нековалентные комплексы с рибофлавином и возможности регуляции фармакологической активности при их комбинированном использовании. Методом оптической спектрофотометрии исследована самоассоциация молекул RFN в водном растворе. Изучена гетероассоциация молекулярных систем: RFN–NAS и RFN–CAF в присутствии и в отсутствии мочевины. Количественный анализ проведен по экспериментальным концентрационным зависимостям оптической плотности на длине волны мономерного максимума поглощения RFN.

Методика эксперимента

Электронные спектры поглощения исследуемых растворов RFN и смешанных растворов RFN–NAS, RFN–CAF, RFN–NAS–Urea и RFN–CAF–Urea регистрировались на UV-Vis спектрофотометре СФ-46 в видимой области спектра (390 ÷ 520 нм).

Рибофлавин фирмы “Serva Feinbiochemica GmbH” (Heidelberg, Germany), салицилат натрия, кофеин и мочевина фирмы “Sigma” (USA), использовались без дополнительной очистки. Исходные растворы исследуемых препаратов готовились с добавлением взвешенного количества образца в 0,1-М Na-фосфатный буфер (рН=6.86). В связи с чувствительностью к световому воздействию (к голубому участку спектра), взвешивание препаратов и приготовление их растворов проводились в затемненном помещении. Все исследуемые растворы готовились на основе бидистиллированной воды непосредственно перед измерениями.

При изучении самоассоциации водные растворы RFN в диапазоне концентраций $2.5 \cdot 10^{-3} \div 5 \cdot 10^{-5} M$ готовились методом последовательного разбавления. При регистрации спектров использовались стеклянные кюветы с длиной оптического пути: 10.0; 5.01; 2.0082; 1.0077; 0.5062; 0.202; 0.1065; 0.0505 и 0.0207 см. Температура внутри кюветного отделения спектрофотометра (298 K) при регистрации спектров поддерживалась постоянной термостатическим устройством с точностью $\pm 0.25 K$.

При исследовании гетероассоциации систем RFN–NAS и RFN–CAF осуществлялось титрование RFN (0.1-М Na-фосфатный буфер) салицилатом натрия в диапазоне концентраций $2 \cdot 10^{-4} \div 4 \cdot 10^{-1} M$ и кофеином в интервале $8 \cdot 10^{-4} \div 6 \cdot 10^{-1} M$. Концентрация рибофлавина в смешанных растворах поддерживалась постоянной ($C_{RFN} = [B_0] = 5 \cdot 10^{-5} M = \text{const}$). Изучение влияния мочевины на формирование гетероассоциатов проводилось при постоянной концентрации (1M) Urea в растворах. Измерения проводились в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 0.998 см при постоянной температуре $T = 298 \pm 0.25 K$.

Результаты и их обсуждение

Самоассоциация рибофлавина. Динамическое равновесие в растворе моделировалось схемой:



где K_{dB} – равновесная константа димеризации молекул; B_1 и B_2 – мономеры и димеры молекул RFN.

Общая концентрация молекул в растворе:

$$[B_0] = [B_1] + 2[B_2], \quad (2)$$

где $[B_0]$ – исходная концентрация вещества; $[B_1]$ – концентрация мономеров; $[B_2] = K_{dB} \cdot [B_1]^2$ – концентрация димеров.

Согласно модели, суммарный молярный коэффициент поглощения ε , который дают мономерная и димерная составляющие молекул RFN, может быть представлен в виде [8]:

$$\varepsilon = \varepsilon_m f_m + \varepsilon_d f_d, \quad (3)$$

где ε_m , ε_d – молярные коэффициенты поглощения мономеров и молекул RFN в составе димерных комплексов соответственно; $f_m = [B_1]/[B_0]$ – равновесная молярная доля молекул в мономерной форме; $f_d = 2K_{dB}[B_1]^2/[B_0]$ – равновесная молярная доля молекул в составе димеров. Концентрация $[B_1]$ определяется из закона сохранения массы (2).

