

ИССЛЕДОВАНИЕ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РЕЗВЕРТРОЛА С β -ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ В НЕКОТОРЫХ РАСТВОРИТЕЛЯХ

Г.В. Васильев
И.П. Анисимович
А.Ю. Михеев
В.И. Дейнека
О.О. Новиков

Белгородский
государственный
университет,
Россия, 308015, г. Белгород,
ул. Победы, 85,

E-mail: deineka@bsu.edu.ru

В работе исследовано взаимодействие *транс*- и *цис*-резвератрола с β -циклодекстрином хроматографическим методом и по методу растворимости. Показано, что оба метода дают согласующиеся результаты. Впервые установлено, что возможна аппроксимация констант комплексообразования на составы растворителей за пределы составов использованных в ВЭЖХ подвижных фаз.

Ключевые слова: *цис*- и *транс*-резвератрол, β -циклодекстрин, комплексы включения, ВЭЖХ, растворимость.

Резвератрол (5-[2-(4-гидроксифенил)этиленил]бензол-1,3-диол или *транс*-3,5,4'-тригидроксостильбен) был впервые выделен из корней одного из видов чемедицы (*Veratrum grandiflorum*) в 1940 году [1]. В настоящее время резвератрол обычно ассоциируется с виноградом, в котором он присутствует главным образом в виде 3-O- β -D-глюкозида (пицеида, piceid) (схема 1) [2], хотя известно более 70 других растительных источников этого соединения [1, 3]. Резвератрол относят к фитоалексинам - вторичным метаболитам, синтезируемым растениями в ответ на биотический и абиотический стресс [4]. Экстракты, содержащие агликон или его глюкозид, издавна использовались в традиционной китайской и японской медицине для лечения различных заболеваний. К настоящему времени высокая биологическая активность резвератрола (в том числе и антиканцерогенная) подтверждена экспериментально в многочисленных исследованиях [5, 6], что объясняет высокий интерес исследователей к этому соединению.

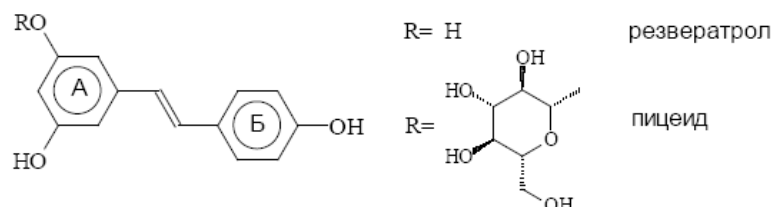


Схема 1. Строение *транс*-резвератрола и пицеида

Однако резвератрол обладает невысокой растворимостью в воде [6], осложненную к тому же быстрым метаболизмом – полупериод жизни резвератрола в организме составляет примерно 8 – 14 мин, что снижает его биодоступность, [6]. Примечательно, что именно технологии супрамолекулярной химии предназначены для решения подобного рода проблем: образование комплексов «гость – хозяин» позволяет изменять и растворимость, и устойчивость молекул «гостей». Целый ряд исследований [7–13] показал, что в качестве «хозяина» для образования комплексов с резвератролом удобно использование циклодекстринов, обладающих подходящим размером полости, не токсичных и разрешенных к использованию в медицинской и пищевой промышленности [14]. Однако между значениями констант комплексообразования, полученных различными авторами с использованием различных методов, существуют большие расхождения. Данная работа посвящена исследованию комплексообразования резвератрола с β -циклодекстрином параллельно двумя методами – хроматографическим и по растворимости, а также и решению ряда сопутствующих проблем.



Экспериментальная часть

Хроматографическая система была составлена из насоса высокого давления Векман 110В, крана дозатора Rheodyne 7125 с петлей объемом 20 мкл; спектрофотометрического детектора с изменяемой длиной волны Nicolet LC/9563 ($\lambda = 306$ нм). Для регистрации и обработки хроматограмм использовали ПП МультиХром 1.5. Хроматографическая колонка 100×4 мм Диасфер-110-С18. Все хроматографические исследования выполняли при комнатной температуре.

