



УДК 54-126:547.458:577

**І. В. Бабич, С. В. Рябов, В. В. Бойко, Т. В. Дмитрієва,
В. І. Бортницький, О. В. Козлов,**
член-кореспондент НАН України **Ю. Ю. Керча**

Комплекси включення циклодекстринів з альбуміном

Методами УФ спектроскопії та піролітичної мас-спектрометрії вивчали особливості комплексів включення, отриманих на основі циклодекстринів (β -ЦД й ГП- β -ЦД) та білка — бичачого сироваткового альбуміну при різних мольних співвідношеннях компонентів. Отримані результати можуть слугувати підґрунтям для подальших досліджень по створенню аналогічних систем на основі різних протеїнів для потреб медицини.

Останнім часом у супрамолекулярній хімії стрімко набуває розвитку напрям, пов'язаний з дослідженнями макроциклічних сполук як носіїв лікарських форм для застосування в фармацевтичних цілях. Зокрема, вивчаються циклодекстрини (ЦД) — циклічні олігомери глюкози, що побудовані з α -1,4-зв'язаних залишків D-глюкопіранози, завдяки їх властивості селективно взаємодіяти з комплементарними за геометричними розмірами субстратами з утворенням стійких комплексів включення типу гість-хазяїн [1, 2]. Велике значення має і той факт, що ЦД — це природні продукти (продукуються ензимами з крохмалю), нетоксичні для людського організму. Для створення лікарських препаратів в основному використовується β -циклодекстрин (β -ЦД) як допоміжний агент, що здатний до солюбілізації малорозчинних у воді речовин, підвищити стійкість до дії протеолітичних ферментів крові/шлунково-кишкового тракту, а також здатного знизити рівень агрегації білкової компоненти тощо [2–4]. На сьогодні відомий цілий перелік субстанцій, розчинність яких збільшується в 10–100 разів завдяки утворенню комплексів включення з β -ЦД.

Мета роботи — дослідження можливостей утворення комплексів включення (КВ) між гідроксипропіл- β -циклодекстрином (ГП- β -ЦД) й β -ЦД з бичачим сироватковим альбуміном (БСА), який є білком плазми крові великої рогатої худоби. БСА широко використовується у лабораторній практиці як стандарт для кількісного визначення протеїнів, а також як маркер у рідинній хроматографії та електрофорезі при визначенні молекулярної маси білків. Розробка та вивчення особливостей комплексів включення ГП- β -ЦД та β -ЦД з БСА (при різних мольних співвідношеннях компонентів) може бути підґрунтям для подальших

© І. В. Бабич, С. В. Рябов, В. В. Бойко, Т. В. Дмитрієва, В. І. Бортницький, О. В. Козлов,
Ю. Ю. Керча, 2013

досліджень по створенню систем на основі циклодекстринів та різних протеїнів, що дозволить стабілізувати структуру останніх, зменшити їх агрегацію в розчині, підвищити транспортні характеристики лікарських засобів і, таким чином, розширити коло їх терапевтичного застосування.

Експериментальна частина. Об'єкти дослідження:

β -ЦД — продукт фірми “Fluka”. Молекулярна маса його мономерного фрагмента ($C_6H_{10}O_5$) 162. Перед проведенням експерименту β -ЦД сушили у вакуумі при температурі 100 °С впродовж 12 год.

2-Гідроксипропіл- β -ЦД(2-ГП- β -ЦД) — продукт фірми “CycloLab R&D Ltd”. Ступінь заміщення ~ 3 .

БСА (білок плазми крові великої рогатої худоби) — продукт фірми “Sigma”, має один ланцюг (втягнута глобула з розмірами 4,0 на 14,0 нм), який містить близько 600 амінокислотних залишків.

Молекулярна маса об'єктів дослідження: β -ЦД 1135; ГП- β -ЦД 1309; БСА ~ 64000 .

Для приготування комплексів включення 50 мг БСА розчиняли в 20 мл 0,01 моль/л фосфатного буферного розчину (рН 8) при кімнатній температурі, потім додавали при перемішуванні відповідний ЦД (25 або 50 мг). Після розчинення ЦД суміш перемішували впродовж ще 2 год. Для отримання цільового продукту здійснювали ліофільну сушку. Досліджувані об'єкти вивчали методом УФ спектроскопії (видима частина спектра) та піролітичної мас-спектрометрії (ПМС).

Оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі UV-2401 PC фірми “Shimadzu” з діапазоном частот 190–800 нм у кварцовій кюветі з товщиною шару 1 см. Розчини компонентів для титрування готували в 10 ммоль/л фосфатному буферному розчині з рН 8.

Використовували розчин БСА з концентрацією $8,19 \cdot 10^{-6}$ моль/л (0,5 мг/мл). До розчину БСА в кюветі додавали порції розчину ГП- β -ЦД у такій кількості, щоб концентрація ЦД становила від $1,36 \cdot 10^{-5}$ моль/л до $8,03 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Мольне співвідношення БСА : ГП- β -ЦД при цьому становило від 1 : 2 до 1 : 100. Після кожного додавання розчину ГП- β -ЦД фіксували оптичну густину в максимумі поглинання БСА ($\lambda = 279$ нм). Отриману величину перераховували з врахуванням розведення від додавання титранту.

Структурні особливості молекулярної будови КВ вивчали методом ПМС, який дає змогу оцінювати структуру складних органічних об'єктів за складом продуктів їх термодеструкції під впливом підвищених температур [5, 6]. Дослідження проводили на мас-спектрометрі МХ-1321, який забезпечує визначення компонентів газових сумішей у діапазоні масових чисел 1–4000, у відповідності з методикою, описаною в статті [7]. Маса зразків становила 0,5 мг. Отримані мас-спектри продуктів деструкції порівнювали з мас-спектрами, представленими в каталогах [8, 9].

Результати та їх обговорення. На рис. 1 наведено залежність оптичної густини БСА ($8,19 \cdot 10^{-6}$ моль/л) від концентрації ГП- β -ЦД. Як видно з рисунку, оптична густина БСА зі збільшенням концентрації ГП- β -ЦД зростає. Це свідчить про те, що змінюється характер зв'язків у сольватній порожнині білка, а також відбувається перерозподіл внутрішньої міжмолекулярних асоціацій хромофорних груп у БСА. Після досягнення співвідношення БСА : ГП- β -ЦД = 1 : 10 залежність зростання оптичної густини розчину від даного ЦД стає менш вираженою, що може свідчити про стехіометричність даного співвідношення.

Методом ПМС досліджували комплекс включення β -ЦД з БСА, а також фізичну суміш даних сполук, які брали в мольному співвідношенні БСА : β -ЦД = 1 : 29. Мас-термограми

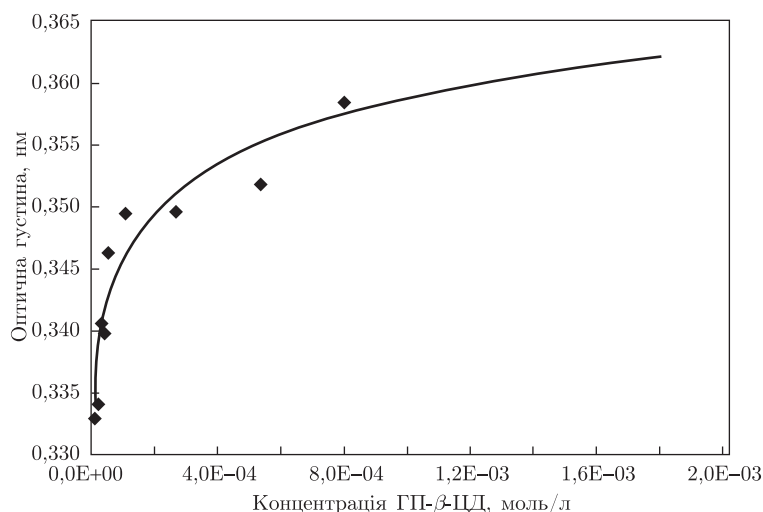


Рис. 1. Залежність оптичної густини БСА ($\lambda = 279$ нм) від концентрації ГП- β -ЦД

