

УДК 541.49+577.113

С.Ф. Барановский, профессор, д-р физ.-мат. наук,

П.А. Болотин, канд. физ.-мат. наук,

Д.Н. Чернышев, лаборант,

Севастопольский национальный технический университет

Студгородок, г. Севастополь, Украина, 99053

М.Г. Поплавская, доцент, канд. физ.-мат. наук

Севастопольский высший военно-морской институт им. П.С. Нахимова

E-mail: piterbol@inbox.ru

СПЕКТРАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ САМОАССОЦИИ ГИДРОХЛОРИДА АКРИДИНА ОРАНЖЕВОГО В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

Изучены электронные спектры поглощения красителя - акридинового оранжевого в водном растворе (рН 6.86). Определена равновесная константа димеризации $K_d = (3300 \pm 450)$ л/моль и полимеризации $K = (4800 \pm 700)$ л/моль молекул красителя при $T = 293$ К и структурные параметры димера красителя. Определены значения свободной энергии Гиббса, энтальпии и энтропии реакций димеризации молекул акридинового оранжевого: $\Delta G_{293} = -(19 \pm 3)$ кДж/моль, $\Delta H = -(38 \pm 10)$ кДж/моль и $\Delta S_{293} = -(65 \pm 24)$ Дж/моль·К. Сделан вывод о том, что агрегаты акридина оранжевого преимущественно стабилизируются дисперсионными взаимодействиями молекул хромофоров в ассоциатах.

Введение

Одной из главных мишеней антиканцерогенных лекарственных средств является ДНК. К этим средствам, в частности, относится акридин и его многочисленные производные. Широкое использование производных акридина в медицине началось с открытия противомаларийных свойств акрихина и антибактериальных свойств этакридина лактата [1]. Однако биологическое действие препаратов группы акридина оказалась значительно шире. Они обладают антибактериальной, противовирусной и противоопухолевой активностью, выраженной в разной степени [2]. Противоопухолевая и противовирусная активность препаратов акридинового ряда прямо коррелирует с ДНК- и/или РНК-связывающей способностью [3].

Основными механизмами нековалентного взаимодействия небольших молекул (к которым относится акридин и его производные) с ДНК или РНК являются интеркаляция и внешнее связывание [3].

В настоящее время продолжают исследования новых противовирусных и противоопухолевых препаратов акридинового ряда. Разрабатывается большой ряд алкалоидов и синтетических производных акридина, тестируемых как антиканцерогенные агенты. Среди них: амсакрин, 9-анилиноакридин, ледакрин, нитроакридин используются в клинической практике, а такие производные, как 4-карбоксамидоакридин, имидазоакридины [4], в настоящий момент подвергаются клиническим испытаниям. Существенный интерес представляют димеры акридина, дающие возможность оценить свойства, эффективность и механизм действия полимеризованных препаратов [4].

Ведется разработка комплексных препаратов солей акридиновой кислоты, не только стимулирующих противовирусную резистентность организма, но и обладающих прямой специфической противовирусной активностью. Проходят клинические испытания лекарственные препараты на основе акридинового ряда, комплексно влияющие на иммунитет и обеспечивающие защиту против особо опасных вирусных инфекций [5].

В процессе исследований механизма действия акридинов стало ясно, что активны именно плоские молекулы. Аминоакридины способны избирательно накапливаться в клеточных ядрах и других клеточных органоидах, содержащих нуклеиновые кислоты. Было установлено, что аминоакридины интеркалируют между парами оснований в двойную спираль ДНК.

В заключение можно отметить, что разработка новых подходов в синтезе акридинов открыла перспективы создания уникальных димерных соединений с высокой противоопухолевой активностью. Особенно привлекательны возможности создания противовирусных средств для лечения хронических вирусных инфекций. Относительная простота получения полимерных препаратов акридинового ряда позволяет существенно улучшать их фармакологические свойства и даже придавать им принципиально новые качества.

