

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ α - И β -ЦИКЛОДЕКСТРИНА С РЯДОМ АРОМАТИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ МЕТОДОМ УФ СПЕКТРОСКОПИИ

Д.Ю. Ляшенко

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины,
ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина, e-mail:isc412@ukr.net*

Методом УФ спектроскопии изучено взаимодействие α - и β -циклодекстрина с ароматическими аминокислотами, которые отличались размером молекул, строением радикала у α -углеродного атома, а также соотношением компонентов в водном растворе с разным рН (L-фенилаланином, L-тирозином и L-триптофаном). Выявлены особенности взаимодействия аминокислот с циклодекстринами при образовании соединения включения " α -, β -циклодекстрин–ароматическая аминокислота" типа "хозяин–гость" состава 1:1 с катионной, молекулярной и цвиттер-ионной формами кислот.

Показано, что комплексы включения типа "хозяин–гость" образуются с помощью неспецифических межмолекулярных взаимодействий, а также слабых водородных связей при погружении бензольного кольца молекул аминокислот в гидрофобную полость молекулы α - или β -циклодекстрина.

Продемонстрировано, что слабая водородная связь может образоваться между атомом азота аминокислотной группы или атомом кислорода карбоксильной группы молекулы аминокислоты и атомом водорода первичной гидроксильной группы, расположенной на поверхности широкого края тора, а также внутри полости циклодекстрина между атомом азота аминокислотной группы молекулы L-триптофана и атомом водорода глюкопиранозного звена. Рассчитаны величины констант устойчивости (K_s) комплексов и термодинамические параметры образования соединений включения (ΔG , ΔH и ΔS).

Ключевые слова: *УФ спектроскопия, α -циклодекстрин, β -циклодекстрин, L-фенилаланин, L-тирозин, L-триптофан, комплексы включения типа "хозяин–гость", константа устойчивости, термодинамические параметры*

Введение

Незаменимые ароматические альфа аминокислоты (ААК) L-триптофан (L-Trp), L-фенилаланин (L-Phe) и условно-незаменимая аминокислота L-тирозин (L-Tyr), синтезируемый организмом из фенилаланина, химически неустойчивы и разрушаются под действием света и влаги, а также сильно агрегируют. Лекарственные соединения, в состав которых входят эти аминокислоты, выпускаются фармацевтической промышленностью в виде капсул, содержащих L-форму индивидуальной кислоты, или используются в качестве биодобавки. L-форма в препаратах со временем самопроизвольно переходит в ее неактивную D-форму. Поэтому для предотвращения процесса рацемизации и уменьшения агрегации, а также увеличения стабильности аминокислот в качестве стабилизирующих веществ используют желатин, диоксид кремния или титана. В последнее время для стабилизации аминокислот, среди прочих веществ, авторы [1, 2] предлагают использовать в качестве таких соединений циклодекстрины. Результаты изучения применения

аминокислот в твердом комплексе для предотвращения агрегирования и стабилизации описаны в [3, 4].

Данные исследования основаны на таком важном свойстве циклодекстринов как способность связывать различные молекулы, так называемые “гости”, в своей гидрофобной полости, при этом, не образуя ковалентных связей. Среди факторов, определяющих комплексообразующую способность циклодекстринов по отношению к аминокислотам, можно назвать такие как влияние среды и сольватационных свойств “хозяина”, “гостя” и комплекса, соответствие геометрических размеров “хозяина” и “гостя”, асимметрию полости циклодекстринов [5].

В литературе имеются отрывочные сведения, касающиеся взаимодействия ароматических аминокислот с циклодекстринами в водных растворах. Так, в работах [6, 7] при изучении взаимодействия α - и β -циклодекстринов в калориметрическом режиме при 25 °С в чистой воде и в фосфатном буфере (рН 11.3) с ароматическими аминокислотами, а именно с L-фенилаланином, L-тирозином, L-триптофаном и L-гистидином, рассчитаны константы устойчивости комплексов включения типа “хозяин–гость” и получены основные термодинамические характеристики комплексообразования. С помощью конкурентной спектрофотометрии (метод изучения устойчивости комплексов включения) [8] и путем потенциометрического титрования [9], определены константы связывания молекул циклодекстрина с аминокислотами и дипептидами. Авторами этих работ было показано, что α -амино и α -карбоксилатные группы аминокислот не могут включаться в полость α -ЦД, но они могут взаимодействовать с гидроксильными группами, расположенными на поверхности широкого края гидрофобной полости циклодекстрина, образуя слабые водородные связи. В работе [10] методом микрокалориметрии при 25 °С в фосфатном буфере (рН 7.4) изучено взаимодействие α - и β -циклодекстрина с L-триптофаном, определены термодинамические параметры и константы устойчивости при формировании комплексов включения.

В данной работе представлены результаты изучения влияния взаимодействия молекул L-фенилаланина, L-тирозина и L-триптофана, отличающихся строением радикала у α -атома углерода и геометрическими параметрами, на возможность образования в растворе устойчивых комплексов включения типа “хозяин–гость” с макроциклическим соединением α - или β -циклодекстрином. Варьировалось также соотношение компонентов в растворе и величина рН.

Экспериментальная часть

Исследование взаимодействия α - и β -циклодекстрина с альфа ароматическими аминокислотами, а именно с L-фенилаланином, L-тирозином и L-триптофаном (Реахим, Россия) (табл. 1) проводили в водных растворах при постоянном рН. В работе использовали α -циклодекстрин гидрат (α -ЦД) формулы $C_{36}H_{60}O_{30} \cdot 7.5H_2O$ (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Germany) и β -циклодекстрин (β -ЦД) (ACRÖS ORGANICS, количество воды в полости составляло 12%).

Для исследования комплексообразования готовили водный (0.01 М) раствор α - или β -циклодекстрина и ААК (0.01 – 0.0001 М). Растворы содержали одинаковые концентрации компонентов или избыток циклодекстрина. рН создавали с помощью хлористоводородной кислоты с рН 1.00 или фосфатного буфера с рН 6.86. Полученные растворы выдерживали в термостате Labortechnik GmbH 77960 при 285, 291 или 298 К в течение 0.5 ч, при дальнейшем исследовании с помощью УФ электронной спектроскопии.

УФ спектры поглощения исходных растворов ААК и в присутствии циклодекстрина регистрировали на спектрофотометре Specord M-40 в интервале длин волн

$\lambda = 220\text{--}350$ нм: с β -ЦД в кварцевых кюветах толщиной 1.0, а с α -ЦД – 0.5 или 2.0 см соответственно.

Таблица 1. Характеристики ароматических аминокислот

Ароматическая аминокислота	Молекулярная масса, Da	pK_a^*	ρl	Объем молекулы, \AA^3
L-Phe	165.19	2.20	5.65	189.9
L-Tyr	181.19	9.09 2.24	5.64	193.6
L-Trp	204.29	9.04 2.35 9.33	5.84	227.8

*[11], **[12, 13]

Диаграммы распределения протолитических форм ААК в зависимости от рН рассчитывали с помощью программы CurTipot V.3.5.4, рН растворов измеряли на иономере И 160МИ.

Оптимизацию геометрии молекул ААК, α - и β -циклодекстринов и их комплексов включения с аминокислотами осуществляли с помощью программы HyperChem8.0 методом Хартри-Фока в полуэмпирическом приближения РМЗ.

При избытке циклодекстрина в растворе, расчет констант устойчивости проводили с использованием уравнения Кетелара [14]:

$$\frac{1}{(A - A_0)} = \frac{1}{a} + \frac{1}{aK_s[\alpha(\beta) - \text{ЦД}]_0}, \quad (1)$$

где A и A_0 – оптическая плотность раствора ААК в присутствии α - или β -ЦД и без него соответственно; a – константа, которая определяется как разность между коэффициентами экстинкции комплекса и кислоты при одной длине волны.

