

УДК 54-126:547.458:678.6

Масс-спектрометричне дослідження комплексу включення β -циклодекстрину з альбуміном

С.В. Рябов, В.В. Бойко, В.І. Бортницький, Т.В. Дмитрієва, І.В. Бабич, Ю.Ю. Керча

Інститут хімії високомолекулярних сполук НАН України
48, Харківське шосе, Київ, 02160, Україна

Методом піролітичної мас-спектрометрії досліджено комплекс включення β -циклодекстрину з бичачим сироватковим альбуміном (БСА). Показано різницю термічної стабільності комплексу включення та механічної суміші його компонентів.

Ключові слова: циклодекстрини, комплекси включення, білки, бичачий сироватковий альбумін, мас-спектрометрія.

Циклодекстрини (ЦД) – одні з перших макроциклів, для яких була виявлена та детально досліджена їхня здатність до утворення комплексів включення з різними органічними молекулами [1]. Ця властивість ЦД широко використовується, зокрема, в фармацевтичній індустрії для підвищення біодоступності багатьох лікарських сполук [2]. Вельми перспективне застосування ЦД та їх функційних похідних для транспорту протеїнівмісних препаратів в організмі людини [3, 4].

Метою цієї роботи було дослідження методом піролітичної мас-спектрометрії комплексу включення β -циклодекстрину (β -ЦД) з бичачим сироватковим альбуміном (БСА). Останній – широко вживаний модельний об'єкт для вивчення властивостей глобулярних білків, зокрема він застосовується як стандарт для кількісного визначення білків і молекулярної маси білків в електрофорезі та рідинній хроматографії.

Експериментальна частина.

β -ЦД – продукт фірми “Fluka”. Перед проведенням експериментів β -ЦД сушили у вакуумі за температури 100 °С протягом 12 год. Мол. маса β -ЦД становить 1135, а його мономерного фрагмента ($C_6H_{10}O_5$) 162 відповідно.

Бичачий сироватковий альбумін (білок плазми крові великої рогатої худоби) – продукт фірми “Sigma”, ММ ~64000 Да. Має один ланцюг (витягнута глобула з розмірами 40x140 ангстрем), який містить близько 600 амінокислотних залишків.

Комплекс включення (КВ) за співвідношення β -ЦД:БСА = 1:2 отримували таким методом: 50 мг бичачого сироваткового альбуміну розчиняли в 20 мл 0,01 М фосфатного буферного розчину (рН 8) за кімнатної температури. Потім додавали при перемішуванні 25 мг β -ЦД, і після його розчинення ще перемішували суміш протягом 2 год., ліофільно висушуючи для отримання цільового продукту.

Для порівняння використовували зразок механічної суміші β -ЦД з БСА за співвідношення 1:2.

Всі досліджувані об'єкти вивчали методом піролітичної мас-спектрометрії (ПМС), який дає змогу оцінити структурні особливості полімерних молекул за складом продуктів їх термодеструкції [5, 6].

Вивчення складу летких продуктів та інтенсивності їх виділення при піролізі досліджуваних зразків проводили на мас-спектрометрі МХ-1321, який забезпечує визначення компонентів газових сумішей в діапазоні масових чисел 1–4000. Перед проведенням досліджень зразки вакуумували протягом 30 хв. за температури 25 °С безпосередньо у вічку мас-спектрометра. Маса зразків вихідних β -ЦД і БСА становила 0,25 мг, а комплексу та фізичної суміші – 0,50 мг. Дослідження проводили у відповідності з методикою, описаною в [7]. Обробку мас-спектрів летких продуктів термодеструкції об'єктів дослідження проводили за спеціально розробленою комп'ютерною програмою,

