

УДК 547.918:577.112.387.2:543.422.3-76:581.142

МОЛЕКУЛЯРНОЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ С L-ФЕНИЛАЛАНИНОМ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Яковшин Л.А.¹, Гришковец В.И.², Сергиенко Ю.И.¹, Корж Е.Н.¹

¹*Севастопольский научно-производственный центр стандартизации, метрологии и сертификации, Севастополь, Украина*

²*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина*
E-mail: chemsevntu@rambler.ru

Впервые методом УФ-спектроскопии исследовано молекулярное комплексобразование *L*-фенилаланина с 3-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -*L*-арабинопиранозидом хедерагенина (α -хедерином) и его 28-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 4)-*O*- β -*D*-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -*D*-глюкопиранозидовым эфиром (хедерасапонином С) в водных растворах. Установлено, что гликозиды образуют комплексы с *L*-фенилаланином состава 1:1. Сделан вывод о влиянии строения гликозидов и *L*-фенилаланина на процесс комплексобразования. Проведено сравнительное изучение влияния гликозидов и их комплексов на всхожесть семян *Avena sativa* L.

Ключевые слова: тритерпеновые гликозиды, α -хедерин, хедерасопонин С, *L*-фенилаланин, молекулярный комплекс, УФ-спектроскопия, *Avena sativa* L., всхожесть семян.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время широко изучается молекулярное комплексобразование сапонинов с разнообразными биологически активными молекулами. Возросший интерес к данным супрамолекулярным продуктам обусловлен, прежде всего, возможностью создания новых лекарственных препаратов за счет снижения терапевтических доз, повышения биодоступности и расширения спектра биологической активности лекарственных веществ [1, 2].

В связи с этим были получены комплексы ароматических протеиногенных аминокислот с некоторыми стероидными и тритерпеновыми гликозидами. Комплексы *L*-тирозина (Tyr), *L*-триптофана (Trp) и *L*-фенилаланина (Phe) с сердечным гликозидом К-строфантин- β имеют практически одинаковые константы устойчивости. Однако наблюдаются сильные отличия в устойчивости комплексов этих аминокислот с другим гликозидом – дигоксином. Наиболее прочный комплекс дает Tyr, а наименее прочный – Trp. Также были синтезированы тройные комплексы, содержащие дополнительно катионы Ca^{2+} и Mg^{2+} [3].

Методом времяпролетной плазменно-десорбционной масс-спектрометрии с ионизацией осколками деления ^{252}Cf были охарактеризованы комплексы аминокислот со стероидными агликонами неотигогенином и гитогенином, а также их гликозидами [4, 5]. Установлено, что биозид и триозид неотигогенина дают устойчивые комплексы с Phe, однако слабо взаимодействуют с Tyr и не дают

комплексов с Trp. В отличие от них, петуниозид D образует комплекс со всеми ароматическими аминокислотами. Причем комплексы Trp и Tug имеют близкую устойчивость, а комплекс с Phe оказался наиболее прочным.

В качестве перспективных молекулярных носителей биомолекул и фармаконов нами предложены 3-О- α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)-О- α -L-арабинопиранозид хедерагенина (α -хедерин, гликозид **1**, рис. 1) и его 28-О- α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 4)-О- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 6)-О- β -D-глюкопиранозильный эфир (хедерасопонин С, гликозид **2**, рис. 1) [6, 7]. Гликозиды **1** и **2** входят в состав противокашлевых лекарственных препаратов на основе экстрактов листьев плюща обыкновенного *Hedera helix* L. [8-10].