В настоящей работе методом UV-Vis спектрофотометрии исследована при физиологических условиях димеризация (самоассоциация) молекул одного из производных акридина – красителя акридинового оранжевого (АО).

В основе химического строения молекулы акридина оранжевого лежит положительно заряженная ароматическая гетероциклическая система, хромофор которой состоит из трёх плоских ароматических колец. В положениях 3 и 6 хромофора находятся две концевые гидрофобные диметиламиновые группы и незамещенный гетероатом азота в пиридиновом кольце (рисунок 1).

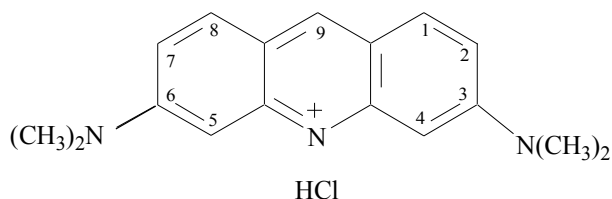


Рисунок 1 – Структурная формула молекул красителя – акридина оранжевого

Анализ самоассоциации красителя проведен на основе экспериментальных концентрационных и температурных зависимостей молярного коэффициента поглощения молекул с использованием димерной и бесконечномерной некооперативной моделей. Проведено теоретическое разделение экспериментальных спектров поглощения *АО* на составляющие и рассчитаны структурные и термодинамические параметры димерных комплексов.

Методика эксперимента

Электронные спектры поглощения исследуемых водных растворов красителя – гидрохлорида акридина оранжевого $C_{17}H_{19}N_3 \cdot HCl$ регистрировали на спектрофотометре СФ-46 в видимой области спектра (420-540 нм).

Краситель *АО* фирмы “Sigma” (США) использовали в экспериментах без дополнительной очистки. Все эксперименты проводили в условиях, близких к физиологическим. Исследуемый образец красителя высушивали при 363 К в течение 50 минут. Водные растворы красителя готовили методом последовательного разбавления в диапазоне концентраций $1 \cdot 10^{-6} \div 1 \cdot 10^{-2}$ М. Растворы красителя готовили в 0.1-М Na-фосфатном буфере с использованием бидистиллированной воды (рН 6.86). При регистрации спектров применяли стандартные стеклянные кюветы с длиной оптического пути 2.06; 1.09; 0.304; 0.202; 0.1; 0.0505; 0.0207; 0.0105 и 0.0053 см.

Термодинамические исследования самоассоциации молекул красителя проводили в диапазоне температур 293 ÷ 353 К с использованием специального проточного термостатируемого кюветодержателя. Температура в кюветах поддерживалась постоянной с помощью жидкостного термостата с точностью ± 0.15 К.

Результаты и их обсуждение

На рисунке 2 представлены электронные спектры поглощения *АО* в водном растворе с различной концентрацией красителя, зарегистрированные при температуре $T = 293$ К. Изменения спектров при увеличении концентрации красителя свидетельствуют об образовании ассоциатов *АО*. Из рисунка видно, что увеличение концентрации *АО* приводит к уменьшению общей поглощательной способности молекул (гипохромный эффект) в мономерной полосе при $\lambda_{\max} = 492$ нм и нарастанию нового коротковолнового максимума (гипсохромный эффект) с $\lambda_{\max} = 473$ нм. На длине волны 482 нм наблюдается изобестическая точка, свидетельствующая о существовании в растворе молекул *АО* в мономерной и димерной формах при концентрациях красителя $5 \cdot 10^{-5} \div 1 \cdot 10^{-6}$ М. Указанные особенности спектров поглощения красителя присущи процессу димеризации ароматических молекул посредством стэкинг-взаимодействия хромофоров [6]. Дальнейшее увеличение концентрации красителя ($> 5 \cdot 10^{-4}$ М) приводит к полному исчезновению исходной мономерной полосы и появлению полосы поглощения при длине волны $\lambda_{\max} = 460$ нм, что свидетельствует о сдвиге равновесия в сторону образования ассоциатов красителя более высокого порядка, чем димеры.

