

ГЕТЕРОАССОЦИАЦИЯ МОЛЕКУЛ ТИАЗИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ И КОФЕИНА В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

Барановский С.Ф., Чернышев Д.Н., Албет М.А.

Севастопольский государственный университет
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: sfbar@yandex.ru
Поступила в редакцию: 18.07.2020

Аннотация. Результаты исследования ассоциации молекул метиленового голубого и кофеина в водном растворе методом спектрофотометрии проанализированы с использованием димерной модели. Выполнено разложение экспериментального спектра поглощения смеси гетероциклических молекул на индивидуальные составляющие. По данным отдельных компонентов спектра (по положению и интенсивности полос поглощения), полученным из сопоставления экспериментальных и расчетных спектров методом регуляризации, проведена оценка в точечно - дипольном приближении структурных параметров гетерокомплекса: расстояния и угла между точечными дипольными моментами переходов разнородных молекул 0,34 нм и 38° соответственно.

Ключевые слова: спектрофотометрия, поглощение, краситель, кофеин, мономер, димер, гетероассоциация, димерная модель, константы ассоциации, дипольный момент перехода, структурные параметры.

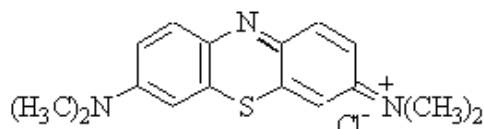
Изучение разнородной ассоциации биологически активных гетероциклических молекул в водном растворе с определением структурных особенностей гетерокомплексов важно для понимания взаимодействия подобных молекул как между собой, так и с биополимерами. Одним из наиболее чувствительных методов исследования нековалентного связывания молекул является электронная спектроскопия, позволяющая получить информацию о структурных параметрах образующихся ассоциатов. При этом существенное значение имеет обработка экспериментальных данных, базирующаяся на решении соответствующих обратных задач.

В работе изучена ассоциация молекул тиазинового красителя – метиленового голубого (МГ) и кофеина в водном растворе методами спектрофотометрии. Краситель МГ относится к классу биологически активных веществ, способных связываться интеркаляционным способом с молекулами нуклеиновых кислот [1]. Чувствительность МГ к различным конформационным перестройкам молекул ДНК в ядрах клеток позволяет использовать его в качестве меток при изучении структурных изменений молекул биополимеров. МГ – активный фотосенсибилизатор, используемый при фотодинамической терапии злокачественных опухолей [2]. Кофеин способен “перехватывать” ароматические красители посредством гетероассоциации [3,4], изменяя тем самым их медико - биологическую активность.

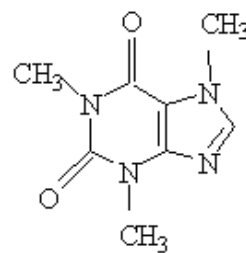
При интерпретации экспериментальных данных использована димерная модель, в которой рассматриваются реакции самоассоциации и образования комплексов 1:1 при гетероассоциации молекул. Модель основывается на законе аддитивности поглощения света и уравнениях теории химических равновесий, позволяющих связать общие концентрации веществ с их равновесными концентрациями в различных молекулярных формах (мономеров, димеров), а также равновесными константами ассоциации [5,6]. Предложена процедура разделения спектра на индивидуальные компоненты с использованием данной модели и экспериментальных спектров, измеренных при различных концентрациях кофеина (рис. 1) [5]. По данным спектральных составляющих, полученным из сопоставления экспериментальных и расчетных спектров, выполнена оценка структурных параметров гетерокомплекса в диполь – дипольном приближении.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Электронные спектры поглощения растворов МГ и кофеина регистрировали, как и ранее [7], в видимой области спектра. Краситель МГ и кофеин (Sigma, США) использовались в экспериментах без дополнительной очистки.