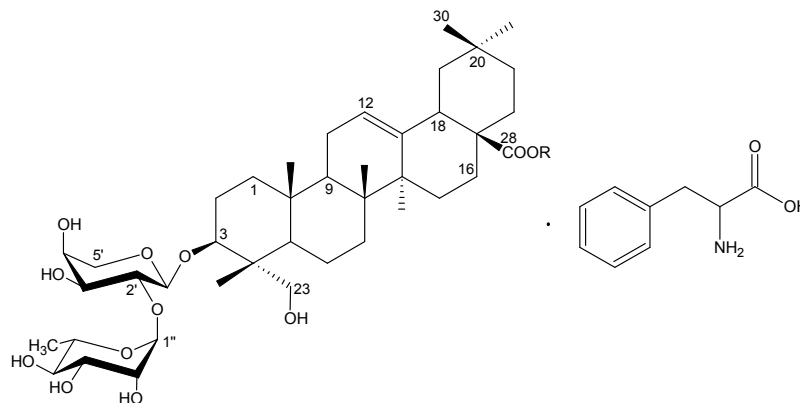


Рис. 1. Строение компонентов молекулярных комплексов (гликозид **1**: R=H; гликозид **2**: R=←- β Glc p -(6←1)- β Glc p -(4←1)- α Rhap).

Масс-спектрометрически с ионизацией электрораспылением рассмотрено комплексообразование Tug, Trp и Phe с гликозидами **1** и **2** [11]. Недавно мы сообщали о молекулярных комплексах Trp с гликозидами **1** и **2** в водных растворах, для которых методом УФ-спектроскопии был определен их состав [12]. УФ-спектроскопическое исследование комплексообразования Phe с гликозидами **1** и **2** в водном растворе ранее не проводилось.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Гликозиды **1** и **2** выделяли из листьев плющей *Hedera taurica* Cart. и *Hedera canariensis* Willd. и подтверждали их строение по методикам, приведенным в работах [13, 14]. Комплексы получали путем смешивания водных растворов Phe и гликозидов **1** и **2**. Полученные смеси выдерживали при комнатной температуре (20-22 °C) в течение 40 мин при постоянном перемешивании.

УФ-спектры получены при комнатной температуре (20-22 °C) на спектрофотометре Unico UV-Vis 4802 (США) в кварцевых кюветах ($l = 1$ см). Для составления изомолярной серии использовали 10^{-4} М растворы гликозидов и Phe. УФ-спектры приведены на Рис. 2 и 3, изомолярные кривые – на Рис. 4.

Влияние на всхожесть проверяли в лабораторных условиях на семенах *Avena sativa* L. (семейство Poaceae) при комнатной температуре (23-25 °С). Для биоиспытаний смеси водных растворов Phe и гликозидов 1 и 2 предварительно перемешивали 40-60 мин при комнатной температуре. Концентрации индивидуальных гликозидов и Phe, а также веществ в смесях, составляли по 10⁻⁴ М. К семенам в количестве 25 штук добавляли 5 мл исследуемого раствора и выдерживали их в нем 24 ч. Растворы сливали, семена промывали дистиллированной водой и помещали в чашки Петри на фильтровальную бумагу, смоченную дистиллированной водой. Всхожесть семян определяли через 24, 48 и 72 ч (табл. 1). Доверительный интервал вычисляли со степенью надежности α=0.95.

Таблица 1

**Проращение семян *Avena sativa* в лабораторных условиях
(концентрации индивидуальных веществ и веществ в смесях по 10⁻⁴ М)**

Параметр	Соединение					
	H ₂ O (контроль)	1	2	Phe	Смесь 1-Phe	Смесь 2-Phe
Через 24 ч:						
Всхожесть, %	0	0	0	0	0	0
Длина ростка, мм	–	–	–	–	–	–
Количество с корнем, %	92	92	84	100	96	96
Длина корня, мм	2.6±0.6	3.0±1.4	3.3±0.7	2.7±1.2	3.5±1.2	2.5±1.1
Через 48 ч:						
Всхожесть, %	56	28	40	24	72	88
Длина ростка, мм	1.0±0.6	0.6±0.9	0.5±1.3	1.4±1.2	1.2±1.2	1.6±1.1
Количество с корнем, %	94	100	88	100	100	96
Длина корня, мм	4.6±0.5	3.3±0.8	3.5±1.2	4.6±1.2	4.3±1.2	7.3±0.5
Через 72 ч:						
Всхожесть, %	92	60	68	80	76	88
Длина ростка, мм	4.2±0.6	3.5±1.3	3.7±0.6	2.5±0.8	6.0±0.6	5.8±1.2
Количество с корнем, %	96	100	96	100	100	96
Длина корня, мм	7.1±0.6	5.5±1.1	6.4±0.8	5.3±1.2	9.0±0.7	9.7±1.1