Для приготовления подвижных фаз использовали дистиллированную воду, ацетонитрил (HPLC-gradient grade, Panreac), уксусную кислоту (х.ч., Вектон). В работе использовали резвератрол и β -циклодекстрин (КНР). Чистоту резвератрола проверяли хроматографическим (индивидуальный пик на хроматограмме) и спектроскопическим методом (по сопоставлению коэффициента молярного погашения с литературными данными). *Цис*-изомер резвератрола получали действием прямого солнечного света на раствор *транс*-резвератрола в кварцевой посуде – нескольких минут достаточно для получения раствора с сопоставимыми концентрациями двух изомеров. Чистота использованного в работе β -циклодекстрина была проверена записью хроматограммы раствора в условиях обращено-фазовой ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием в водно-метанольной (8 об.%) подвижной фазе – на хроматограмме был обнаружен только один пик с удерживанием близким к литературным данным [15].

По методу растворимости в вials вместимостью 15 мл добавляли по 10 мл соответствующего растворителя с различной концентрацией β -циклодекстрина и избыток резвератрола. Смесь при периодическом встряхивании выдерживали в течение суток вне доступа прямого солнечного света при комнатной температуре. Избыток резвератрола отделяли центрифугированием, а концентрацию резвератрола в растворе определяли методом ВЭЖХ.

Компьютерное моделирование комплексов включения осуществляли в программном пакете HyperChem 8.0 с оптимизацией геометрии методом ММ+.

Обсуждение полученных результатов

С использованием метода молекулярного моделирования авторы работы [13] пришли к выводу о том, что внедрение молекулы резвератрола в полость β -циклодекстрина осуществляется кольцом А, содержащим две гидроксильные группы, а кольцо Б с одной гидроксильной группой ориентировано наружу. С этим выводом (или интерпретацией) сложно согласиться, если учесть полученные нами результаты по исследованию комплексообразования между β -циклодекстрином и фенольными кислотами (производными рядов бензойной и коричной кислот [16]) (табл. 1).

По нашим данным в случае обоих типов фенольных кислот комплексообразование несколько увеличивается при введении гидроксильной группы в *пара*-положение. Эта стабилизация комплекса может быть объяснена образованием объемной сольватной оболочки вокруг гидроксильной группы, выходящей за нижний обод β -циклодекстрина. Добавление дополнительной гидроксильной или метоксильной группы в *мета*-положение кислот всегда существенно снижало константы комплексообразования, причем в случае более объемной метоксильной группы, повышающей гидрофобность молекулы, снижение константы было больше, чем при добавлении гидроксильной группы, увеличивающей гидрофильность молекулы. Следовательно, в рассматриваемом случае устойчивость комплексов «гость-хозяин» определяется не гидрофильно-гидрофобными свойствами заместителей в *мета*-положении, а стерическими факторами. Добавление третьей группы (с заполнением обоих *мета*-положений) приводило к дальнейшему уменьшению констант.

Следовательно, в случае пары « β -циклодекстрин – резвератрол» на роль гостя скорее претендует именно кольцо Б, с гидроксильной группой в *пара*-положении, а не кольцо А, с двумя *мета*-заместителями, схема 2.

Кстати, именно поэтому для резвератрола и β -циклодекстрина найдены комплексы только состава 1:1, а не 1:2 – по одной молекуле β -циклодекстрина на каждое из ароматических колец.

Таблица 1
Константы комплексообразования фенольных кислот с β -циклодекстрином

Заместители	Подвижные фазы	
	1	2
Производные бензойной кислоты		
нет	190	-
4-гидрокси	232	-
3,4-дигидрокси	82	-
3-метокси-4-гидрокси-	61	-
3,5-диметокси-4-гидрокси-	19	-
Производные <i>транс</i> -коричной кислоты		
нет	-	53
4-гидрокси-	270	56
3,4-дигидрокси	152	26
3-метокси-4-гидрокси-	-	14

Колонка: 150×4 мм, Диасфер-110-C18NT, 5 мкм.
Подвижные фазы: 1–10 об.% ацетонитрила 2–20 об.% ацетонитрила и 0,5 об.% уксусной кислоты в обеих фазах