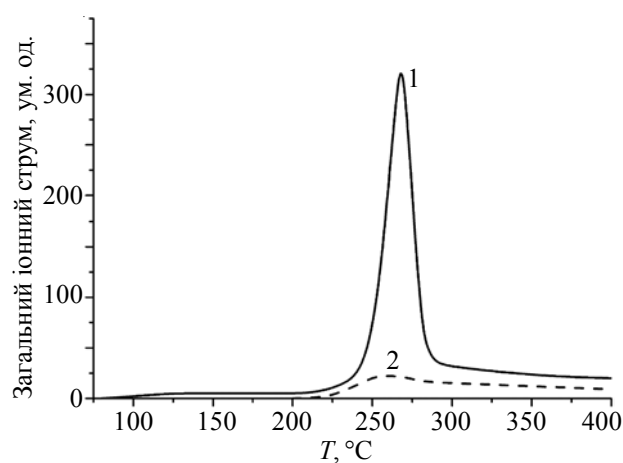


Рис. 1. Температурна залежність загального іонного струму виділення летких продуктів термодеструкції: β -ЦД (1) і БСА (2)

Таблиця 1. Температура розкладання (T), загальний іонний струм (J) і кількість іонних фрагментів (K) при піролізі β -ЦД, БСА, суміші БСА з β -ЦД (2:1) та комплексу БСА з β -ЦД (2:1)

Об'єкт дослідження	T , °C	J , ум.од.	K , од.
β -ЦД	270	330	71
БСА	260	22	10
БСА : β -ЦД (2:1) механічна суміш	270	207	98
БСА : β -ЦД (2:1) комплекс	260	16	7

яка дає можливість реєструвати інтенсивність кожного газоподібного продукту за інтегральною площею під відповідним піком. Вивчали температурну залежність зміни інтенсивності виділення летких продуктів термодеструкції досліджуваних об'єктів (загальний іонний струм (J)), склад іонних фрагментів, що утворюються при піролізі зразків. Інтенсивність (I) виділення окремих летких продуктів (іонних фрагментів) відображали в умовних одиницях. Отримані мас-спектри продуктів деструкції порівнювали з мас-спектрами каталогів [8, 9].

Результати та їх обговорення.

Як видно з рис. 1, β -ЦД (крива 1) і БСА (крива 2) розкладаються за однакового температурного діапазону (225–300 °C) з максимумом виділення летких компонентів за температури 270 і 260 °C відповідно.

При піролізі β -ЦД за температури 270 °C утворюється 71 леткий продукт із загальним іонним струмом 330 ум. од. (табл. 1).

Найбільш інтенсивним іонним фрагментом у мас-спектрі β -ЦД, знятому за цієї температури, є вода ($m/z = 18$), далі за інтенсивністю реєструються леткі компоненти, що утворюються при розриві мономерного – глюкопіранозного кільця, а саме леткі з $m/z = 60$ ($O=CH-CH_2OH$), 31 ($-CH_2OH$), 29 ($O=CH-$), 44 (CH_3CHO , CH_2CHOH), 43 (CH_2CHO), 73 ($CHCHOHCHOH$) (табл. 2). Фрагментами глюкопіранозного кільця за відніманням двох або однієї молекули води, відповідно, є леткі з $m/z = 126$ і 144. Останній найбільший за молекулярною масою іонний фрагмент, що реєструється в мас-спектрі β -ЦД.

Мас-спектр БСА складається усього з 10 летких продуктів із загальним іонним струмом 22 ум. од. (табл. 1). Найбільш інтенсивний діоксид вуглецю ($m/z = 44$) та

Таблиця 2. Вірогідний склад іонних фрагментів та інтенсивність їх виділення (J) в мас-спектрах при піролізі β -ЦД, БСА і суміші БСА з β -ЦД (2:1)