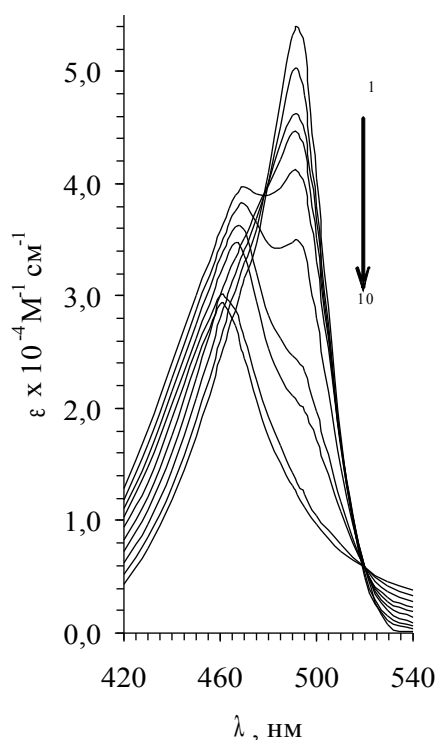


Рисунок 2 – Электронные спектры поглощения водного раствора акридина оранжевого (рН = 6.86; $T = 293$ К) при различных концентрациях красителя: 1 – $1 \cdot 10^{-6}$, 2 – $3 \cdot 10^{-6}$, 3 – $5 \cdot 10^{-6}$, 4 – $1 \cdot 10^{-5}$, 5 – $5 \cdot 10^{-5}$, 6 – $1 \cdot 10^{-4}$, 7 – $5 \cdot 10^{-4}$, 8 – $1 \cdot 10^{-3}$, 9 – $5 \cdot 10^{-3}$, 10 – $1 \cdot 10^{-2}$ М

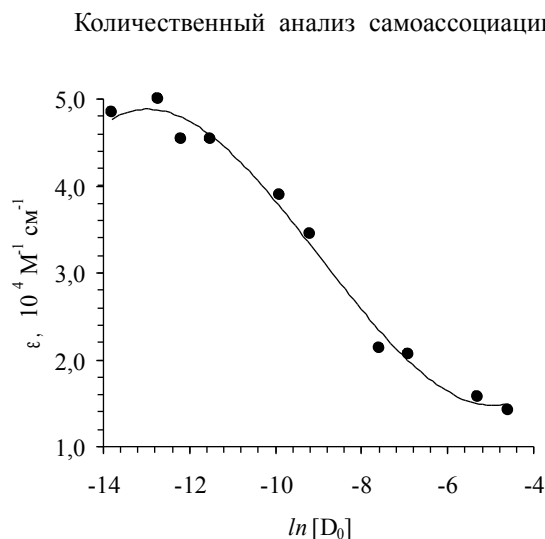


Рисунок 3 – Зависимость молярного коэффициента поглощения ($\lambda_{\text{max}} = 492$ нм) водного раствора акридина оранжевого (рН=6,86; T=293 К) от логарифма концентрации красителя

поглощения мономерной и димерной форм красителя. Рассчитанное по этой модели значение равновесной константы, составило $K_d = (3300 \pm 450)$ л/моль.

Для оценки вероятности образования агрегатов более высокого порядка, чем димеры, проведен анализ самоассоциации молекул с помощью бесконечномерной некооперативной модели [8]. Все константы равновесия в этом случае, для реакций $D_1 + D_j \xrightarrow{K_j} D_{j+1}$, предполагаются одинаковыми $K_1 = K_2 = \dots = K_j = K$. В результате расчетов получена следующая величина константы: $K = (4800 \pm 700)$ л/моль.