Метиленовый голубой



Кофеин

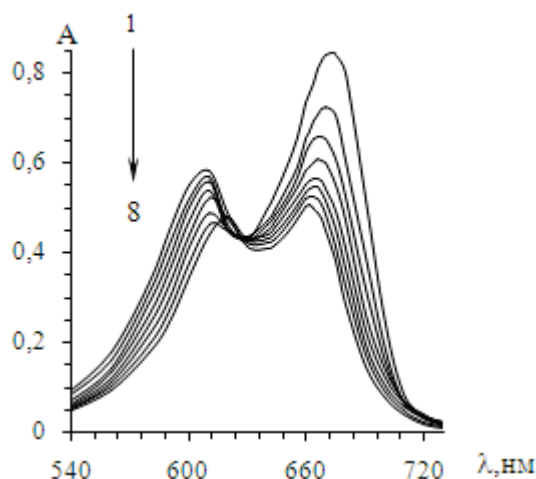


Рисунок 1. Спектры поглощения водного раствора метиленового голубого ($[P_0] = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M} = \text{const}$) при различных концентрациях кофеина: $1,85 \cdot 10^{-2}$ (1), $1,25 \cdot 10^{-2}$ (2), $8 \cdot 10^{-3}$ (3), $4 \cdot 10^{-3}$ (4), $2,25 \cdot 10^{-3}$ (5), $1 \cdot 10^{-3}$ (6), $1 \cdot 10^{-4}$ (7), 0 (8).

При титровании МГ взяты растворы кофеина концентраций в пределах $1 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$. Концентрация МГ в смешанном растворе поддерживалась постоянной ($[P_0] = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$). Измерения проводились в стеклянных кюветах с длиной оптического пути 0,0207 и 0,0505 см при $T = 293 \text{ K}$. Растворы красителя и кофеина готовились в 0,1 М Na-фосфатном буфере (рН 6,7) с применением бидистиллированной воды.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлены экспериментальные спектры водных растворов МГ с различным содержанием кофеина. Изменения в спектрах поглощения МГ, а также наличие изобестической точки свидетельствуют о формировании в водном растворе гетерокомплексов [7].

Динамическое равновесие в растворе моделировалось схемой:



где K_{dP} и K_{dL} и K – равновесные константы димеризации молекул МГ и кофеина и их гетероассоциации соответственно; P_1 , P_2 , L_1 и L_2 – мономеры и димеры молекул МГ и кофеина; P_1L_1 – гетерокомплекс. Экспериментально наблюдаемое поглощение исследуемых растворов описывается выражением:

$$A = A_1 + A_2, \quad (2)$$

где A_1 и A_2 – оптические плотности свободных и связанных молекул МГ и кофеина при толщине поглощающего слоя исследуемых растворов, равной 1 см:

$$A_1 = \varepsilon_m^P [P_1] + 2\varepsilon_d^P K_{dP} [P_1]^2 + \varepsilon_k^P K [P_1][L_1], \quad A_2 = \varepsilon_m^L [L_1] + 2\varepsilon_d^L K_{dL} [L_1]^2 + \varepsilon_k^L K [P_1][L_1]. \quad (3)$$

Здесь ε_m^P , ε_d^P , ε_m^L , ε_d^L – коэффициенты молярного поглощения лигандов P и L в мономерной и димерной формах соответственно; ε_k^P , ε_k^L – коэффициенты молярного поглощения МГ и кофеина в составе гетерокомплекса; $[P_1]$ и $[L_1]$ – равновесные концентрации мономеров МГ и кофеина.

Ассоциация исследуемых молекул существенно влияет на интенсивность и положение полос их спектров поглощения – они зависят от взаимного расположения мономеров в димерных комплексах. Поэтому из спектров поглощения ассоциатов можно получить информацию о структуре димеров.