Для равных в растворе концентраций циклодекстрина и ААК константы устойчивости для комплексов состава 1:1 определяли по уравнению [14]:

$$K_s = \frac{[\alpha(\beta) - \text{ЦД} \cdot \text{L} - \text{ААК}]}{C_{\text{ААК}} - [\alpha(\beta) - \text{ЦД} \cdot \text{L} - \text{ААК}]^2}, \quad (2)$$

а K_s рассчитывали из уравнения

$$\frac{C_{\text{ААК}}}{\sqrt{D^\lambda}} = \frac{\sqrt{D^\lambda}}{\varepsilon^\lambda} + \frac{1}{\sqrt{K_{\varepsilon^\lambda}}},$$

строая график зависимости $\frac{C_{\text{ААК}}}{\sqrt{D^\lambda}}$ от $\sqrt{D^\lambda}$, где $C_{\text{ААК}}$ – концентрация аминокислоты, моль/л;

D^λ – оптическая плотность раствора ААК в присутствии α - или β -ЦД; K_s – константа устойчивости комплекса включения состава 1:1; ε^λ – коэффициент экстинкции комплекса, л/(моль·см).

Вероятность образования комплексов включения состава 2:1 при большом избытке циклодекстрина $C_{\alpha, \beta\text{-ЦД}} \gg C_{\text{ААК}}$, определяли из графика:

$$\frac{C_{\text{ААК}} \cdot l}{D^\lambda} = \frac{1}{\varepsilon^\lambda} + \frac{1}{K_s \cdot \varepsilon^\lambda \cdot C_{\alpha(\beta\text{-ЦД})}^2}, \quad (3)$$

Расчет константы устойчивости комплекса включения проводили, строя график зависимости

$$C_{\text{ААК}} \cdot l / D^{\lambda} \text{ от } C_{\alpha-, (\beta\text{-ЦД})}^2$$

где $C_{\text{ААК}}$ – концентрация ароматической аминокислоты, моль/л; D^{λ} – оптическая плотность раствора ААК в присутствии α - или β -ЦД; K_s – константа устойчивости комплекса включения для состава 2:1; ε^{λ} – коэффициент экстинкции комплекса, л / (моль·см), l – толщина кварцевой кюветы, см.

Абсолютную ошибку определения величин констант устойчивости рассчитывали, как описано в работе [15].

Термодинамические параметры комплексообразования ААК с α - или β -ЦД были найдены с использованием уравнения Вант-Гоффа. Свободную энергию Гиббса (ΔG) определяли по формуле:

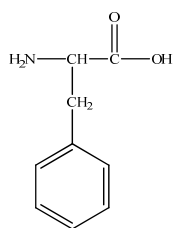
$$\Delta G = -RT \ln K_s.$$

Значения изменения энтальпии (ΔH) и энтропии (ΔS) для процесса комплексообразования определяли с применением нижеприведенной формулы путем построения графика зависимости логарифма константы устойчивости ($\ln K_s$) от обратной температуры ($1/T$):

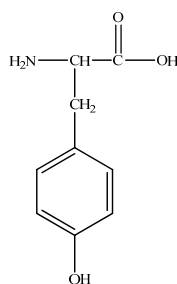
$$\ln K_s = \frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{RT}.$$

Результаты и обсуждение

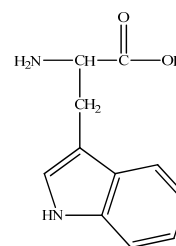
Выбранные для исследования ароматические α -аминокислоты (их формулы приведены ниже) отличаются строением и размерами молекул, но имеют общую хромофорную группу – бензольное кольцо. L-фенилаланин по химическому строению представляет собой аминокислоту аланин, в которой один из атомов водорода замещён фенильной группой, L-тирозин, отличается от L-фенилаланина наличием фенольной гидроксильной группы в пара-положении бензольного кольца, а L-триптофан относится к ряду гидрофобных аминокислот, поскольку содержит ароматическое ядро индола.



L-Фенилаланин



L-Тирозин



L-Триптофан

В водных растворах аминокислоты находятся в четырех формах: катиона, молекулы, цвиттер-иона и аниона. Диаграммы распределения их протолитических форм в зависимости от pH раствора представлены на (рис. 1а, б, в). В кислой области с pH 1.00 молекула аминокислоты существует в виде катиона, а в интервале pH от 4.00 до 7.00 – в молекулярной и цвиттер-ионной формах.

При исследовании образования комплексов включения типа “хозяин–гость” метод электронной спектроскопии дает информацию об изменении окружения хромофорных групп молекулы “гостя”, которое происходит при их погружении в неполярную полость

тора молекулы циклодекстрина. При этом в спектре часто регистрируется изменение интенсивности полос поглощения, без изменения характеристической длины волны пиков. При образовании слабых водородных связей, стабилизирующих структуру комплексов включения, наблюдается еще и незначительный сдвиг (на 1–2 нм) полосы поглощения в коротковолновую область спектра (гипсохромный сдвиг) [16, 17].

УФ спектр поглощения молекулы L-фенилаланина (рН 1.00) характеризуется серией пиков в виде зубцов, где основной максимум приходится на длину волны 257 нм, а остальные полосы поглощения с разной степенью разрешения имеют максимумы при 241, 247, 251 и 264 нм соответственно (рис. 2а, 1). При переходе из кислой среды к раствору, близкому к нейтральному, положение максимума длинноволновой полосы поглощения аминокислоты (257 нм) не изменяется, но наблюдается уменьшение ее интенсивности ($\epsilon = 571$ л/(моль·см) и $\epsilon = 513$ л/(моль·см) соответственно). Это является следствием перехода молекулы аминокислоты из катиона в молекулярную и цвиттер-ионную форму (рис. 2а, 2).