m/z	Іонний фрагмент	$I \cdot 10^4$, ум. од.			
		β -ЦД	БСА	БСА + β -ЦД (2:1)	
				суміш	комплекс
		270 °C	260 °C	270 °C	260 °C
15	CH_3^-	0,67	-	0,70	-
16	NH_2^- , CH_4	0,09	0,17	1,03	-
17	OH^- , NH_3^-	1,96	0,32	3,09	0,05
18	H_2O , NH_4^+	8,37	0,49	8,04	0,41
27	C_2H_3	0,73	0,05	0,97	-
28	CO , C_2H_4	1,55	0,01	2,87	0,06
29	$-C_2H_5$, CHO	2,48	-	2,32	0,09
31	$-CH_2OH$	2,50	-	2,73	0,11
32	CH_3OH	0,86	-	1,17	-
39	C_3H_3	0,56	-	0,66	-
41	C_3H_5	0,85	0,07	1,10	-
42	C_3H_6	0,83	-	1,04	-
43	C_3H_7 ; CH_2CHO	2,36	0,05	3,30	0,11
44	CO_2 ; CH_3CHO , CH_2CHOH	2,53	0,42	6,17	0,19
45	CH_3CHOH , $-COOH$	0,54	-	0,61	-
55	C_3H_3O	0,86	0,01	0,86	-
57	C_4H_9	1,65	-	0,67	-
60	$O=CH-CH_2OH$	2,82	-	0,51	-
72	$HOCCCH_2CHO$	0,34	-	0,11	-
73	$CHCHOHCHOH$	1,18	-	0,16	-
74	$C_4H_{10}O$, C_6H_2	0,30	-	0,17	-
85	C_5H_9O	0,36	-	0,42	-
97	C_6H_9O	0,54	-	0,23	-
126	$C_6H_{10}O_5 - 2 H_2O$	0,43	-	0,25	-
144	$C_6H_{10}O_5 - H_2O$	0,26	-	-	-

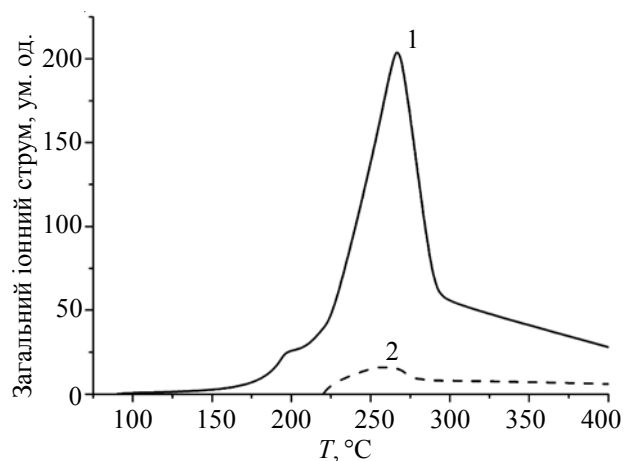


Рис. 2. Температурна залежність загального йонного струму виділення летких продуктів термодеструкції: β -ЦД + БСА (1:2, механічна суміш) (1); β -ЦД + БСА (1:2, комплекс включення) (2)

два летких компоненти з $m/z = 18$ (H_2O та NH_4^+), а також два йонних фрагменти з $m/z = 17$ (OH^- , NH_3^-) і $m/z = 16$ (NH_2^-).

На рис. 2 наведені термограми фізичної суміші β -ЦД з БСА за співвідношення 1:2 (крива 1) і КВ β -ЦД з БСА за такого ж співвідношення (крива 2).

Як видно з рис. 2 та табл. 1, максимальне виділення летких компонентів для механічної суміші спостерігається за температури 270 °С, коли утворюється 98 йонних фрагментів, що на 38 % більше, ніж при розкладанні вихідного β -ЦД. Питома інтенсивність летких продуктів, що реєструються в мас-спектрі обох компонентів (наприклад, $m/z = 16$; 17; 18; 27; 28; 41;

43; 44 (табл. 2), зростає, в той же час для йонних фрагментів, які утворились внаслідок руйнування глюкопіранозного кільця, питома інтенсивність значно зменшилась, навіть враховуючи меншу кількість β -ЦД у зразку суміші (леткого з $m/z = 60$ майже в 5,5 раза, з $m/z = 72$ - в 3 рази, з $m/z = 73$ - в 7 разів). Такі зміни, можливо, відбуваються за рахунок взаємодії NH_2 -груп амінокислот БСА з гідроксилами, розміщеними біля 6-го атома вуглецю на нижньому вінці молекули β -ЦД.