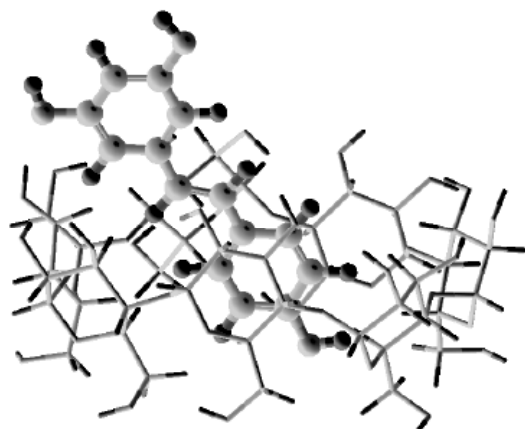


Схема 2. Моделирование строения комплекса включения *транс*-резвератрола с β -циклодекстрином

же не согласуется со строением комплекса, определенным по методу компьютерного моделирования [13], поскольку в предложенной авторами схеме при замене *транс*-резвератрола на *цис*-изомер геометрия комплекса должна измениться принципиально. При предлагаемом нами варианте образования комплекса внедрением в полость β -циклодекстрина кольца Б молекулы резвератрола кольцо А не должно существенно влиять на устойчивость комплекса, а в *цис*-изомере может реализоваться наиболее выгодная конформация кольца А относительно верхнего обода β -циклодекстрина. Кстати, снижение константы при переходе от *транс*- к *цис*-изомеру сопоставимо с уменьшением константы при удалении двойной связи при переходе от производных коричной к производным бензойной кислот (табл. 2).

Существуют несколько источников погрешности в определении констант различными методами. В хроматографическом методе специфическая погрешность связана с определением фактора удерживания сорбатов, $k(i)$, для расчета которого требуется определение так называемого «мертвого» времени колонки, t_0 . Можно показать прямыми расчетами, что относительная погрешность определения констант может достигнуть 10 % при малых временах удерживания, но не превышает 1 % при 5 % при по-

Метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), использованный в данной работе для определения констант комплексообразования, основан на простой зависимости между концентрацией β -циклодекстрина в подвижной фазе и фактором удерживания сорбата (для комплексов состава 1:1) [9]:

$$\frac{1}{k(i)} = \frac{1}{k_0(i)} + \frac{K_p(i)}{k_0(i)} \cdot [CD], \quad (1)$$

где $k(i)$ – фактор удерживания сорбата i ; $k_0(i)$ – фактор удерживания сорбата i в элюенте без β -циклодекстрина, $[CD]$ – концентрация β -циклодекстрина в подвижной фазе. По нашим данным во всех случаях соблюдалась линейность такого соотношения (рис.1), что подтверждало образование только комплексов состава 1 : 1 для обоих изомеров (*цис* и *транс*) резвератрола.

Метод ВЭЖХ имеет то преимущество, что возможно одновременное определение констант комплексообразования для нескольких молекул «гостей». Это позволило нам определять константы устойчивости и *транс*- и *цис*-резвератрола в одних и тех же условиях. При этом константа устойчивости *цис*-изомера оказалась лишь на 20–30 % меньше, чем для *транс*-изомера, табл.2, что так-



ложительных логарифмах факторов удерживания. Следовательно, более надежные константы комплексообразования можно получить при использовании коротких колонок и «медленных» элюентов.

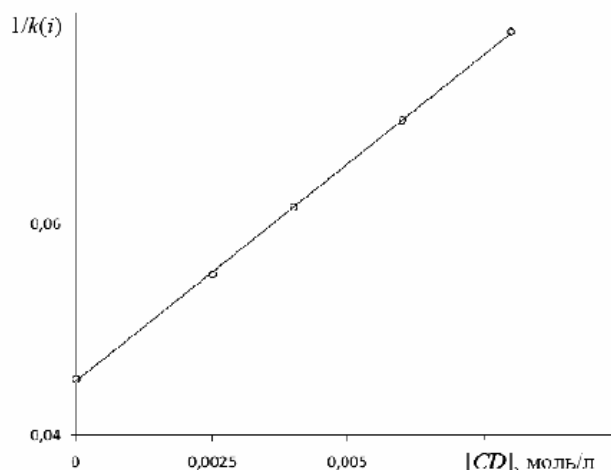


Рис. 1. Зависимость между фактором удерживания *транс*-резвератрола и концентрацией β -циклодекстрина в подвижной фазе
Колонка: 100×4 мм, Диасфер-110-С18, 5 мкм. Основа подвижной фазы: 15 об. % ацетонитрила и 2 об. % уксусной кислоты в воде