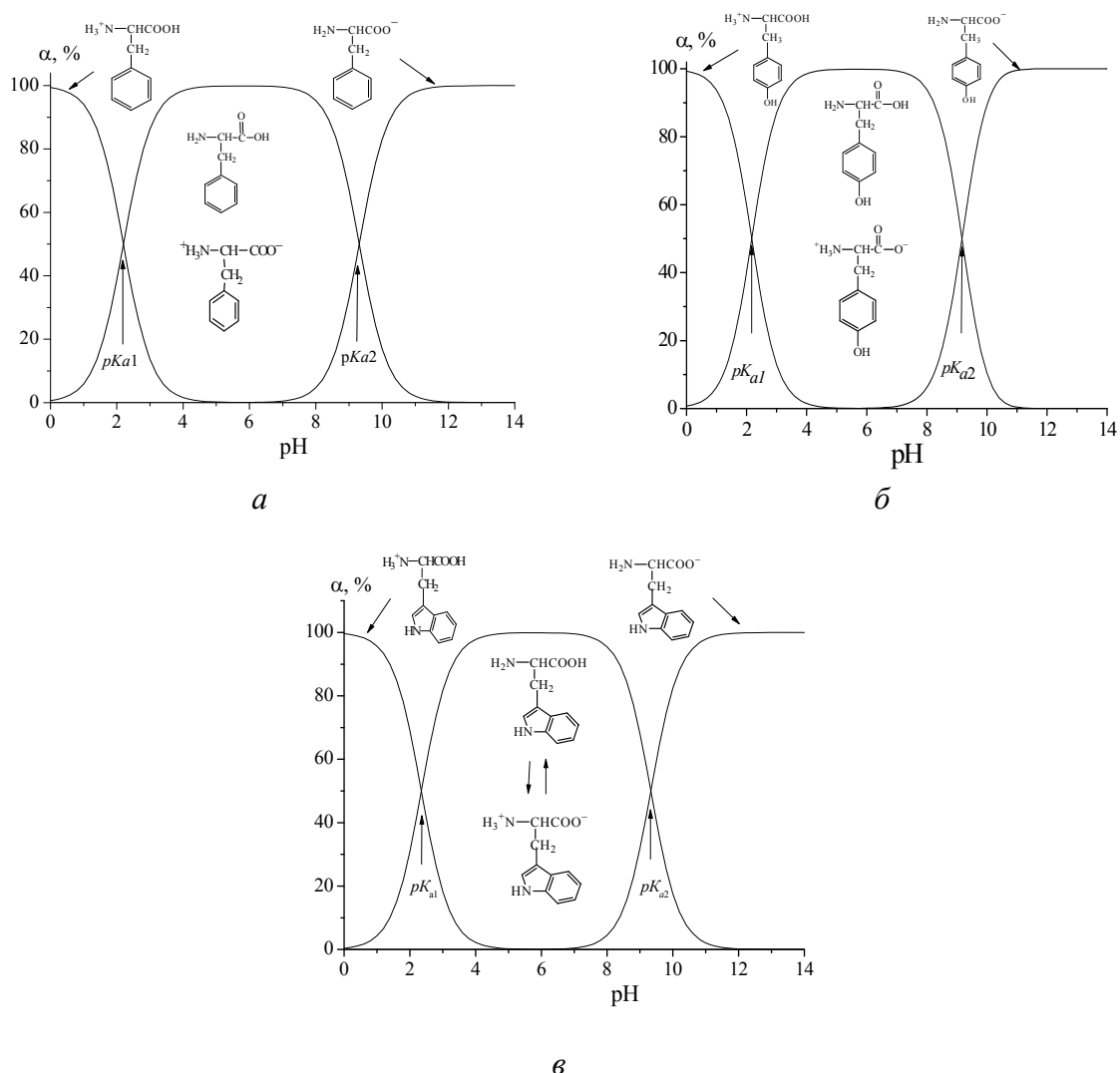


Рис. 1. Диаграмма распределения протолитических форм 0.01М L-фенилаланина (а), L-тирозина (б) и L-триптофана (в) в зависимости от рН раствора (α – степень ионизации ААК).

Основной поглощающей группировкой в молекуле L-тирозина является фенольное кольцо. УФ спектры представлены симметричной полосой поглощения с максимумом при

276 нм (рН 1.00, $\epsilon = 17308$ л/(моль·см)) и 277 нм (рН 6.86, $\epsilon = 6054$ л/(моль·см)), отвечающие $\pi \rightarrow \pi^*$ переходам фенольного кольца, а также плечом с длиной волны с максимумом при 282 нм. Максимумы поглощения его фенолят-аниона в области 240 и 293 нм в описанных условиях эксперимента отсутствуют [18]. При рН раствора 6.86 наблюдается очень слабый батохромный сдвиг (на 1 нм) длинноволновой полосы поглощения, а ее интенсивность уменьшается. При этом рН аминокислота находится в молекулярной и цвиттер-ионной формах (рис. 2б, 2).

Поглощение света водными растворами L-Тр в ультрафиолетовой области обусловлено системой сопряженных связей и его спектр характеризуется двумя максимумами при 220 и 280 нм, которые относятся к $\pi \rightarrow \pi^*$ переходам индольного кольца [18]. Полоса поглощения с максимумом при $\lambda_{\max} = 280$ нм ($\epsilon = 17814$ л/(моль·см)) соответствует катионной форме аминокислоты (рис. 2в, 1). В растворе с рН 6.86 происходит очень слабый гипсохромный сдвиг (на 1 нм) длинноволновой полосы поглощения с максимумом при $\lambda_{\max} = 279$ нм, а ее интенсивность уменьшается ($\epsilon = 11893$ л/(моль·см)), что связано с присутствием в растворе молекулярной и цвиттер-ионной форм аминокислоты (рис. 2в, 2).

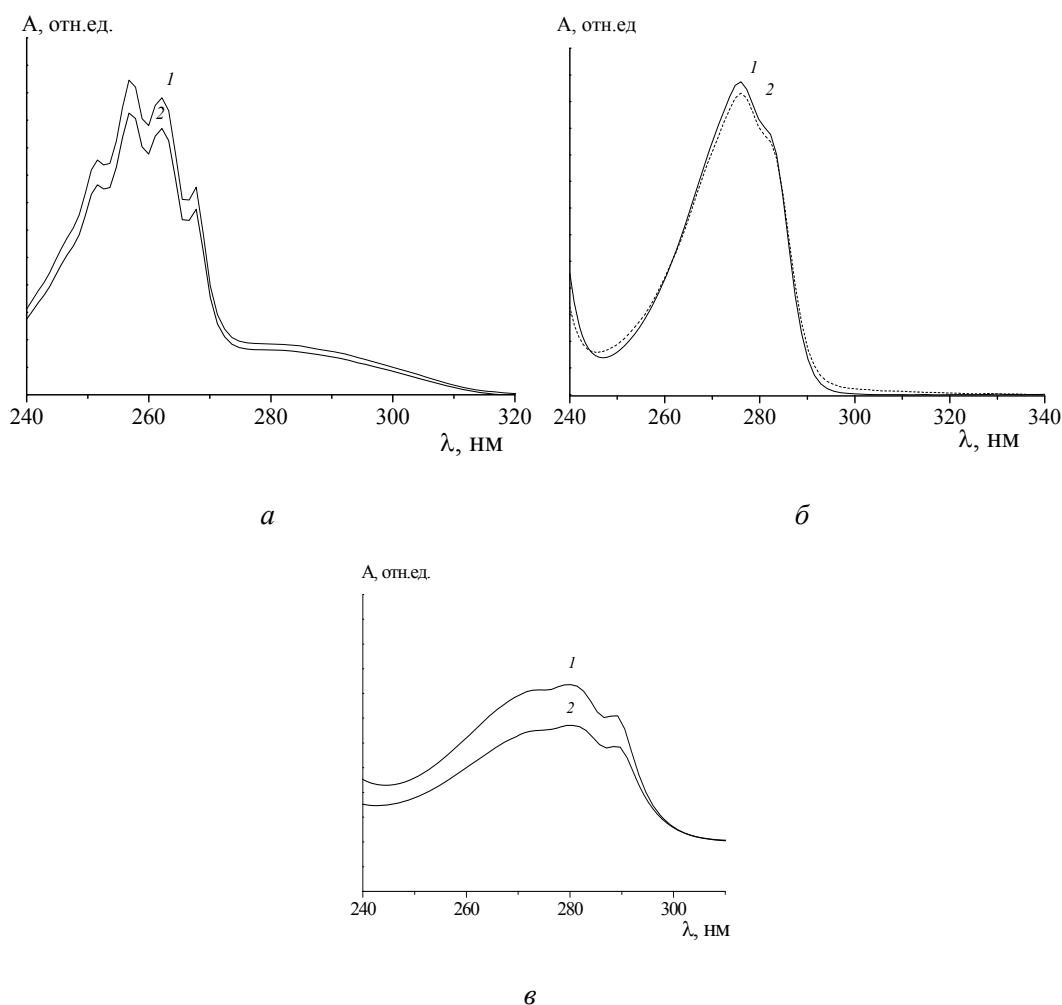


Рис. 2. Электронные спектры поглощения 0.0001 М раствора L-фенилаланина (а), L-тирозина (б) и L-триптофана (в) в зависимости от рН раствора: рН 1.00 (1) и рН 6.86 (2).

Добавление увеличивающихся количеств как α -ЦД, так и β -ЦД к раствору L-фенилаланина с рН 1.00 и 6.86 приводит к смещению максимума длинноволновой полосы

поглощения (257 нм) на 1 нм в коротковолновую область спектра и увеличение ее интенсивность (рис. 3, 4а, б). Подобные изменения регистрируются и в УФ спектрах L-тирозина и L-триптофана (табл. 2).