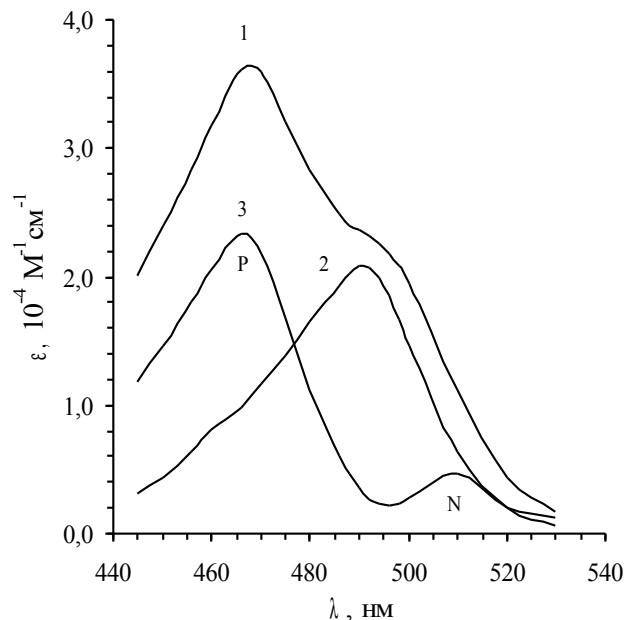


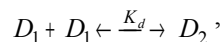
Рисунок 4 – Экспериментальный спектр поглощения водного раствора АО (1) (рН=6,86; T=293 К; $[D_0] = 5 \cdot 10^{-4}$ М) и разложение его на индивидуальные составляющие: 2 – спектр мономера; 3 – спектр димера

периодически фиксировались. Независимо от начальных значений варьируемых параметров, задаваемых по закону случайных чисел, практически на одних и тех же участках димерного спектра наблюдаются две полосы поглощения с максимумами на длинах волн $\lambda_P = 466$ нм и $\lambda_N = 510$ нм. Наблюдаемые Р и N – полосы, соответствующие электронным переходам молекул в димерном состоянии, хорошо согласуются с результатами, полученными в работе [9], и могут быть объяснены с помощью существующих теорий.

Количественный анализ самоассоциации молекул проведен по концентрационной зависимости молярного коэффициента поглощения АО на длине волны 492 нм (рисунок 3).

Нелинейный характер полученной зависимости подтверждает процессы агрегации лигандов в растворе.

При интерпретации экспериментальных данных использована следующая схема образования димерных комплексов:



где K_d – равновесная константа димеризации молекул, а D_1 и D_2 – мономерная и димерная формы исследуемых молекул. Зависимость молярного коэффициента поглощения раствора от концентрации АО (рисунок 3) описывалась выражением [7]:

$$\varepsilon = \varepsilon_d + (\varepsilon_d - \varepsilon_m) \frac{1 - \sqrt{1 + 8[D_0]K_d}}{4K_d[D_0]}$$

где $[D_0]$ – исходная (общая) концентрация молекул АО в растворе; ε_m и ε_d – молярные коэффициенты

Наблюдаемые электронные спектры акридина оранжевого являются результатом наложения индивидуальных полос, соответствующих тем или иным электронным переходам, что существенно затрудняет проведение количественного анализа. Для выявления индивидуальных полос поглощения с целью анализа контура димерной составляющей в настоящей работе проведено разложение экспериментального спектра АО на мономерную и димерную полосы (рисунок 4) с использованием численного значения параметра K_d .

Разложению спектров предшествовала обработка серий экспериментальных спектров на основе димерной модели. В ходе совместной обработки серии концентрационных зависимостей в диапазоне концентраций красителя $5 \cdot 10^{-4} \div 10^{-6}$ М (в интервале длин волн 445 ÷ 530 нм) рассчитывались значения молярных коэффициентов поглощения $[\varepsilon_m(\lambda), \varepsilon_d(\lambda)]$ методом наименьших квадратов.