Таблица 2
Сопоставление констант комплексообразования изомеров резвератрола с β -циклодекстрином

Подвижная фаза, объемные доли, %		Константы устойчивости комплексов изомеров резвератрола с β -циклодекстрином	
CH ₃ CN	CH ₃ COOH	<i>транс</i> -	<i>цис</i> -
12.5	2	199	165
15.0	2	91	73
17.5	2	57	40

Другой источник погрешности количественно оценить труднее. Уравнение (1), применяемое для расчета константы комплексообразования, строго говоря, может быть использовано только в том случае, если удерживание сорбата изменяется исключительно за счет процессов комплексообразования в подвижной фазе при неизменности состояния стационарной фазы. Но наши исследования показали, что при увеличении концентрации β -циклодекстрина в подвижной фазе в случае кофеина удерживание даже немного увеличивается. Этот факт может быть следствием модификации поверхности октадецилсилановых фаз β -циклодекстрином. Действительно, если это соединение обладает гидрофобной полостью, то эта полость может заполняться не только сорбатом в подвижной фазе, но и углеводородными радикалами октадецилсиланизированной поверхности. По нашим данным удерживание β -циклодекстрина в использованных стационарных фазах оказалось весьма заметным ($k \approx 0.2$). Следовательно, с изменением концентрации β -циклодекстрина изменяется не только соотношение компонентов в подвижной фазе, но и состояние поверхности: за счет сорбции β -циклодекстрина увеличивается число доступных поверхностных гидроксильных групп. Тогда должно увеличиваться удерживание полярных соединений.

Для оценки правильности хроматографического метода, тем не менее, желательно сопоставить константы, получаемые для одного и того же набора растворов, но рассчитанные с использованием принципиально различных методов. В цитированных ранее работах использовались различные методы для расчета констант комплексообразования резвератрола. Так по флуориметрическим измерениям для температур 20, 30 и 40°C были получены константы комплексообразования резвератрола с



β -циклодекстрином на уровне двух тысяч (2122, 2038 и 1884, соответственно, [13]); по растворимости (метод фазовых диаграмм, [8]) при 37°C было найдено несколько большее значение константы - 2057. На том же уровне в диапазоне pH 4 ÷ 8 оказались константы, найденные методом ВЭЖХ [9], хотя авторы цитируемой работы использовали вместо стандартной обращенной фазы фазу GF-450, предназначенную для эксклюзивной хроматографии. В работе [10] по флуориметрическому методу также была получена константа немногим более двух тысяч, но ферментный метод (окисление резвератрола) и метод фазовых диаграмм приводили к получению примерно вдвое больших констант (4220 и 4438).

Приведенные выше значения констант бессмысленно напрямую сопоставлять с найденными в настоящей работе, табл.2, поскольку в использованной нами обращено-фазовой хроматографии для получения приемлемых времен удерживания и симметричной формы пиков в элюент необходимо добавлять органические модификаторы (в нашем случае - ацетонитрил и уксусную кислоту). Но эти вещества также обладают некоторой неполярностью и могут конкурировать с резвератролом за место в полости, что подтверждается уменьшением констант при росте концентрации ацетонитрила в подвижной фазе, табл. 2. По этой причине мы выполнили параллельное определение константы методом ВЭЖХ и методом растворимости для одних и тех же растворов β -циклодекстрина в растворителе (в подвижной фазе), содержащей 12.5 об.% ацетонитрила и 2 об.% уксусной кислоты. Расчет показал неплохое совпадение: по растворимости среднее значение константы составило 190 при значении 199, полученном по методу ВЭЖХ.