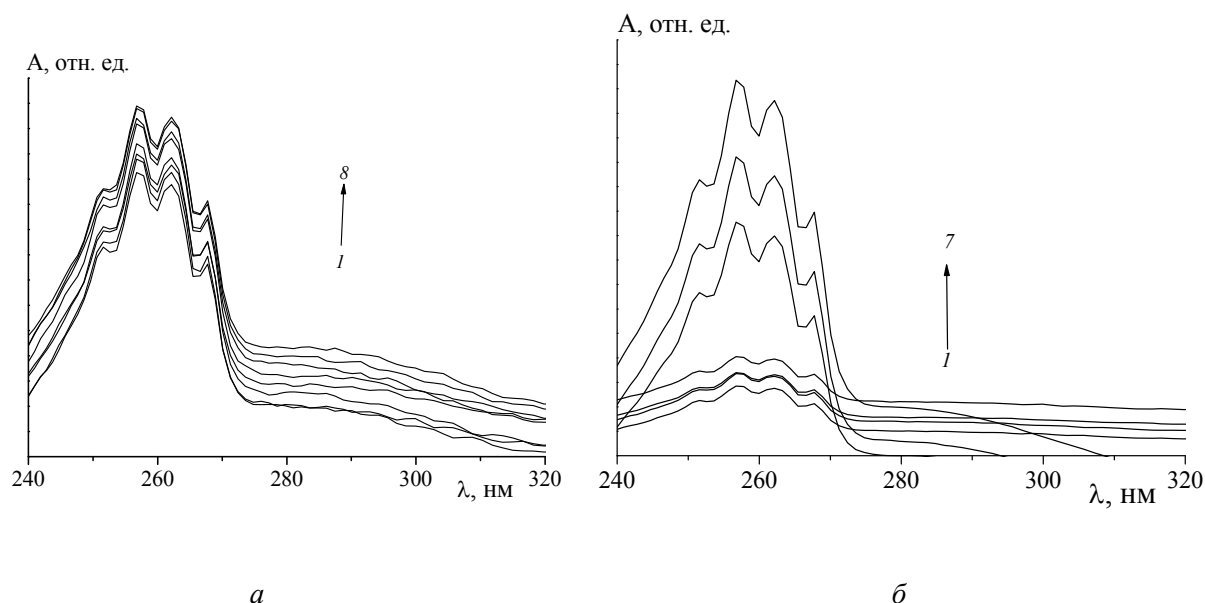


Рис. 3. Электронные спектры поглощения растворов L-фенилаланина в хлористоводородной кислоте с рН 1.00 в присутствии α -циклодекстрина (спектры 1–8 соответственно) (а), а также в фосфатном буфере с рН 6.86 (спектры 1–7 соответственно) при 298 К ($l=5.0$ см) (б).

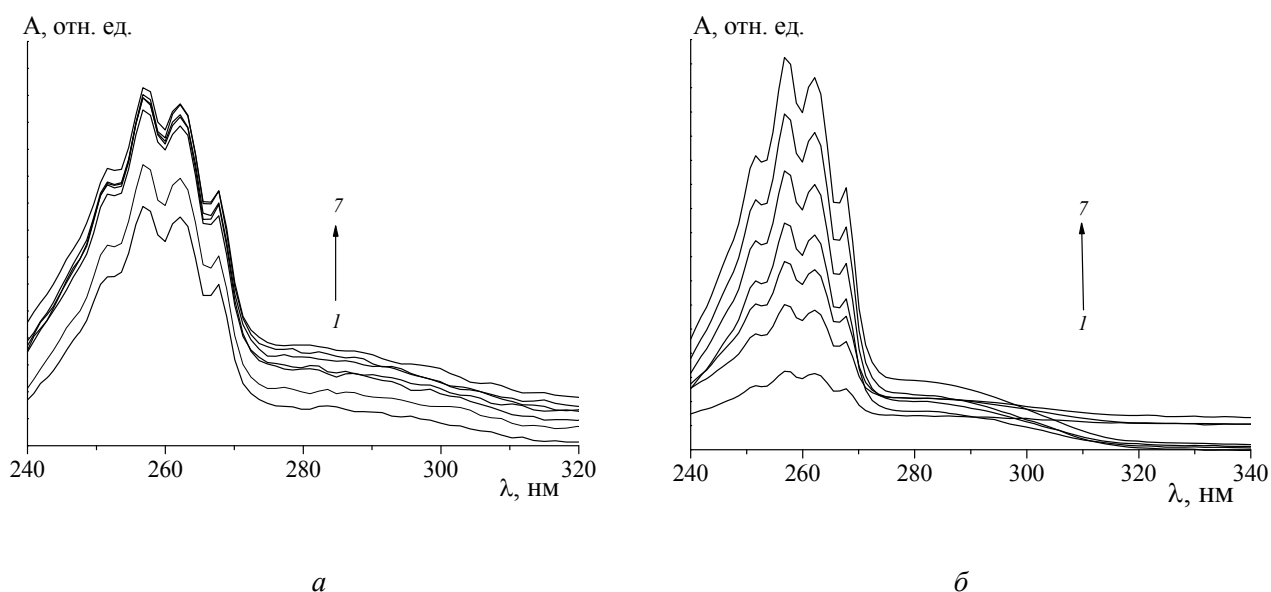


Рис. 4. Электронные спектры поглощения растворов L-фенилаланина в хлористоводородной кислоте с рН 1.00 в присутствии β -циклодекстрина (спектры 1–7 соответственно) (а), а также в фосфатном буфере с рН 6.86 (спектры 1–7 соответственно) при 298 К ($l=5.0$ см) (б).

Повышение содержания α -ЦД в растворе L-тирозина с рН 1.00 и 6.86 сопровождается сдвигом максимума длинноволновой полосы поглощения (276→275 нм); она становится несимметричной, а ее интенсивность увеличивается (табл. 2). В близкой к нейтральной области в УФ спектрах растворов с α -ЦД наблюдается также слабый гипсохромный сдвиг на 1 нм и увеличение интенсивности длинноволновой полосы

поглощения. При добавлении увеличивающихся количеств β -ЦД к раствору L-тирозина (рН 1.00) изменяется максимум длинноволновой полосы поглощения (276→275 нм), полоса становится несимметричной, а ее интенсивность увеличивается (табл. 3). В растворах с α -ЦД при рН 6.86 в спектре поглощения молекулы L-тирозина наблюдается слабый гипсохромный сдвиг длинноволновой полосы (на 2 нм), которая также становится несимметричной, и происходит увеличение ее интенсивности.

Взаимодействие L-триптофана в растворах с рН 1.00 или с 6.86 с увеличивающимся количеством α -циклодекстрина приводит к увеличению интенсивности длинноволновой полосы поглощения L-Trp с гипсохромным сдвигом на 1 нм. В электронном спектре раствора L-триптофана с β -циклодекстрином также регистрируется слабый гипсохромный сдвиг (1 нм) полосы поглощения, по сравнению с электронным спектром аминокислоты без β -ЦД, а интенсивность ее увеличивается (табл. 2).

Одинаковые величины сдвига и увеличение интенсивностей, которые наблюдаются в электронных спектрах растворов данных аминокислот при различных величинах рН при добавлении увеличивающихся количеств циклодекстринов, свидетельствуют о том, что происходят изменения в окружении хромофорных групп молекул ААК. Они являются следствием вытеснения части молекул воды и погружения молекул ААК в неполярное окружение (гидрофобную) полость α - или β -циклодекстрина с образованием комплексов включения типа “хозяин–гость”. В этом процессе участвуют все формы аминокислоты, находящиеся в растворе и среда не оказывает заметного влияния на формирование комплекса включения. Аналогичные изменения, которые регистрируются в УФ спектре раствора, содержащего циклодекстрин, можно сравнить с литературными данными, например, для L-триптофана. Такие же изменения наблюдаются в спектре поглощения L-триптофана в результате погружения индольного кольца молекулы аминокислоты в гидрофобный “карман” молекулы белка [19].

Таблица 2. Положение полос поглощения (λ_{\max}) и величины молярного коэффициента экстинкции (ε^{λ}) в УФ спектрах поглощения водных растворов ААК и их комплексов с α - и β -циклодекстрином при 298 К.

Исследуемая система	$\pi \rightarrow \pi^*$ переход		Исследуемая система	$\pi \rightarrow \pi^*$ переход	
	λ_{\max} , нм	ε^{λ} , л/(моль·см)		λ_{\max} , нм	ε^{λ} , л/(моль·см)
					рН 1.00
α -Циклодекстрин–L-Phe	256	2796	β -Циклодекстрин–L-Phe	256	2460
α -Циклодекстрин–L-Tyr	275	73706	β -Циклодекстрин–L-Tyr	275	21902
α -Циклодекстрин–L-Trp	279	11599	β -Циклодекстрин–L-Trp	278	19626
					рН 6.86
α -Циклодекстрин–L-Phe	256	14305	β -Циклодекстрин–L-Phe	256	15238
α -Циклодекстрин–L-Tyr	274	28442	α -Циклодекстрин–L-Tyr	275	10480
α -Циклодекстрин–L-Trp	278	20520	β -Циклодекстрин–L-Trp	278	96120

Состав комплексов включения и константы устойчивости определяли согласно формулам 1, 2, и 3.