Таким образом, в выражение (3) входят три неизвестных параметра – ε_m , ε_d и K_{dB} , для расчета которых использовалась экспериментальная концентрационная зависимость молярного коэффициента поглощения RFN (рисунок 2).

Параметры модели рассчитывались путем минимизации суммы квадратов отклонений экспериментальных значений молярных коэффициентов поглощения от значений, рассчитанных по модели (3).

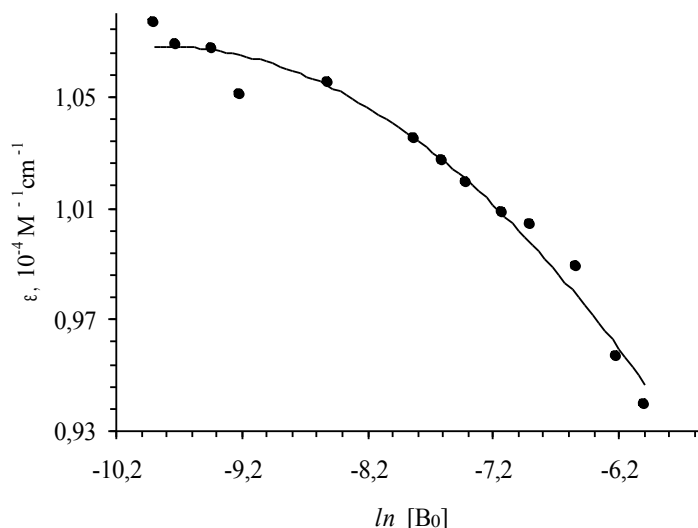


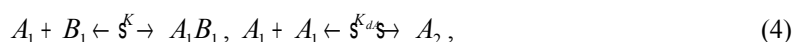
Рисунок 2 – Зависимость молярного коэффициента поглощения водного раствора (pH = 6.86; T = 298 K) рибофлавина ($\lambda_{max} = 446$ нм) от логарифма концентрации

Численное значение равновесной константы димеризации молекул рибофлавина $K_{dB} = (125 \pm 40) M^{-1}$ определяется структурой молекулы RFN и условиями эксперимента.

Гетероассоциация рибофлавина с салицилатом натрия и кофеином. Электронные спектры поглощения водного раствора рибофлавина ($C_{RFN} = [B_0] = 5 \cdot 10^{-5} M = \text{const}$) при добавлении к нему различных концентраций NAS ($2 \cdot 10^{-4} \div 4 \cdot 10^{-1} M$) и CAF ($8 \cdot 10^{-4} \div 6 \cdot 10^{-1} M$) претерпевали деформацию, выражающуюся в небольшом батохромном сдвиге максимума поглощения RFN и в уменьшении интенсивности полос поглощения. В спектрах поглощения наблюдались изобестические точки, указывающие на формирование сложного комплекса RFN с NAS и CAF.

Анализ гетероассоциации молекул NAS (CAF) и RFN проводился с использованием уравнения Бенеша-Гильдебранта [9] при условии $[A_0] \gg [B_0]$, где $[A_0]$ – исходная концентрация NAS (CAF).

Равновесие в растворе моделировалось схемой:



где K – равновесная константа гетероассоциации молекул NAS (CAF) и RFN; K_{dB} – равновесная константа димеризации молекул NAS (CAF); A_1 и A_2 – мономеры и димеры молекул NAS (CAF); A_1B_1 – гетерокомплекс.

Константа гетероассоциации для суммарного процесса образования комплекса определяется уравнением [10]:

$$K = \frac{[A_1B_1]}{[A_1]([B_0] - [A_1B_1])}, \quad (5)$$

где $[A_1B_1]$ – концентрация гетерокомплекса; $[A_1]$ – концентрация мономеров NAS (CAF).

Исключив из формулы (5) концентрацию комплекса $[A_1B_1]$, выраженную через его оптическую плотность с помощью закона Бугера-Ламберта-Бера, получим:

$$D_k = \frac{\varepsilon_k l [B_0] K [A_1]}{K [A_1] + 1}, \quad (6)$$

где D_k и ε_k – оптическая плотность и молярный коэффициент поглощения молекул рибофлавина в составе гетерокомплекса на длине волны, соответствующей максимуму поглощения мономеров RFN; l – длина оптического пути раствора гетерокомплекса.