С целью уменьшения размерности задачи в ходе минимизации функции – невязки определённые группы варьируемых параметров

Согласно теории Фёрстера [10], взаимная ориентация моментов переходов (осцилляторов) молекул в димерных комплексах может быть нарушена, вследствие тепловых колебаний или структурной асимметрии обеих молекул. В случае не соблюдения строгой параллельности моментов переходов молекул система – связанных осцилляторов описывается двумя нормальными колебаниями [10], в каждом из которых участвуют отдельные осцилляторы (молекулы, составляющие димер) с одинаковыми амплитудами. Колебания одних связанных осцилляторов имеют одинаковую фазу, а других – отличающуюся на 180° . Собственные частоты димеров обусловлены сопряжением молекул, которые в случае симметричных колебаний дают интенсивный пик поглощения, а в случае антисимметричных – слабое поглощение. Связанным осцилляторам, имеющим одинаковую фазу колебаний, соответствует более высокая частота по сравнению с мономерными осцилляторами, а антисимметричным – более низкая, т.е. при образовании димера полоса поглощения изолированных осцилляторов (невзаимодействующих мономеров) расщепляется. Расщепление спектра димерных комплексов получено и квантово - механически [11]: из решения уравнения Шредингера $\hat{H}\Psi = E\Psi$. Гамильтониан $\hat{H}$ состоит из трёх операторов: $\hat{H} = \hat{H}_1 + \hat{H}_2 + \hat{V}_{12}$; где $\hat{H}_1$ и $\hat{H}_2$ гамильтонианы изолированных молекул 1 и 2, $\hat{V}_{12}$ – потенциал межмолекулярного взаимодействия. Волновые функции и соответствующие им собственные значения полного гамильтониана $\hat{H}$ имеют вид:

$$\Psi' = 2^{-1/2}(\psi_1^* \psi_2^+ - \psi_1 \psi_2^*); E' = E_1^* + E_2 + \iint \psi_1^* \psi_2^* \hat{V}_{12} \psi_1 \psi_2 d\tau_1 d\tau_2 + \iint \psi_1^* \psi_2 \hat{V}_{12} \psi_1^* \psi_2^* d\tau_1 d\tau_2$$

$$\Psi'' = 2^{-1/2}(\psi_1^* \psi_2^- - \psi_1 \psi_2^*); E'' = E_1^* + E_2 + \iint \psi_1^* \psi_2^- \hat{V}_{12} \psi_1 \psi_2 d\tau_1 d\tau_2 - \iint \psi_1^* \psi_2 \hat{V}_{12} \psi_1^* \psi_2^* d\tau_1 d\tau_2$$

где ψ_1 и ψ_2 – волновые функции отдельных молекул 1 и 2, образующих димер (с энергией E_1 и E_2), ψ_1^* и ψ_2^* – волновые функции возбужденного состояния (с энергией E_1^* и E_2^*), а τ_1 и τ_2 – координаты молекул 1 и 2. Последний член в выражениях E' и E'' соответствует Ван-дер-ваальсовому взаимодействию молекул и описывает расщепление димерного уровня. Ван-дер-ваальсово взаимодействие молекул несколько смещает энергетический уровень димера относительно уровня изолированных молекул.

Положение и интенсивность расщепленных полос (рисунок 4) могут быть использованы для получения информации о структуре димерных комплексов [9]. Предположив, что расстояние между хромофорами молекул в димерах неизменно (принцип Франка-Кондона), можно получить “усредненное” значение угла, отражающего взаимную ориентацию дипольных моментов [10]: $\alpha = 2 \arctg \sqrt{\epsilon_N / \epsilon_P}$, где ϵ_N и ϵ_P – молярные коэффициенты поглощения, соответствующие максимумам полос поглощения P и N .

Расчетное значение угла α для димеров AO составило 47° . Отношение $\epsilon_N / \epsilon_P = 0.19$ в водном растворе мало, что согласуется с экситонной теорией [11], слабая интенсивность N – полосы, наблюдаемая в длинноволновой области спектра, свидетельствует о нестрогой параллельности плоскостей молекул AO в димере [9].

Дополнительную информацию к той, что даёт константа самоассоциации о стабильности димерного комплекса, можно получить из анализа термодинамики перехода молекул из более ассоциированного состояния в менее упорядоченное состояние.

При повышении температуры наблюдался рост поглощения, сопровождающийся небольшим смещением максимума полосы в коротковолновую область, свидетельствующий о разрушении ассоциатов молекул.