Экспериментальные значения ложатся на прямую линию с коэффициентом корреляции $R^2 = 0.997$ – 0.999 для комплексов состава 1:1 для растворов аминокислот с α - и β -циклодекстрином с рН 1.00 и 6.86 (рис. 5).

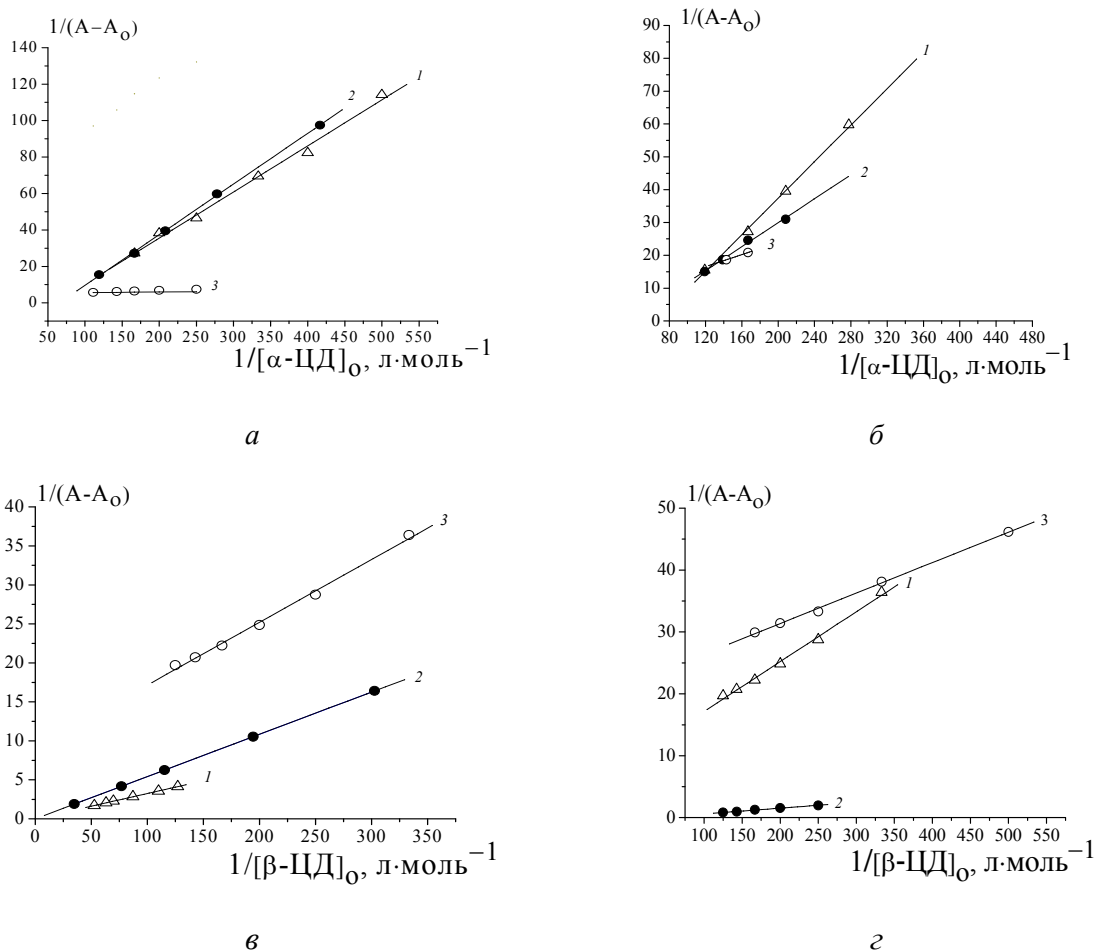


Рис. 5. Зависимость обратной оптической плотности раствора ААК с циклодекстрином и без него от обратного содержания α -циклодекстрина в растворе с рН 1.00 (а) и 6.86 (б) при 298 К: L-Phe (1), L-Tyr (2), L-Trp (3) для комплексов включения “ α -ЦД-ААК” состава 1:1, а также от содержания β -циклодекстрина в растворе с рН 1.00 (в) и 6.86 (г) при 298 К: L-Phe (1), L-Tyr (2), L-Trp (3) для комплексов включения “ β -ЦД-ААК” состава 1:1.

Обработка результатов по установлению состава и констант устойчивости, определенных из зависимости оптической плотности раствора от большого избытка содержания α - или β -циклодекстрина и рассчитанных по формуле 3, дала возможность показать вероятность образования комплекса включения между двумя молекулами α - или β -ЦД и одной молекулой аминокислоты при рН 1.00 и 6.86. На рис. 6 приведены результаты, полученные для комплексов включения в растворах с рН 1.00. Отсутствие линейной зависимости концентрации $[C_{\text{ААК}}] \cdot l/D^\lambda$ аминокислот от содержания $[C_{\alpha, \beta\text{-ЦД}}]^2$ является доказательством того, что молекулы циклодекстринов с этими аминокислотами в данных условиях эксперимента не образуют комплекс включения типа “хозяин-гость” состава 2:1.

На примере взаимодействия L-фенилаланина с α - и β -циклодекстринами, изучили возможность образования комплексов включения, содержащих одинаковые концентрации компонентов в растворе (рис. 7а, б). Прямые линии на графиках зависимости концентрации раствора, деленной на корень квадратный из величины оптической плотности, от корня квадратного из оптической плотности свидетельствуют об образовании комплексов включения состава 1:1 с коэффициентами корреляции $R^2 = 0.998$,

0.995, а константы устойчивости, рассчитанные по уравнению 2, составляют: $K_S = 11.96 \text{ M}^{-1}$ и $K_S = 91 \text{ M}^{-1}$ для α - и β -ЦД соответственно.

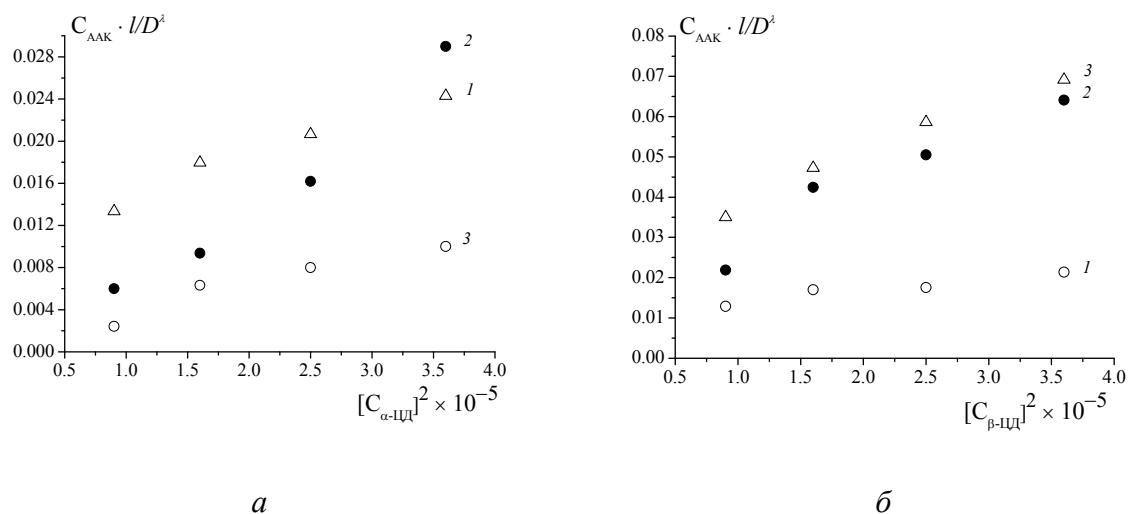


Рис. 6. Зависимость концентрации раствора ААК умноженной на толщину слоя и деленной на корень квадратный из величины оптической плотности от квадрата содержания α - (а) и β -циклодекстрина (б) в растворе с рН 1.00 при 298 К: L-Phe (1), L-Тур (2), L-Трп (3) для комплексов включения “ α , β -ЦД-ААК” состава 2:1.