Для оценки структурных параметров молекулярных комплексов использованы их спектры, выделенные из экспериментальных спектров (рис. 1), в составе пяти компонентов (двух мономерных и трех димерных). Индивидуальные составляющие (или пять групп параметров: ε_{mi}^P , ε_{mi}^L , ε_{di}^P , ε_{di}^L , ε_{ki}) получены при совместной обработке экспериментальных данных (рис. 1) с использованием равновесных констант K , K_{dP} , K_{dL} [5,7]. Поиск спектральных составляющих, принадлежащий к классу обратных задач, осуществлен путем минимизации функционала:

$$S = \sum_{j=1}^l \sum_{i=1}^n \sum_{q=1}^g (A_{ji}^{\delta} - A_{jiq})^2, \quad (4)$$

с ограничениями на параметры каждой группы:

$$\varepsilon_{\min i} \leq \varepsilon_i \leq \varepsilon_{\max i},$$

где A_{ji}^{δ} – экспериментальные оптические плотности растворов, измеренные с погрешностью δ , A_{jiq} – расчетные оптические плотности растворов; индекс q – нумерует оптические плотности различных форм ассоциатов; i – номер оптической плотности, соответствующей λ_i ; j – номер спектра (концентрации); $\varepsilon_{\min i}$ и $\varepsilon_{\max i}$ – нижняя и верхняя допустимые границы параметра ε_i . Концентрации $[P_1]$ и $[L_1]$ определяли из уравнений материального баланса [5,6].

При выполнении вычислительной процедуры обработки экспериментальных спектров задача поиска индивидуальных составляющих (или минимизации функционала (4)) заменялась несколькими задачами меньшей размерности. Спектральные характеристики раствора, согласно их физическому смыслу, объединены в три группы, содержащие одинаковое количество параметров. Одной группой параметров ε_{ai} описывается поглощение молекул в ассоциированной форме, остальными (ε_{mi}^P и ε_{mi}^L) – поглощение молекул в свободной форме. Минимизация функционала выполнена варьированием спектральных параметров каждой группы в отдельности внутри физически допустимой области их изменения при фиксированных параметрах остальных групп. На начальном этапе минимизации параметрам ε_{mi}^P и ε_{mi}^L присваивались числовые значения, полученные ранее при изучении самоассоциации молекул МГ и кофеина [5,7]. Параметры ε_{ai} вычислены путем их варьирования до тех пор, пока они не стабилизировались при некотором минимальном значении суммы (4). На следующих этапах минимизации варьируются другие спектральные характеристики, а две оставшиеся группы параметров фиксируются. С учетом положения оптимума суммы (4) в многомерном пространстве спектральные характеристики ε_{ai} , обобщенно отражающие ассоциацию молекул, представляются тремя группами параметров: ε_{ki} , ε_{di}^P и ε_{di}^L , описывающими поглощение молекул в составе димеров: P_1L_1 , P_2 и L_2 . При замене исходной задачи пятью подзадачами сумма квадратов невязок (4) дополняется регуляризирующим членом [8,9]:

$$S = \sum_{j=1}^l \sum_{i=1}^n \sum_{q=1}^g (A_{ji}^{\delta} - A_{jiq})^2 + \text{reg}(\varepsilon_d^P, \varepsilon_m^P, \varepsilon_k, \alpha), \quad (5)$$

где α – коэффициент регуляризации. Регуляризирующий член, состоящий из трех слагаемых

$$\text{reg}(\varepsilon_d^P, \varepsilon_m^P, \varepsilon_k, \alpha) = \alpha((\varepsilon_m^P - \varepsilon_{m664}^P)^2 + (\varepsilon_d^P - \varepsilon_{d664}^P)^2 + (\varepsilon_k - \varepsilon_{k664})^2), \quad (6)$$

содержит коэффициент регуляризации α и числовые значения параметров ε_m^P , ε_d^P , ε_k , полученные ранее [7], на длине волны 664 нм (ε_{m664}^P , ε_{d664}^P , ε_{k664}). Регуляризирующее звено делает функционал (6) более выпуклым, позволяющим точнее определить компоненты спектра поглощения смеси МГ и кофеина. Выбор регуляризирующего решения осуществляется при условии, что невязки не превышают заданную величину δ и

$$\text{reg}(\varepsilon_d^P, \varepsilon_m^P, \varepsilon_k, \alpha) = \min. \quad (7)$$

Минимизация функционала (5) выполняется при каждом значении коэффициента α и согласовании его с погрешностью измерений δ по сумме квадратов невязок:

$$\sum_{j=1}^l \sum_{i=1}^n \sum_{q=1}^g (A_{ji}^{\delta} - A_{jiq})^2 \leq n l \delta^2. \quad (8)$$