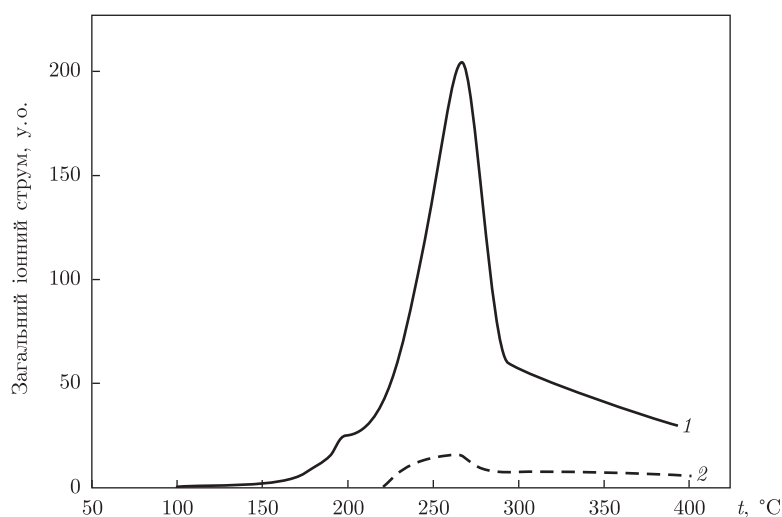


Рис. 2. Мас-термограми за загальним іонним струмом термодеструкції фізичної суміші β -ЦД з БСА (29 : 1) (1) та комплексу β -ЦД з БСА (29 : 1) (2)

за загальним іонним струмом термодеструкції фізичної суміші (ФС) β -ЦД з БСА (29 : 1) (1) та комплексу β -ЦД з БСА (29 : 1) (2) демонструє рис. 2.

Як видно з рисунку, ФС розкладається в інтервалі температур від 200 до 300 °С з максимумом виділення летких компонентів при 270 °С. При цій температурі утворюється 98 іонних фрагментів із загальним іонним струмом 207 у. о. У той самий час діапазон термодеструкції КВ знаходиться в межах 225–275 °С з максимумом утворення летких компонентів при 260 °С. При цій температурі в мас-спектрі КВ реєструється лише 7 іонних фрагментів, загальний іонний струм яких становить 16 у. о. Для вихідного БСА при 260 °С спостерігається утворення 10 летких компонентів із загальним іонним струмом 22 у. о.

У табл. 1 наведено 10 найбільш інтенсивних іонних фрагментів з мас-спектрів фізичної суміші та комплексу β -ЦД з БСА, знятих при температурах максимального виділення летких компонентів при 270 °С для ФС та 260 °С для КВ. Згідно з даними табл. 1, питома

Таблиця 1. Склад іонних фрагментів у мас-спектрах фізичної суміші та комплексу β -ЦД з БСА

Об'єкт дослідження	$m/z/I \cdot 10^4$, у. о.									
	18	44	43	17	28	31	29	32	41	16
ФС										
β -ЦД : БСА (29 : 1)	8,04	6,17	3,30	3,09	2,87	2,73	2,32	1,17	1,10	1,03
КВ										
β -ЦД : БСА (29 : 1)	0,41	0,19	0,11	0,05	0,06	0,11	0,09	—	—	—
БСА	0,49	0,42	0,05	0,32	0,01	—	—	—	0,07	0,17

інтенсивність іонних фрагментів у мас-спектрі КВ у 20–60 разів менша, ніж у ФС. Отримані результати вказують на утворення комплексу включення між БСА й β -ЦД.

Слід зазначити, що в мас-спектрі КВ повністю відсутні леткі компоненти, що є характерними для вихідного β -ЦД [10], та утворюються при розриві мономерного глюкопіранозного кільця, а саме, леткі компоненти з $m/z = 60$ ($\text{O}=\text{C}\text{H}-\text{C}\text{H}_2\text{OH}$), $m/z = 31$ ($-\text{C}\text{H}_2\text{OH}$), $m/z = 29$ ($\text{O}=\text{C}\text{H}-$), $m/z = 44$ ($\text{C}\text{H}_3\text{C}\text{HO}$, $\text{C}\text{H}_2\text{C}\text{HO}\text{H}$), $m/z = 43$ ($\text{C}\text{H}_2\text{C}\text{HO}$), $m/z = 73$ ($\text{C}\text{H}\text{C}\text{HO}\text{H}\text{C}\text{HO}\text{H}$). Фрагментами глюкопіранозного кільця при відніманні двох або однієї молекули води відповідно є леткі компоненти з $m/z = 126$ та $m/z = 144$, які також відсутні в мас-спектрі КВ. У мас-спектрах вихідного БСА та ФС реєструються два летких компонента з $m/z = 18$ (H_2O і NH_4^+), а також два іонних фрагменти з $m/z = 17$ (OH^- , NH_3^-) та $m/z = 16$ (NH_2^-), які можуть бути пов'язані з відривом аміногруп при термодеструкції БСА. В той самий час у мас-спектрі КВ зафіксовано лише по одному леткому компоненту з $m/z = 17$ та $m/z = 18$, а іонний фрагмент з $m/z = 16$ взагалі відсутній. Отже, можна припустити, що утворення комплексу відбувається за рахунок взаємодії NH_2 -груп амінокислотних залишків БСА з гідроксилами, що знаходяться біля 6-го атома вуглецю на нижньому вінці молекули β -ЦД.