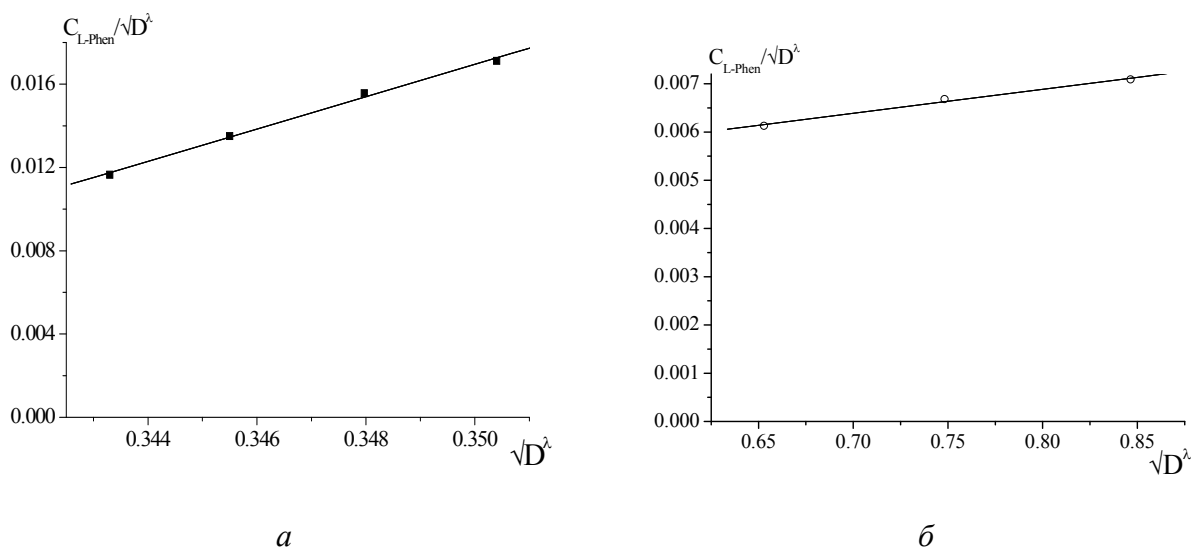


Рис. 7. Зависимость концентрации раствора L-фенилаланина деленной на корень квадратный из величины его оптической плотности, от корня квадратного из оптической плотности при равных концентраций исходных компонентов в растворе с рН .00 для α -циклодекстрина (а) и β -циклодекстрина (б).

Таким образом, молекулы аминокислот в катионной, молекулярной и цвиттер-ионной форме в присутствии α - и β -ЦД образуют комплексы включения типа “хозяин-гость”. При исследовании комплексообразования в растворе в спектрах поглощения молекул выбранных аминокислот при добавлении циклодекстринов наблюдаются одинаковые изменения, независимо от среды и строения молекул аминокислот и размеров полости циклодекстринов. Это указывает на то, что в процессе образования комплекса включения в растворе принимают участие одни и те же межмолекулярные силы в присутствии как α -, так и β -ЦД.

На основании экспериментальных данных были рассчитаны величины констант устойчивости образовавшихся комплексов включения. С помощью уравнения Вант-Гоффа определены термодинамические параметры процесса комплексообразования комплексов состава 1:1 для различных температур и pH растворов (табл. 3).

Таблица 3. Константы устойчивости (K_S) и термодинамические параметры образования комплексов состава 1:1 α - и β -циклодекстрина с ароматическими аминокислотами при 298 К

Комплекс включения	pH раствора	K_S , л/моль	ΔG° , кДж/моль	ΔH° , кДж/моль	ΔS° , Дж/моль·К
" α -ЦД-L-Phe"	1.00	13±0.3	-10.07	-8.19	-19.9
" α -ЦД-L-Tyr"		18±2	-6.1	-9.47	-20.8
" α -ЦД-L-Trp"		35±4	-7.9	-6.56	-19.1
" α -ЦД-L-Phe"	6.86	10±0.3	-2.7	-11.99	-6.9
" α -ЦД-L-Tyr"		12±2	-8.9	-8.09	-28.2
" α -ЦД-L-Trp"		25±3	-7.21	-9.33	-28.9
" β -ЦД-L-Phe"	1.00	18±2	-7.2	-7.78	-22.5
" β -ЦД-L-Tyr"		103±41	-11.6	-5.47	-20.14
" β -ЦД-L-Trp"		184±26	-12.9	-5.02	-25.01
" β -ЦД-L-Phe"	6.86	11±2	-6.0	-5.84	-19.1
" β -ЦД-L-Tyr"		42±2	-9.3	-5.29	-29.9
" β -ЦД-L-Trp"		58±16	-10.07	-6.88	-32.84

Как видно из результатов, представленных в табл. 3, значения величин констант устойчивости комплексов включения (для всех форм кислот, находящихся в растворе) с α - и β -циклодекстрином, полученные для различных температур и pH, имеют одинаковый порядок и невелики, за исключением комплексов " β -ЦД-L-Tyr", " β -ЦД-L-Trp". Отсюда следует, что при взаимодействии α - и β -ЦД с ААК происходит образование слабых комплексов включения, а среда не оказывает заметного влияния на величину константы устойчивости. Процессы комплексообразования аминокислот с α - и β -ЦД сопровождаются отрицательными значениями изменения энтальпии и энтропии (связано с ограничением свободы колебательных и вращательных движений молекулы-"гостя" при ее погружении во внутреннюю полость β -циклодекстрина) (табл. 3). Отрицательные значения изменения свободной энергии Гиббса свидетельствуют о самопроизвольной реакции комплексообразования между α - и β -ЦД и ААК.

Стерический фактор является одним из основных факторов, влияющих на образование устойчивого комплекса включения между ароматической молекулой и α - β -циклодекстринами в растворе. В результате погружения молекулы аминокислоты в полость циклодекстрина идет вытеснение полярных молекул воды из неполярной полости молекул циклодекстринов. Образование комплекса может произойти только при геометрическом согласовании (т.е. стерическом соответствии) структуры молекулы ААК и полости циклодекстрина. Далее идет формирование гидрофобных связей в результате попадания молекулы аминокислоты в гидрофобную полость тора молекулы циклодекстрина и возможно, образование водородных связей между функциональными группами аминокислот и гидроксильными группами циклодекстринов, находящимися внутри и снаружи тора [20].

Внутренние диаметры тора циклодекстринов и геометрические параметры молекул аминокислот сильно влияют на образование комплексов включения. Возможно, поэтому бензольное кольцо молекулы аминокислоты проникает неглубоко в полость α -ЦД, так как внутренний диаметр α -циклодекстрина слишком мал для глубокого и плотного включения ее в полость тора. Внутренние диаметры полости α - и β -ЦД составляют 5.2 и

6.6 Å, соответственно, в то время как диаметр бензольного кольца, включая радиусы Ван-дер-Ваальса – 6.8 Å [13, 21]. Подтверждением этого предположения послужила оптимизация геометрии аминокислот, α- и β-ЦД, а также полученных комплексов включения. Данные оптимизации показали, что комплексы образуются в основном путем погружения в тор только гидрофобной части молекулы аминокислоты, в то время как ее гидрофильная часть находится над верхним широким краем полости тора молекул как α-, так и β-ЦД (рис. 8).

Значит, комплексы включения “α-, β-ЦД–ААК” образуются за счет неспецифических взаимодействий между бензольным или индольным кольцом и внутренней гидрофобной полостью α- или β-циклодекстрина. Возможно, они стабилизированы за счет образования слабой водородной связи между атомом азота α-амино- (или кислородом α-карбоксильной группы) и атомом водорода первичной гидроксильной группы, расположенной на поверхности широкого края тора. Поэтому константы устойчивости для этих аминокислот невелики и одного порядка. Исключением являются комплексы включения β-циклодекстрина с L-тирозином и L-триптофаном (табл. 3). Оптимизация геометрии этих комплексов показала, что дополнительный вклад в величину константы устойчивости комплекса включения с L-триптофаном вносит образование водородной связи и внутри тора, а именно между атомом азота иминогруппы молекулы L-триптофана и атомом водорода глюкопиранозного звена β-ЦД. Принимая во внимание объемы и размеры L-триптофана (227.8Å³) и β-ЦД (внутренней полости 262Å³) молекула аминокислоты не имеет ограничений для полного погружения в тор β-циклодекстрина. То же относится и к молекуле L-тирозина. Присутствие в молекуле фенольного гидроксила изменяет ее симметрию и, как следствие, позволяет глубже располагаться внутри полости β-ЦД, вплоть до полного погружения молекулы L-тирозина с образованием комплекса включения “хозяин–гость” (рис. 8).