Полученные данные свидетельствуют о достаточной надежности хроматографического метода определения констант комплексообразования. В таком случае представляет интерес возможность аппроксимации констант интерполяцией данных за пределы использованного диапазона составов подвижных фаз. В жидкостной хроматографии для аппроксимации параметров удерживания используют полулогарифмические координаты «логарифм фактора удерживания, $\lg k(i)$, vs объемная доля органического модификатора, Φ », для которых предполагается либо линейная, либо квадратичная функциональная зависимость [17]. Для констант комплексообразования можно предполагать в первом приближении линейную взаимосвязь:

$$\lg K_p(i) = a + b \cdot \Phi, \quad (2)$$

где Φ – объемная доля органического модификатора в подвижной фазе.

Полученные в настоящей работе значения констант комплексообразования в подвижных фазах, в которых постоянным оставалась концентрация уксусной кислоты (2 об. %), но изменялась концентрация ацетонитрила (12,5 ÷ 30 об. %), удовлетворительно аппроксимируются прямолинейной зависимостью (2), рис.1:

$$\lg K_p(i) = 3.639 - 0.108 \cdot \Phi. \quad (R^2 = 0.9954).$$

При аппроксимации на нулевое содержание ацетонитрила получается константа 4350, что соответствует бóльшим значениям из литературных данных. Для контроля мы рассчитали константу по методу растворимости в водном растворе без каких-либо органических добавок, получив в итоге даже немного более высокое значение – 4717 (точка указана на рис.2 в логарифмических единицах).

Найденное различие (менее 10 %) между константами может быть объяснено, во-первых, обсуждавшимися выше погрешностями расчета констант, во-вторых, экспериментальными погрешностями, в-третьих, возможной необходимостью введения квадратичной зависимости, которая в обычной практике хроматографии чаще используется именно для водно-ацетонитрильных растворов (подвижных фаз) [17] и, в-четвертых, возможным влиянием на константу уксусной кислоты, входившей в состав всех элюентов. При этом однозначно то, что константа комплексообразования резвератрола с β -циклодекстрином выше четырех тысяч.

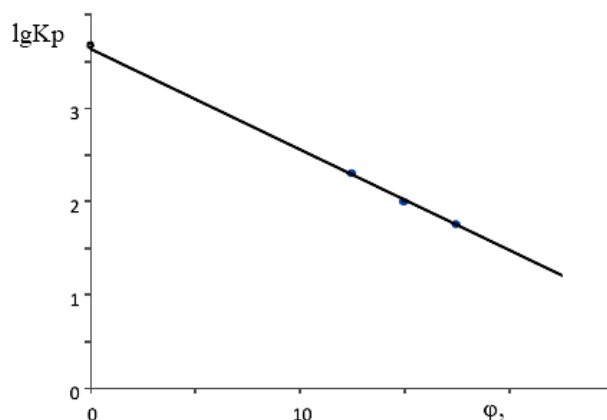


Рис.2. Зависимость констант комплексообразования резвератрола с β -циклодекстрином от концентрации ацетонитрила в подвижной фазе

Очевидно, что комплексообразование за счет внедрения в полость молекулы «хозяина» может изменить растворимость «гостей». При этом логично предположить и уменьшение химической активности молекулы «гостя» в реакциях, затрагивающих все части, кроме ориентированных на центры верхнего и нижнего обода циклодекстрина, т.к. доступ к ним затруднен или исключен стенками молекулы «хозяина». В случае резвератрола при его ориентации в полости в соответствии со схемой 2, увеличения химической активности ожидать не следует. И действительно, в работах [10, 12, 18] найдено снижение скорости ферментного окисления резвератрола, увеличение его фотостабильности и неизменность ряда биологически важных свойств при образовании комплексов. Однако в работе [11] приводятся данные, свидетельствующие об усилении способности резвератрола к перехвату радикалов при добавлении β -циклодекстрина по методике с использованием 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH) [19]. Мы проверили влияние β -циклодекстрина на антиоксидантные свойства резвератрола по методу [20] в котором в качестве окислителя используется Fe^{3+} с последующим определением образовавшегося Fe^{2+} по образованию окрашенного комплекса с 2,2'-дипиридиллом (рис. 3).