Полного восстановления спектра, соответствующего разбавленному раствору, при нагревании не наблюдалось, что, возможно связано не только с разрушением ассоциатов, но и переходом части молекул в лейкоформу.

На основе предположения, что деформация спектров в интервале температур $293 \div 353$ К вызвана в основном изменением количества мономеров и димеров AO в растворе, проведена оценка констант равновесия при различных температурах по экспериментальным концентрационным зависимостям (рисунок 5).

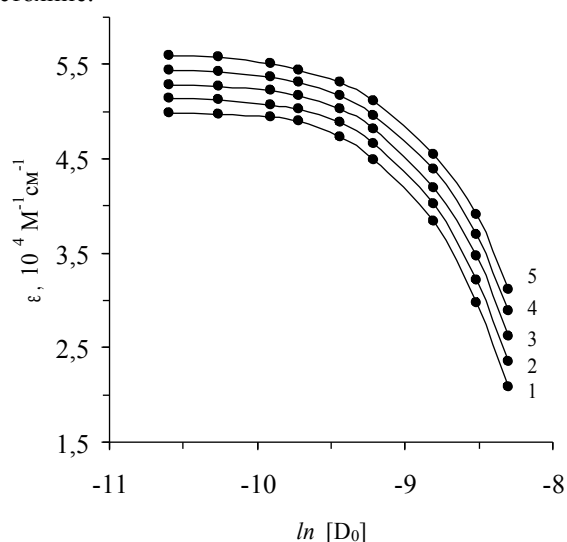


Рисунок 5 – Зависимость молярного коэффициента поглощения на длине волны $\lambda = 492$ нм водного раствора AO от логарифма концентрации красителя при различных температурах: 1 – 293 К; 2 – 313 К; 3 – 323 К; 4 – 333 К; 5 – 353 К

Оценка термодинамических параметров реакции димеризации молекул проведена по зависимости Вант-Гоффа $\ln K_d = f(1/T)$ (рисунок 6).

Энтальпия оценивалась по величине тангенса угла наклона аппроксимирующей прямой в соответствии с соотношением Вант-Гоффа:

$$\frac{d(\ln K_d)}{d(1/T)} = - \left(\frac{\Delta H}{R} \right). \quad (1)$$

Энтропия рассчитывалась из свободной энергии Гиббса $\Delta G = - (RT \ln K_d)$ и энтальпии:

$$\Delta S = - (\Delta G - \Delta H)/T. \quad (2)$$

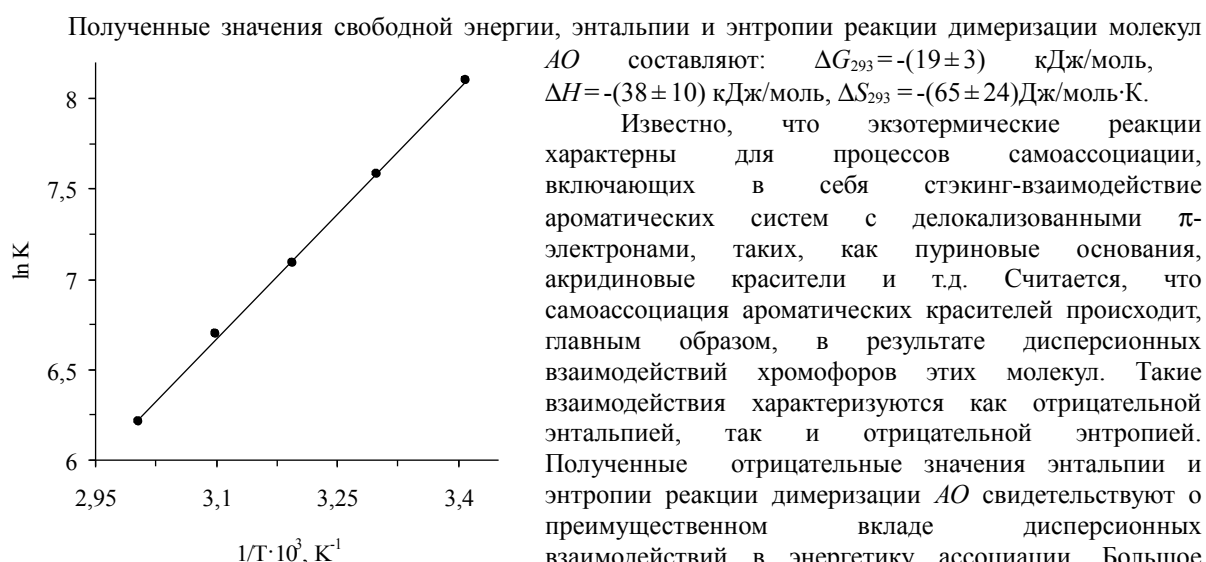


Рисунок 6 – Зависимость логарифма константы димеризации акридина оранжевого в водном растворе (pH = 6.86) от обратной температуры

Библиографический список

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. — М.: Медицина, 2001. — 456 с.
2. Antimicrobial activity of 9-oxo and 9-thioacridines: correlation with intercalation into DNA and effects on macromolecular biosynthesis / A. Credmieux, J. Chevalier, D. Sharples, H. Berny, A.M. Galy, P. Brouant, J.P. Galy, J. Barbe // Res. Microbiol. — 1995. — V. 146. — P. 73–83.
3. Carlson C.B. Solid-phase synthesis of acridine-based threading intercalate peptides / C.B. Carlson, P.A. Beal // Bioorg. & Medicin. Chem. Letters. — 2000. — V. 10. — P. 1979–1982.
4. Bisimidazoacridones and related compounds: new antineoplastic agents with high selectivity against colon tumors / W.M. Cholody, L. Hernandez, L. Hassner, D.A. Scudiero, D.B. Djurickovic, C.J. Michejda // J. Med. Chem. — 1995. — V. 38. — P. 3043–3052.
5. Павловская Я.В. Изучение противовирусной активности препарата Циклорема, обладающего прямой противовирусной активностью и способностью к индукции интерферона / Я.В. Павловская, О.И. Киселев, Л.Ф. Литвинчук // Тез. науч. конф. «Новые препараты в профилактике, терапии и диагностике вирусных инфекций». — СПб., 2002. — С. 15–16.
6. Piosik J. The modulation by xanthines of the DNA-damaging effect of polycyclic aromatic agent. Part II. The stacking complexes of caffeine with doxorubicin and mitoxantrone / J. Piosik, M. Zdunek, J. Kapuscinski // Biochem. Pharm. — 2002. — V. 63. — P. 635–646.
7. Барановский С.Ф. Исследование самоассоциации фенантридинового красителя в водном растворе методом спектрофотометрии / С.Ф. Барановский, Е.В. Глобина, П.А. Болотин // Вестник СевГТУ. Сер. Физика и математика. — Севастополь, 2004. — Вып. 59. — С. 87–93.
8. Барановский С.Ф. Агрегация 1,3,7-триметилксантина с метиленовым голубым в водном растворе / С.Ф. Барановский, П.А. Болотин, М.П. Евстигнеев // Журн. прикл. Спектроскопии. — 2006. — Т. 73. — № 2. — С. 158–163.
9. Patil K.J. Self-aggregation of Methylene Blue in aqueous medium and aqueous solutions of Bu_4NBr and urea / K.J. Patil, R.B. Pawar, P.D. Talap // Phys. Chem. Chem. Phys. — 2000. — V. 2. — P. 4313–4317.
10. Förster Th. Fluoreszenz organischer Verbindungen / Th. Förster. — Göttingen, 1951. — 254 p.
11. Kasha M. Energy Transfer Mechanisms and the Molecular Exciton Model for Molecular Aggregates / M. Kasha // Rad. Res. — 1963. — V. 20. — P. 55–70.

Поступила в редакцию 17.05.2006 г.