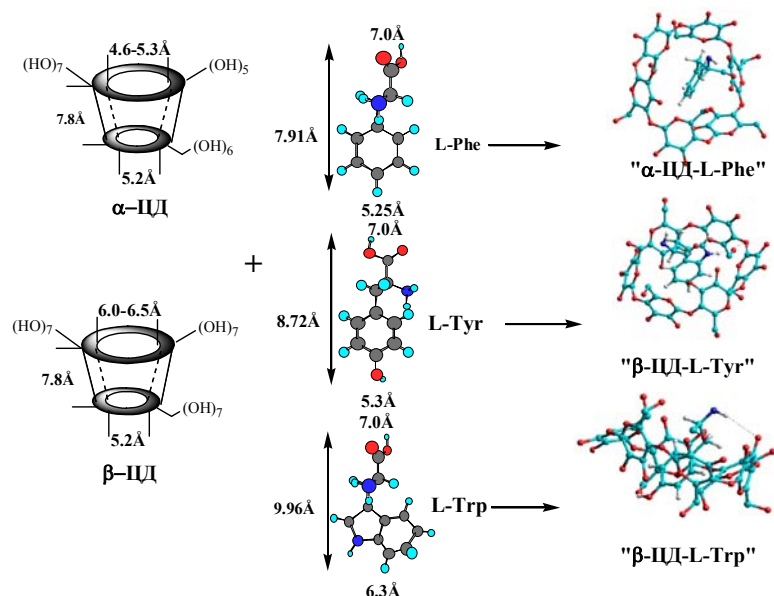


Рис. 8. Схема образования комплексов включения типа “хозяин–гость” состава 1:1 с α- и β-циклодекстрином.

Таким образом, комплексообразование L-триптофана и L-тирозина с α- и β-циклодекстрином осуществляется за счет участия сил Ван-дер-Ваальса и слабых водородных связей, что приводит к увеличению значения величины константы устойчивости, по сравнению с L-фенилаланином. Использование α-циклодекстрина ведет к понижению прочности комплекса включения.

Выводы

С помощью УФ спектроскопии проведено исследование возможности образования комплекса включения типа “хозяин–гость” при взаимодействии ароматических аминокислот (L-фенилаланина, L-тирозина и L-триптофана) с α - и β -циклодекстринами в водных растворах с рН 1.00 и 6.86.

Установлено, что катионные, молекулярные и цвиттер-ионные формы аминокислот образуют комплексы включения типа “хозяин–гость” состава 1:1 как с α -, так и с β -циклодекстрином при их одинаковом содержании в растворе и избытке циклодекстрина, о чем свидетельствует увеличение интенсивности характеристической полосы поглощения в УФ спектрах аминокислот. Использование макроцикла с меньшим объемом полости ведет к понижению устойчивости комплексов включения.

Продемонстрировано, что комплексы включения образуются посредством ван-дер-ваальсовых взаимодействий путем вытеснения молекул воды и погружения аминокислотного ароматического радикала во внутреннюю гидрофобную полость молекул α - и β -циклодекстрина. Наличие гипсохромного сдвига характеристической полосы поглощения аминокислоты указывает, что стабилизация комплексов осуществляется за счет слабых водородных связей, а геометрический параметр вносит основной вклад в образование комплексов включения.

Расчитаны константы устойчивости K_s комплексов включения, а также основные термодинамические параметры их образования ΔG , ΔH и ΔS .

Литература

1. *Balcão V.M., Vila M.M.D.C.* Structural and functional stabilization of protein entities: State-of-the-art // *Advanced Drug Delivery Rev.* – 2015. – V. 93. – P. 25–41.
2. *Brewster M.E., Hora Ms., Simpkins J.W., Bordor N.* Use of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin as a solubilizing and stabilizing excipient for protein drugs // *Pharm. Res.* – 1991. – V. 8. – P. 792–795.
3. *Serno T., Geidobler R., Winter G.* Protein stabilization by cyclodextrins in the liquid and dried state // *Advanced Drug Delivery Rev.* – 2011. – V. 63. – P.1086–1106.
4. *Otzen D.E., Knusen B.R., Aachmann F., Larsen K.L., Wimmer R.* Structural basis for cyclodextrins' suppression of human growth hormone aggregation // *Protein Science.* – 2002. – V. 11. – P.1779–1787.
5. *Szejtli J.* Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry // *Chem. Rev.* – 1998. – V. 98, N 5. – P. 1743 – 1753.
6. *Castronuovo G., Elia V, Fessas D., Giordano A., Velleca F.* Thermo-dynamics of the interaction of cyclodextrins with aromatic and alpha, omega-amino acids in aqueous solution – a calorimetric study at 25degrees C. // *Carbohydr Res.* – 1995. – V. 272. – P.31–39.
7. *Nishijo J., TsuchitaniI M.* Interaction of L-tryptophan with α -cyclodextrin: studies with calorimetry and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy // *Journal of harmaceutical Sci.* – 2001. – V. 90, N 2. – P. 134–140.
8. *Horsky J., Pitna J.* Inclusion complexes of proteins: interaction of cyclodextrins with peptides containing aromatic amino acids studied by competitive spectrophotometry // *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* – 1994. – V. 18. – P.291–300.
9. *Kanle C., Holzgrabe U.* Determination of binding constants of cyclodextrin inclusion complexes with amino acids and dipeptides by potentiometric titration // *Chirality.* – 2004. – V. 16. – P.509–515.

10. Lewis EA, Hansen LD. Thermodynamics of binding of guest molecules to alpha-cyclodextrins and beta-cyclodextrins // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2. – 1973. – P. 2081–2085.
11. Якубке Х.-Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки: Пер. с нем. – Москва: Мир, 1985. – 456с.
12. Zamyatin A.A.. Protein volume in solution // Prog. Biophys. Mol. Biol. – 197. – V. 224. – P. 107–123.
13. Frommel C. The apolar surface area of amino acids and its empirical correlation with hydrophobic free energy // J. Theor. Biol. – 1984 – V. 111 – P. 247–260.
14. Свердлова О. В. Электронные спектры в органической химии. – Ленинград: Химия, 1973.
15. Роук Н.В., Белякова Л.А. Влияние β-циклодекстрина на протолитические и комплексообразующие свойства *n*-аминобензойной кислоты // Журн. физ. химии. – 2010. – Т. 84, № 3. – С. 486–492.
16. Singh, R. Characterization of cyclodextrin inclusion complexes – a review // J. Pharm. Sci. and Technol. – 2010. – V 2, N3. – P. 171–183.
17. Maazaoui, R. Applications of cyclodextrins: formation of inclusion complexes and their characterization / R. Maazaoui, R. Abderrahim // Int. J. Ad. Res. – 2015. – V. 3, N 2. – P. 757–781.
18. Edelhoch H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins // Biochemistry. – 1967. – V. 6, N 7. – P. 1948–1954.
19. Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Рубан М.К. Анализ вклада хромофоров боковых групп аминокислот в спектр поглощения гемоглобина // Журн. прикл. спектроскопии. – 2013. – Т. 80, № 6. – С. 907–913.
20. Frumming K. Cyclodextrins in Pharmacy. – Dordrecht–Boston: Kluwer: Academic Publishers, 1994. – 218 p.
21. Szejtli J. Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes. – Budapest: Akadémiai Kiadó – 1982. – 296 p.