При этом, перебирая различные значения коэффициента регуляризации α , необходимо следить за получаемыми невязками и выбирать такие решения ($\varepsilon_{mi}^P, \varepsilon_{mi}^L, \varepsilon_{ki}$), которые удовлетворяют критериям (7) и (8), значение $\alpha > 0$, как правило, уменьшается вплоть до выполнения условия (8). Процедура поиска α и индивидуальных составляющих останавливается, когда впервые выполняется неравенство (8), поскольку нет оснований минимизировать отклонения от данных измерений за пределами уровня ошибки. Заданная точность

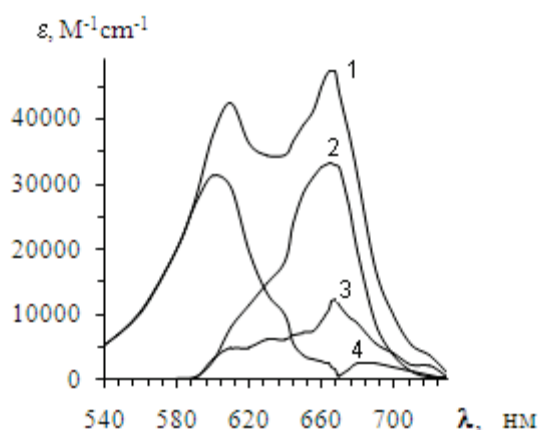


Рисунок 2. Спектр поглощения водного раствора смеси МГ + кофеин ($[P_0] = 2.5 \cdot 10^{-4}$ М; $[L_0] = 2.25 \cdot 10^{-3}$ М) (1) и его отдельные компоненты: 2 – спектр мономеров МГ; 3 – спектр разнородных димеров МГ + кофеин; 4 – однородных димеров МГ + МГ

решения достигается в ходе уточняющего поиска спектральных характеристик, представляющего повторяющиеся решения пяти подзадач минимизации функционала (5). Полученному минимуму функционала соответствует набор спектральных (индивидуальных) составляющих экспериментального спектра (рис. 2).

На рисунке 2 составляющие ε_{mi}^L и ε_{di}^L не представлены, так как в исследуемом диапазоне длин волн числовые значения молярных коэффициентов поглощения кофеина в свободном и димерном состояниях на два – три порядка меньше ε_{mi}^P , то есть оценка пространственных параметров гетерокомплекса проведена по данным ε_{mi}^P и ε_{ki} .

Из сопоставления экспериментальных и расчетных данных следует, что при разнородной ассоциации происходит сдвиг полосы поглощения красителя. Максимум спектра поглощения МГ, входящего в состав гетерокомплекса, смещен относительно полосы свободных молекул МГ (664 нм) в длинноволновую сторону на 4 нм (рис. 2). Димерная составляющая ($\varepsilon_d^P(\lambda_i)$, рис. 2) содержит две полосы поглощения, смещенные в разные стороны по отношению к максимуму поглощения мономеров МГ.

Энергия поглощения молекулы красителя E в составе гетерокомплекса под действием соседней молекулы изменяется [10-12]:

$$E = E_{MG} + 2 \frac{E_{MG} \mu_{MG}^2 \mu_{коф}^2}{(E_{MG}^2 - E_{коф}^2)} G^2, \quad (9)$$

где μ_{MG} и $\mu_{коф}$ – дипольные моменты переходов мономеров МГ и кофеина на длинах волн λ_{MG} и $\lambda_{коф}$, соответствующих максимумам поглощения молекул в свободном состоянии; E_{MG} и $E_{коф}$ – энергии поглощения молекул МГ и кофеина в мономерной форме; G – геометрический фактор, зависящий от взаимного расположения дипольных моментов переходов мономеров в составе гетерокомплекса: $G = (\cos\varphi - 3\cos\theta_{MG} \cos\theta_{коф}) / 4\pi\epsilon_0\epsilon R^3$, где φ – угол между дипольными моментами переходов молекул МГ и кофеина в составе гетерокомплекса, R – расстояние между точечными дипольными моментами переходов молекул МГ и кофеина, θ_{MG} , $\theta_{коф}$ – углы между вектором R , соединяющим μ_{MG} и $\mu_{коф}$, и векторами этих дипольных моментов, ϵ_0 , ϵ – электрическая постоянная и диэлектрическая проницаемость среды.