Таким чином, проведені дослідження дають підставу для висновку, що між циклодекстринами (ГП- β -ЦД і β -ЦД) та бичачим сироватковим альбуміном утворюються як комплекси включення (мольне стехіометричне співвідношення ГП- β -ЦД з БСА становить 10 : 1 відповідно), так і взаємодія, яка відбувається внаслідок утворення фізичної сітки зв'язків (водневих, іон-дипольних) за участю функціональних груп БСА та гідроксилів ЦД.

1. Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry // Chem. Rev. – 1998. – **98**. – Р. 1743–1753.
2. Cyclodextrins and their complexes. Chemistry, analytical methods, applications / Ed. H. Dodziuk. – Weinheim: Wiley-VCH, 2006. – 489 p.
3. Клочков С. В., Компанцева Е. В., Бердник Е. Н. др. Исследование клатрообразования β -циклодекстрина с метапрогеролом // Хим.-фарм. журн. – 1991. – **25**, № 11. – С. 67–69.
4. Беликов В. Г., Компанцева Е. В., Гаврилин М. В., Умнова Э. Ф. Использование возможности бета-циклодекстрина для совершенствования процесса получения преднизолона // Там же. – 1991. – № 2. – С. 48–49.
5. Мадорский С. Термическое разложение органических полимеров / Пер. с англ. – Москва: Мир, 1967. – 328 с.
6. Хмельницкий Р. А., Лукашенко И. М., Бродский Е. С. Пиролитическая масс-спектрометрия высокомолекулярных соединений. – Москва: Химия, 1980. – 280 с.
7. Рябов С. В., Бойко В. В., Бортницький В. І. та ін. Вплив замісників в β -циклодекстрині на стабільність його комплексів включення з феноксатином // Доп. НАН України. – 2011. – № 5. – С. 145–149.
8. Бейнон Дж. Масс-спектрометрия и ее применение в органической химии / Пер. с англ. – Москва: Мир, 1964. – 701 с.
9. Каталог сокращенных масс-спектров. – Новосибирск: Наука, 1981. – 187 с.

10. Бойко В. В., Рябов С. В., Бортницький В. І. та ін. Особливості структурної будови похідних на основі β -циклодекстрину та тримелітового ангідрид хлориду // Укр. хім. журн. – 2011. – 77, № 3. – С. 48–53.

*Інститут хімії високомолекулярних
сполук НАН України, Київ
Інститут молекулярної біології
і генетики НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 29.05.2012

**И. В. Бабич, С. В. Рябов, В. В. Бойко, Т. В. Дмитриева, В. И. Бортницкий,
А. В. Козлов, член-корреспондент НАН Украины Ю. Ю. Керча**

Комплексы включения циклодекстринов с альбумином

Методами УФ спектроскопии и пиролитической масс-спектрометрии изучали особенности комплексов включения циклодекстринов (β -ЦД и ГП- β -ЦД) и белка — бычьего сывороточного альбумина при разных мольных соотношениях компонентов. Полученные результаты могут служить основой для дальнейших исследований по созданию аналогичных систем на основе различных протеинов для медицинских целей.

**I. V. Babych, S. V. Riabov, V. V. Boyko, T. V. Dmitrieva, V. I. Bortnitskiy,
A. V. Kozlov, Corresponding Member of the NAS of Ukraine Yu. Yu. Kercha**

Inclusion complexes of cyclodextrins with bovine serum albumin

Involving UV-Vis spectroscopy and pyrolytic mass-spectrometry, the peculiarities of inclusion complexes based on cyclodextrins (β -CD and HP- β -CD) and bovine serum albumin BSA (at different molar ratios) are investigated. The results obtained could be a basis for the further development and research of analogous systems based on different proteins to be applied to medicine.