References

1. Balcão V.M., Vila M.M.D.C. Structural and functional stabilization of protein entities: State-of-the-art. *Advanced Drug Delivery Rev.* 2015. **93**: 25.
2. Brewster M.E., Hora Ms., Simpkins J.W., Bordor N. Use of 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin as a solubilizing and stabilizing excipient for protein drugs. *Pharm. Res.* 1991. **8**: 792.
3. Serno T., Geidobler R., Winter G. Protein stabilization by cyclodextrins in the liquid and dried state. *Advanced Drug Delivery Rev.* 2011. **63**:1086.
4. Otzen D.E., Knusen B.R., Aachmann F., Larsen K.L., Wimmer R. Structural basis for cyclodextrins' suppression of human growth hormone aggregation. *Protein Science.* 2002. **11**:1779.
5. Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.* 1998. **98**(5): 1743.
6. Castronuovo G., Elia V, Fessas D., Giordano A., Velleca F. Thermo-dynamics of the interaction of cyclodextrins with aromatic and alpha, omega-amino acids in aqueous solution – a calorimetric study at 25 degrees C. *Carbohydr Res.* 1995. **272**: 31.
7. Nishijo J., Tsuchitani M. Interaction of L -tryptophan with α-cyclodextrin: studies with calorimetry and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical Sci.* 2001. **90**(2): 134.

8. Horsky J., Pitna J. Inclusion complexes of proteins: interaction of cyclodextrins with peptides containing aromatic amino acids studied by competitive spectrophotometry. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* 1994. **18**: 291.
10. Kanle C., Holzgrabe U. Determination of binding constants of cyclodextrin inclusion complexes with amino acids and dipeptides by potentiometric titration. *Chirality*. 2004. **16**: 509.
10. Lewis EA, Hansen LD. Thermodynamics of binding of guest molecules to alpha-cyclodextrins and beta-cyclodextrins. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* 1973. 2081.
11. Jakubke H.-D., Jeschkeit H. *Aminosäuren, Peptide, Proteine* (Berlin: Akademie, 1982). [in Russian].
12. Zamyatin A.A. Protein volume in solution. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1997. **224**: 107.
13. Frommel C. The apolar surface area of amino acids and its empirical correlation with hydrophobic free energy. *J. Theor. Biol.* 1984. **111**: 247.
14. Sverdlova O.V. *Electronic Spectra in Organic Chemistry*. (Leningrad: Chemistry, 1973). [in Russian].
15. Roik N.V., Belyakova L.A. The effect of β -cyclodextrin on the protolytic and complexing properties of p- aminobenzoic acid. *J. phys. chem.* 2010. **84**(3): 486. [in Russian].
16. Singh, R. Characterization of cyclodextrin inclusion complexes – a review. *J. Pharm. Sci. and Technol.* 2010. **2**(3): 171.
17. Maazaoui R. Applications of cyclodextrins: formation of inclusion complexes and their characterization. *Int. J. Ad. Res.* 2015. **3**(2): 757.
18. *Edelhoc H.* Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins // *Biochemistry*. – 1967. – V. 6, N 7. – P. 1948–1954.
19. Lavrinenko I.A., Vashanov G.A., Ruban M.K. Analysis of the contribution of the chromophores of the side groups of amino acids to the absorption spectrum of hemoglobin // *J. Appl. Spectrosc.* 2013. **80**(6): 907.
20. Frumming K. *Cyclodextrins in Pharmacy*. (Dordrecht–Boston: Kluwer: Academic Publishers, 1994).
21. Szejtli J. *Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes*. (Budapest: Akadémiai Kiadó, 1982).

ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ α -І β -ЦИКЛОДЕКСТРИНУ З РЯДОМ АРОМАТИЧНИХ АМІНОКИСЛОТ У ВОДНИХ РОЗЧИНАХ МЕТОДОМ УФ СПЕКТРОСКОПІЇ

Д.Ю. Ляшенко

*Інститут хімії поверхні ім.О.О. Чуйка Національної академії наук України,
вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна, e-mail:isc412@ukr.net*

Методом УФ спектроскопії вивчено взаємодію α - і β -циклодекстрину з ароматичними амінокислотами, які відрізнялись розміром молекул та будовою радикала біля α -вуглецевого атома, а також відношенням компонентів у водневому розчині з різним рН (L-фенілаланіном, L-тірозином та L-триптофаном).

З'ясовано особливості взаємодії амінокислот з циклодекстринами при утворюванні сполук включення “ α -, β -циклодекстрин–ароматична амінокислота” типу “хазяїн–гість” складу 1:1 з катіонною, молекулярною та цвіттер-іонною формами кислот.

Показано, що комплекси включення типу "хазяїн-гість" утворюються за рахунок неспецифічних міжмолекулярних взаємодій, а також, слабких водневих зв'язків при зануренні бензольного кільця молекул амінокислот в гідрофобну порожнину молекули α - або β -циклодекстрину.

Продемонстровано, що слабкий водневий зв'язок утворюється між атомом азоту аміногрупи або атомом кисню карбоксильної групи молекули амінокислоти з атомом водню первинної гідроксильної групи, розташованої на поверхні широкого краю тора, а також всередині порожнини циклодекстрину між атомом азоту іміногрупи молекули *L*-триптофану і атомом водню глікопіранозної ланки. Розраховано величини констант стійкості (K_s) комплексів і термодинамічні параметри утворення сполук включення (ΔG , ΔH і ΔS).

Ключові слова: УФ-спектроскопія, α -циклодекстрин, β -циклодекстрин, *L*-фенілаланін, *L*-тирозин, *L*-триптофан, комплекси включення типу "хазяїн-гість", константа стійкості, термодинамічні параметри.

INVESTIGATION OF THE INTERACTION OF α -AND β -CYCLODEXTRINS WITH A SERIES OF AROMATIC AMINO ACIDS IN AQUEOUS SOLUTIONS BY UV SPECTROSCOPY METHOD

D. Yu. Lyashenko

*Chuiko Institute of Surface Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine,
General Naumov Str. 17, Kyiv 03164, Ukraine, e-mail: isc412@ukr.net*

*The results of experimental data obtained using UV spectroscopy, due to a comparative study on the interaction of α - and β -cyclodextrins with alpha aromatic amino acids differing in molecular size and substituent structure at the α -carbon atom in aqueous solutions with various pH (*L*-phenylalanine, *L*-tyrosine and *L*-tryptophan) have been analyzed.*

The features of the interaction of selected amino acids with cyclodextrins have been clarified. Molecular cationic and zwitterionic forms of amino acids at the same content of components in the solution and an excess of cyclodextrin form 1: 1 host-guest inclusion complexes, regardless of the pH value of the medium. This is manifested by a long-wavelength shift and an increase in the intensity of the characteristic absorption band in the UV spectra of solutions.

It has been proved that inclusion complexes are formed due to the van der Waals interactions by partial displacing water molecules and incomplete (in the case of α -cyclodextrin) immersion of the amino acid aromatic radical into the internal hydrophobic cavity of α -cyclodextrin and of β -cyclodextrin. Stabilization of the complexes is due to hydrogen bonds, and the geometric parameter makes the main contribution to the formation of inclusion complexes.

*It has been found that the hydrogen bond is formed between the nitrogen atom of α -amino group or the oxygen atom of α -carboxyl group of the amino acid molecule with hydrogen of the primary hydroxyl group located on the surface of the wide edge of the torus, as well as between the nitrogen atom of the imino group of the *L*-tryptophan molecule and glycoside hydrogen atom within the cyclodextrin cavity.*

The values of the stability constants (K_s) of the complexes and the thermodynamic parameters of the formation of inclusion compounds (ΔG , ΔH , and ΔS) have been calculated. The use of a smaller macrocycle (α -CD) leads to a decrease in the stability of the inclusion

complexes. Negative values of the change in the free Gibbs energy indicate a spontaneous complexation reaction between α - or β -cyclodextrins and alpha aromatic aminoacids. Negative values of the enthalpy ΔH and entropy ΔS indicate that the complexes are mostly stabilized due to the entropy contribution.

Keywords: *UV spectroscopy, α -cyclodextrin, β -cyclodextrin, L-phenylalanine, L-tyrosine, L-tryptophan, inclusion complexes of “host–guest” type, stability constant, thermodynamic parameters.*