С учетом выражения (9) в точно-дипольном приближении, длину волны полосы поглощения МГ ($\lambda = 668$ нм) в составе гетерокомплекса можно представить в виде:

$$\frac{1}{\lambda} = \frac{1}{\lambda_{MG}} + \frac{2\lambda_{MG}^2 \lambda_{коф} \mu_{MG}^2 \mu_{коф}^2 G^2}{(\lambda_{коф}^2 - \lambda_{MG}^2) h^2 c^2}, \quad (10)$$

где c – скорость света; h – постоянная Планка.

Интенсивность полосы МГ (f) в составе гетерокомплекса описывается выражением [10-12]:

$$\frac{f}{f_{MG}} = 1 + \frac{4}{hc} \cdot \frac{\lambda_{MG}^2 \lambda_{коф} \mu_{коф}^2 G}{\lambda_{коф}^2 - \lambda_{MG}^2} \cdot \cos\varphi, \quad (11)$$

где f и $f_{\text{МГ}}$ – сила осциллятора электронного перехода молекул МГ на длине волны максимума поглощения МГ в составе гетерокомплекса и на длине волны $\lambda_{\text{МГ}}$.

Полученные составляющие экспериментального спектра были использованы для расчета структурных параметров 1:1 гетероассоциата МГ+ кофеин в водном растворе. Взаимное расположение точечных дипольных моментов переходов определяли по положению и интенсивности полос поглощения молекул метиленового голубого в мономерной форме и в составе гетерокомплекса (рис.2) с использованием формул (10) и (11). Данные спектральной полосы (f) [12], а также структур гетерокомплексов образуемых кофеином с молекулами, подобными МГ [3,4], позволяют предположить, что исследуемые молекулы образуют стопочные гетероассоциаты. Оценочные значения структурных параметров гетерокомплекса составляют: $\theta_{\text{коф}} = \theta_{\text{МГ}} = \pi/2$, $\varphi = 38^\circ$, $R = 0,34$ нм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При совместной обработке спектров поглощения водных растворов смеси гетероциклических молекул, измеренных при различных концентрациях кофеина с применением димерной модели, выполнено разделение экспериментального спектра на индивидуальные компоненты. По данным спектральных составляющих, полученным из сопоставления экспериментальных и расчетных спектров методом регуляризации с использованием параметров $K_{\text{дР}}$, $K_{\text{дL}}$, K , $\epsilon_{\text{м}664}^{\text{P}}$, $\epsilon_{\text{д}664}^{\text{P}}$ и $\epsilon_{\text{к}664}$, выполнена оценка углов между дипольными моментами переходов молекул триазинового красителя и кофеина, и расстояния между плоскостями хромофоров взаимодействующих молекул в гетерокомплексе состава 1:1. Полученные значения структурных параметров, в значительной степени зависят от структурных особенностей хромофоров ассоциирующих молекул и их дипольных моментов переходов. Детальный анализ ассоциации гетероциклических молекул важен для выяснения сиквенс-специфичного взаимодействия лигандов с биополимерами.

Список литературы / References:

1. Abe H., Wagner S.J. Analysis of viral DNA, protein and envelope damage after methylene blue, phthalocyanine derivative or merocyanine 540 photosensitization. *Photochem Photobiol*, 1995, vol. 61, pp. 402-409.
2. Orth K., Ruck A., Beck G., Stanescu A., Beger H.G. Photodynamic therapy of small adenocarcinomas with methylene blue (in German). *Chirurg*, 1995, vol. 66, pp. 1254 -1257.
3. Larsen R. W., Jasuja R., Hetzler R., Muraoka P.T., Andrada V.G., Jameson D.M. Spectroscopic and molecular modelling studies of caffeine complexes with DNA intercalators. *Biophys. J*, 1996, vol. 70, pp. 443-452.
4. Davies D.B., Veselkov D.A., Djimant L.N., Veselkov A.N. Hetero-association of caffeine and aromatic drugs and their competitive binding with a DNA oligomer. *Eur. J. Biophys*, 2001, vol. 30, pp. 354-366.
5. Барановский С.Ф., Чернышев Д.Н. Гетероассоциация молекул кофеина и фенантридинового красителя в водном растворе. *Журн. прикл. спектр.*, 2018, т. 85, № 4, с. 532-537. [Baranovskiy S.F., Chernyshev D.N. Complexation Heteroassociation of caffeine and a phenanthridine dye in aqueous solution. *J. Appl. Spectrosc.*, 2018, vol. 85, no. 4, pp. 588-593. (In Russ.)]
6. Веселков А.Н., Барановский С.Ф., Дымант Л.Н. Исследование ассоциации красителей акридинового ряда методом протонного магнитного резонанса. *Хим. физика*, 1986, т. 5, с. 318-323. [Veselkov A.N., Baranovskiy S.F., Djimant L.N. Study of the association of the acridine dyes by means of proton magnetic resonance. *Russ. J. Phys. Chem.*, 1986, vol. 5, pp. 318-323. (In Russ.)]
7. Барановский С.Ф., Болотин П.А., Евстигнеев М.П. Агрегация 1,3,7 – триметилксантина с метиленовым голубым в водном растворе. *Журн. прикл. спектр.*, 2006, т. 73, № 2, с. 158-163. [Baranovskii S.F., Bolotin P.A., Evstigneev M.P. Aggregation of 1,3,7-trimethylxanthine with methylene blue in aqueous solution. *J. Appl. Spectrosc.*, 2006, vol. 73, no. 2, pp. 171-177. (In Russ.)]
8. Тихонов А.Н., Арсенин В.Я. *Методы решения некорректных задач*. М.: Наука, 1979, 285 с. [Tikhonov T.N., Arsenin V.Y. "The Methods of Solution of incorrect Problems, Moscow: Nauka, 1979, 285p. (In Russ.)]
9. Тихонов А.Н., Гончарский А.В., Степанов В.В., Ягола А.Г. *Численные методы решения некорректных задач*. М.: Наука, 1990, 230 с. [Tikhonov A.N., Goncharsky A.V., Stepanov V.V., Yagola A.G. *Numerical Methods for the Solution of incorrect Problems*. Moscow, Nauka, 1990, 230 p. (In Russ.)]
10. Tinoco J. Hypochromism in polynucleotides. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1960, vol. 82, pp. 4785-4790.
11. Rhodes W. Hypochromism and other spectral properties of helical polynucleotides. *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, vol. 83, pp. 3609-3617.
12. *Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот* (ред.: Лазуркин Ю.С.). М.: Наука, 1967, 323 с. [*Physical methods of investigation of proteins and nucleic acids* (ed.: Lazurkin Yu.S.). Moscow: Nauka, 1967, 323 p. (In Russ.)]

HETEROASSOCIATION OF THIAZINE DYE MOLECULES AND CAFFEINE IN AQUEOUS SOLUTION

Baranovskiy S.F., Chernyshev D.N., Albet M.A.

Sevastopol State University

Universitetskaya St., 33, Sevastopol, 299053, Russia

Abstract. The results of the study of the association of methylene blue and caffeine molecules in aqueous solution by spectrophotometry were analyzed using a dimer model. The decomposition of the experimental absorption spectrum of a mixture of heterocyclic molecules into individual components is performed. According to the data of individual components of the spectrum (position and intensity of absorption bands) obtained from comparison of experimental and calculated spectra by regularization, the structural parameters of the heterocomplex were estimated in the exact-dipole approximation: the distance and angle between the point dipole moments of transitions of dissimilar molecules 0.34 nm and 38 °, respectively.

Key words: *spectrophotometry, absorption, dyes, caffeine, monomer, dimer, hetero - association, dimer model, association constant, transition dipole moment, structural parameters.*