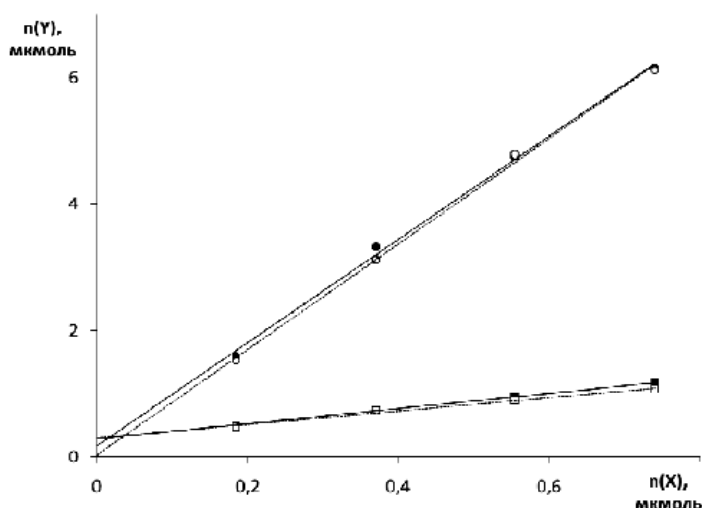


Рис.3. Восстановительная активность резвератрола и кверцетина до и после образования комплексов включения с β -циклодекстрином

Оси абсцисс – число моль исследуемого соединения (□ и ■ – резвератрол, ○ и ● – кверцетин; по оси ординат – число моль образовавшихся ионов Fe^{2+} , экспериментальные данные для образцов – незаполненные значки и пунктирная линия

По полученным данным (по тангенсу угла наклона прямой линии, аппроксимирующей экспериментальные данные, рис. 3) восстановительная (антиоксидантная) активность резвератрола, во-первых, примерно в 8 раз ниже, чем кверцетина, т.е. рас-



смаатривать это соединение в качестве антиоксиданта можно лишь условно, поскольку и реальная концентрация его в природных источниках также мала. Во вторых, образование комплексов с β -циклодекстрином не только не повышает эту активность, но и, наоборот, немного снижает ее.

Выводы

Транс- и *цис*-резвератрол образует комплекс включения с β -циклодекстрином состава 1:1 предположительно внедрением моногидроксилированного ароматического кольца. В работе определены константы комплексообразования в нескольких различных составах подвижных фаз. Показано, что константа комплексообразования в водном растворе может быть определена методом ВЭЖХ с аппроксимацией результатов на чисто водные растворы по линейной зависимости логарифма константы относительно объемной доли органического модификатора.