Преобразовав оптическую плотность раствора $D = \varepsilon_m l [B_1] + \varepsilon_k l [A_1 B_1]$ для молекул рибофлавина, с учётом уравнения (6), получим концентрационную зависимость суммарного поглощения исследуемых молекул:

$$D = D_m - \frac{\Delta \varepsilon l [B_0] K [A_1]}{K [A_1] + 1}, \quad (7)$$

где D_m – оптическая плотность разбавленного раствора, содержащего только RFN; $[B_0] = 5 \cdot 10^{-5} M$; $\Delta \varepsilon = \varepsilon_m - \varepsilon_k$; $[A_1] = (-1 + \sqrt{1 + 8K_{da}[A_0]}) / 4K_{da}$ (формула для расчёта концентрации мономеров NAS (CAF) получена из уравнения, аналогичного уравнению (2)).

Выражение (7), описывающее оптическую плотность раствора, содержит три неизвестных параметра K , K_{da} и $\Delta \varepsilon$, определяемых по экспериментальным значениям спектров поглощения RFN на длине волны 446 нм (рисунок 3).

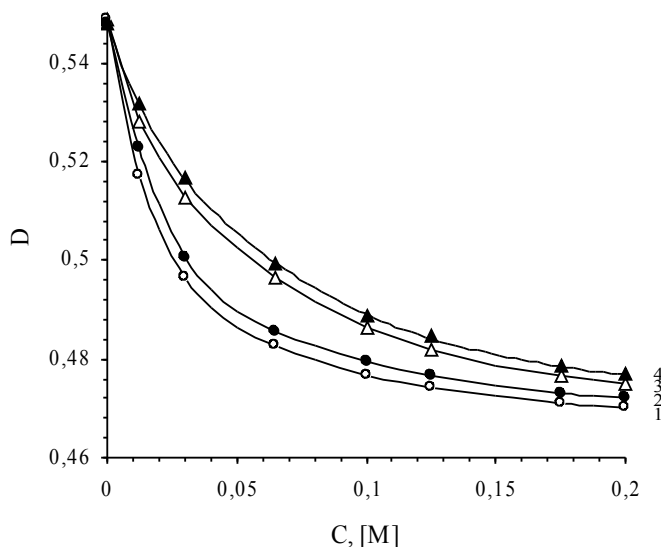


Рисунок 3 – Концентрационные зависимости оптической плотности водных растворов (рН = 6.86; T = 298 K) молекулярных комплексов: 1) RFN - CAF; 2) RFN - CAF - Urea; 3) RFN - NAS; 4) RFN - NAS - Urea ($C_{RFN} = 5 \cdot 10^{-5} M = \text{const}$; $C_{Urea} = 1.0 M = \text{const}$) на длине волны максимального поглощения RFN: $\lambda_{\text{max}} = 446 \text{ нм}$

Равновесные константы образования гетерокомплексов RFN – NAS (CAF) и димерных комплексов NAS (CAF), полученные с использованием модифицированного уравнения Бенеша – Гильдебранта (7) для RFN и NAS, составили: $K = (25 \pm 4) M^{-1}$ и $K_{da} = (2.7 \pm 0.5) M^{-1}$, а для RFN и CAF, $K = (74 \pm 11) M^{-1}$ и $K_{da} = (17 \pm 1.5) M^{-1}$. Величины констант димеризации и гетероассоциации изменяются в следующем порядке: $K_{da} < K < K_{db}$. Наименьшее значение константы K_{da} получено для молекул NAS. Очевидно, это связано со

структурой салицилата натрия, содержащей одно ароматическое кольцо, и со слабыми дисперсионными силами, стабилизирующими димерные π -комплексы. Величина константы K_{db} в основном определяется наличием в молекуле RFN гидрофобной системы циклов с большим дипольным моментом, способствующей димеризации молекул, и массивной рибитильной цепью, создающей стерические препятствия при формировании димеров.