Комплекс β -ЦД з БСА має максимум термодеструкції за температури 260 °С. У порівнянні з сумішшю, за цієї температури всі показники термодеструкції комплексу значно менші (табл. 1). Так, кількість йонних фрагментів зменшується в 14 разів (з 98 од. до 7), а їх загальний йонний струм – у 13 разів. Менша і питома інтенсивність летких компонентів (табл. 2). Слід зазначити, що показники термодеструкції комплексу менші й у порівнянні з вихідним БСА. В мас-спектрі КВ повністю відсутні легкі продукти, що характерно для вихідного β -ЦД (табл. 2), а саме компоненти з $m/z = 32, 39, 41, 42, 45, 55, 57, 60, 72, 73, 74, 85, 97, 126$ і 144 . Це може свідчити про виникнення в комплексі включення взаємодій між амінокислотними залишками БСА та функційними групами β -ЦД.

Отже, аналіз результатів, отриманих методом ПМС, показав що β -циклодекстрин утворює певний тип комплексу включення з бичачим сироватковим альбуміном і це дає підстави для подальших досліджень з метою створення нових систем циклодекстрини – протеїни, перспективних для розробки сучасних лікарських форм.

Література

1. Химия комплексов «гость-хозяин». Синтез, структура и применение / Под ред. Р.Регтле, Э.Вебер.- Пер. с англ.- М.: Мир, 1998. - 511 с.
2. Cyclodextrins and their Complexes chemistry, Analytical Methods, Applications / Ed. H. Dodziuk.- Wiley-VCH, Weinheim. – 2006.
3. Yamamoto T., Yoshikiyo K. // Organic Chemistry - 2011, 15, No. 6. - P. 831-838.
4. Szejtli J. // Chem. Rev. - 1998. - 98. - P. 1743-1753.
5. Хмельницкий Р.А., Лукашенко И.М., Бродский Е.С. Пиролитическая масс-спектрометрия высокомолекулярных соединений. – М.: Химия, 1980. - 280 с.
6. Мадорский С. Термическое разложение органических полимеров / Пер. с англ.- М.: Мир, 1967.- 328 с.
7. Бойко В.В., Рябов С.В., Кобрин Л.В., Дмитриева Т.В., Штомпель В.И., Гайдук Р.Л., Керча Ю.Ю. // Укр. хим. журн.- 2007.- 73, № 7. - С. 51-60.
8. Каталог сокращенных масс-спектров.- Новосибирск: Наука, 1981.- 187 с.
9. Бейнон Дж. Масс-спектрометрия и ее применение в органической химии / Пер. с англ.- М.: Мир, 1964.- 701 с.

Надійшла до редакції 10 квітня 2012 р.

Масс-спектрометрическое исследование комплекса включения β -циклодекстрина и альбумина

С.В. Рябов, В.В. Бойко, В.І. Бортницький, Т.В. Дмитрієва, І.В. Бабич, Ю.Ю. Керча

Институт химии высокомолекулярных соединений НАН Украины
48, Харьковское шоссе, Киев, 02160, Украина

Методом пиролитической масс-спектрометрии исследован комплекс включения β -циклодекстрина с бычьим сывороточным альбумином (БСА). Показаны различия термической стабильности комплекса включения и механической смеси его компонентов.

Ключевые слова: циклодекстрины, комплексы включения, белки, бычий сывороточный альбумин, масс-спектрометрия.

Mass-spectrometry study of β -cyclodextrin inclusion complex with albumin

S.V. Riabov, V.V. Boyko, V.I. Bortnytsky, T.V. Dmytrieva, I.V. Babych, Yu. Yu. Kercha

Institute of Macromolecular Chemistry NAS of Ukraine
48, Kharkivske shause, Kyiv, 02160, Ukraine

Inclusion complex of β -cyclodextrin and bovine serum albumin (BSA) was obtained and studied by pyrolytic mass-spectrometry. The differences in thermal stability of complex and mechanical mixture of its components were showed.

Key words: cyclodextrins, inclusion complexes, proteins, bovine serum albumine, mass-spectrometry.