Список литературы

1. Orallo F. Biological effects of *cis*- versus *trans*-resveratrol / In «Resveratrol in health and disease». Ed. B.B. Aggarwal, S. Shishodia. CRC Press, Taylor & Francis group, LLC, 2006. – 641 с.
2. Romero-Pérez A.I., Maite Ibern-Gómez M., Lamuela-Raventós R.M., M. de la Torre-Boronat C. Piceid, the Major Resveratrol Derivative in Grape Juices // J. Agric. Food Chem. – 1999. – Vol. 47. – P. 1533–1536.
3. Delaunoy B., Cordelier S., Conreux A., Clément C., Jeandet P. Molecular engineering of resveratrol in plants // Plant Biotechnol. J. – 2009. – Vol. 7. – P. 2–12.
4. Dixon R.A. Natural products and plant disease resistance // Nature. – 2001. – Vol. 411. – P. 843–847.
5. de la Lastra C.A., Villegas I. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications // Mol. Nutr. Food Res. – 2005. – Vol. 49. – P. 405–430.
6. Das S., Liu H.-S., Ho P.C., Ng K.-Y. The impact of aqueous solubility and dose on the pharmacokinetic profiles of resveratrol // Pharm. Res. – 2008. – Vol. 25. – P. 2594–2600.
7. López-Nicolás J.M., Núñez-Delgado E., Pérez-López A.J., Barrachina A.C., Cuadra-Crespo P. Determination of stoichiometric coefficients and apparent formation constants for β -cyclodextrin complexes of *trans*-resveratrol using reversed-phase liquid chromatography // J. Chromatogr. A. – 2006. – Vol. 1135. – P. 158–165.
8. Bertacche V., Lorenzi N., Nava D., Pini E., Sinico C. Host-Guest interaction study of resveratrol with natural and modified cyclodextrins // J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. – 2006. – Vol. 55. – P. 279–287.
9. López-Nicolás J.M., García-Carmona F. Rapid, simple and sensitive determination of the apparent formation constants of *trans*-resveratrol complexes with natural cyclodextrins in aqueous medium using HPLC // Food Chem. – 2008. – Vol. 109. – P. 868–875.
10. Lucas-Abellán C., Fortea M.I., Gabaldyn J.A., Núñez-Delgado E. Complexation of resveratrol by native and modified cyclodextrins: Determination of complexation constant by enzymatic, solubility and fluorimetric assays // Food Chem. – 2008. – Vol. 111. – P. 262–267.
11. Lu Z., Cheng B., Hu Y., Zhang Y., Zou G. Complexation of resveratrol with cyclodextrins: Solubility and antioxidant activity // Food Chem. – 2009. – V. 113. – P. 17–20.
12. Sapino S., Carlotti M.E., Caron G., Ugazio E., Cavalli R. In silico design, photostability and biological properties of complex resveratrol/hydroxypropyl- β -cyclodextrin // J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. – 2009. – Vol. 63. – P. 171–181.
13. Lu Z., Chen R., Liu H., Cheng B., Zou G. Study of the complexation of resveratrol with cyclodextrins by spectroscopy and molecular modeling // J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. – 2009. – V.63. – P. 295–300.
14. Stella V.J., He Q. Cyclodextrins // Toxicol. Pathol. – 2008. – V. 36. – P. 30–42.
15. Chatjigakis A.K., Cardot Ph.J.P., Coleman A.W., Parrot-Lopez H. Retention Properties of Cyclodextrins and Modified Cyclodextrins in Reversed Phase HPLC // Chromatographia. – 1993. – V. 36. – P. 174–178.
16. Анисимович И.П., Лапшова М.С., Дейнека Л.А., Дейнека В.И. Исследование образования комплексов включения β -циклодекстрина с фенольными кислотами методом ВЭЖХ / Высокие технологии, фундаментальные исследования, образование: сборник трудов Седьмой международной научно-практической конференции «Исследование, разработка и применение высоких технологий в промышленности». 28-30.04.2009, Санкт-Петербург, Россия / под ред. А.П. Кудинов. Г.Г. Матвиенко. – СПб.: Изд-во Политехн. Ун-та, 2009. – С. 159–161.



17. Baczek T., Kaliszan R., Claessens H.A., van Straten M.A. Computer-Assisted Optimization of Reversed-Phase HPLC Isocratic Separations of Neutral Compounds // LC•GC Europe. – 2001. – June. – P. 2–6.
18. Lucas-Abellán C., Fortea I., López-Nicolás J.M., Núñez-Delicado E. Cyclodextrins as resveratrol carrier system // Food Chem. – 2007. – V.104. – P. 39–44.
19. Sánchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols // J. Sci. Food Agric. – 1998. – V.76. – P. 270–276.
20. Темердашев З.А., Храпко Н.В., Цюпко Т.Г., Воронова О.Б., Балаба А.Н. Определение антиоксидантной активности пищевых продуктов с использованием индикаторной системы Fe (III) / Fe (II) – органический реагент // Заводск. Лаборат. – 2006. – Т.72, №11. – С. 15–19.

INVESTIGATION OF SUPRAMOLECULAR COMPLEXES: INTERACTION OF RESVARATROL WITH β -CYCLODEXTRIN IN SOME SOLVENTS

G.V. Vasiliev
I.P. Anisimovitch
A.Yu. Mikcheev
V.I. Deineka
O.O. Novikov

Belgorod State University,
Pobedy Str., 85, Belgorod,
308015, Russia
E-mail: deineka@bsu.edu.ru

In the paper interaction of *cis*- and *trans*-resveratrol with β -cyclodextrin has been investigated by two methods (chromatographic and solubility) simultaneously. The coincidence of the results was found, a possibility of approximation of the constants beyond mobile phase compositions under investigation has been proved.

Key words: *cis*- and *trans*-resveratrol, β -cyclodextrin, inclusion complexes, HPLC, solubility methods.