Промежуточное положение константы гетероассоциации, как в первом, так и во втором случаях ($K_{da} < K < K_{db}$) обуславливается электронной конфигурацией образующихся комплексов.

Равновесные константы образования гетерокомплексов RFN–NAS и RFN–CAF в присутствии мочевины в растворе соответственно равны $K = (17 \pm 3) M^{-1}$ и $K = (53 \pm 7) M^{-1}$, т.е. стабильность комплексов уменьшается.

Заключение

В настоящей работе показано, что рибофлавин эффективно агрегирует в растворе, а также образует комплексы с салицилатом натрия и кофеином. Само- и гетероассоциаты молекул преимущественно стабилизируются дисперсионными и гидрофобными взаимодействиями ароматических хромофоров в комплексах. Анализ динамического равновесия взаимодействующих молекул в растворе позволил заключить, что гетероассоциация с кофеином и салицилатом натрия снижает мономерную концентрацию молекул RFN в растворе. Влияние мочевины на исследуемые молекулярные системы проявляется в уменьшении сил связывания в гетерокомплексах вследствие ослабления гидрофобного эффекта. Учитывая, что основной биологический эффект RFN проявляется при взаимодействии его мономеров с молекулярными рецепторами клетки, можно предположить, что гетероассоциация RFN-CAF и RFN-NAS должна привести к изменению биологической активности RFN в присутствии CAF и NAS.

Библиографический список

1. Frank T. Alteration of thiamine pharmacokinetics by end-stage renal disease / T. Frank, R. Bitsch, J. Maiwald // *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* — 1999. — V. 37 (9). — P. 449–455.
2. Self-association of doxorubicin and related-compounds in aqueous solution / M. Menozzi, L. Valentini, E. Vannini, F. Arcamone // *J. Pharm. Sci.* — 1984. — V. 73. — P. 766–770.
3. Kharash E.D. The molecular basis for complexation of adriamycin with flavinmononucleotide and adenine-dinucleotide / E.D. Kharash, R. Novak // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1981. — V. 212. — P. 20–36.
4. Webster R.P. Modulation of carcinogen-induced DNA damage and repair enzyme activity by dietary riboflavin / R.P. Webster, M.D. Gawde, R.K. Bhattacharya // *Cancer Letters.* — 1996. — V. 98. — P. 129–135.
5. Sensitized Photooxygenation of Cholesterol and Pseudocholesterol Derivatives via Singlet Oxygen / W. Shuping, J. Zhiqin, Li Heting, Li Yang, Z. Daixun // *Molecules.* — 2001. — V. 6. — P. 52–60.
6. Frank H.S. Structural approach to the solvating power of water for carbohydrates – urea as a structure breaker / H.S. Frank, F.J. Franks // *J. Chem. Phys.* — 1968. — V. 48. — P. 4746–4754.
7. Jain N.K. Hydrotropic solubilization of nifedipine / N.K. Jain, V.V. Patel, L.N. Taneja // *Pharmazie.* — 1988. — V. 43. — P. 194–196.
8. Bolotin P.A. Spectrophotometric investigation of the hetero-association of Caffeine and thiazine dye in aqueous solution / P.A. Bolotin, S.F. Baranovsky, M.P. Evstigneev // *Spectrochimica Acta Part A.* — 2006. — V. 64. — P. 693–697.
9. Beneshi H.A. A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons / H.A. Beneshi, J.H. Hildebrand // *J. Am. Chem. Soc.* — 1949. — V. 71. — P. 2703–2707.
10. Барановский С.Ф. Ассоциация рибофлавина, кофеина и натриевого эфира салициловой кислоты в водном растворе / С.Ф. Барановский, П.А. Болотин // *Журн. Прикл. Спектроскопии.* — 2007. — Т. 74. — № 2. — С. 188–194.

Поступила в редакцию 6.04.2007 г.