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наличие межмолекулярных взаимодействий между Phe и гликозидами 1 и 2 установлено методом УФ-спектроскопии. При увеличении концентрации гликозидов 1 и 2 и постоянной концентрации аминокислоты (10⁻³ М) наблюдается повышение оптической плотности растворов – гиперхромный эффект (рис. 2 и 3). При анализе спектральных данных установлено, что максимум поглощения Phe, составляющий 257 нм (10⁻³ М раствор), при увеличении концентрации гликозидов 1 и 2 практически не изменяется.

Состав комплексов определен методом изомолярных серий [15]. Для комплекса гликозида **1** с Phe получено молярное отношение 1.06 (рис. 4), что соответствует комплексу состава 1:1 (рис. 1). Для комплекса гликозида **2** и Phe получено молярное отношение 0.99 (рис. 4). Таким образом, состав комплекса также равен 1:1 (рис. 1). Образование комплексов аналогичного состава между Phe и гликозидами **1** и **2** было недавно подтверждено масс-спектрометрически с ионизацией электрораспылением [11]. Молярное соотношение компонентов в ранее полученных комплексах гликозидов **1** и **2** с Trp в водных растворах также составило 1:1 [12].

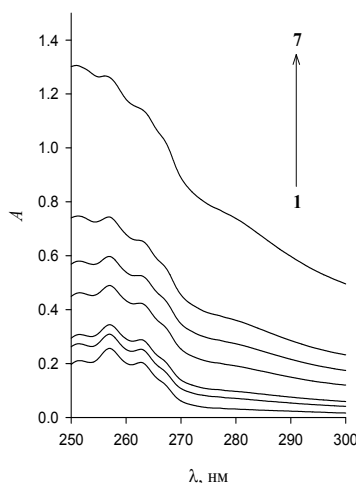


Рис. 2. УФ-спектры растворов Phe (10^{-3} М = const) при различных концентрациях гликозида **1**: 0 М (кривая 1), $0.50 \cdot 10^{-4}$ М (2), 10^{-4} М (3), $0.25 \cdot 10^{-3}$ М (4), $0.50 \cdot 10^{-3}$ М (5), $0.75 \cdot 10^{-3}$ М (6) и 10^{-3} М (7).

Ранее сообщалось о связывании аминокислот с макроциклическими лигандами посредством группы NH_3^+ [16]. На основе ИК-спектроскопии нами было показано, что в межмолекулярном взаимодействии в основном участвуют карбоксильная группа агликона хедерагенина гликозида **1** и цвиттер-ион аминокислот [17, 18].

Следовательно, группа NH_3^+ цвиттер-ионной формы Phe образует водородную связь с группой CO карбоксила гликозида **1** типа $\text{NH}_3^+ \cdots \text{O}=\text{C}$. Гликозид **2** связывается с NH_3^+ аминокислоты посредством водородных связей с OH-группами моносахаридных остатков и ион-дипольных взаимодействий $\text{N}^+ \cdots \text{OH}$. Возможно, что связывание также происходит за счет гидрофобных взаимодействий бензольного кольца аминокислоты с неполярным агликоном гликозидов.

Тритерпеновые гликозиды являются факторами аллелопатического взаимодействия в фитоценозах, что связано с их токсическим действием, приводящим к подавлению роста и развития растений [19]. Для предварительной оценки токсичности комплексов **1** и **2** с Phe нами рассмотрено их действие на всхожесть семян *Avena sativa* (табл. 1).

Через 48 ч всхожесть семян, предварительно вымоченных в смесях гликозидов с Phe, оказалась существенно выше, чем у тех, которые были обработаны

растворами индивидуальных гликозидов и аминокислоты или находились в контрольной группе. Отмечен значительный рост корня после обработки смесью гликозида 2 и Phe.

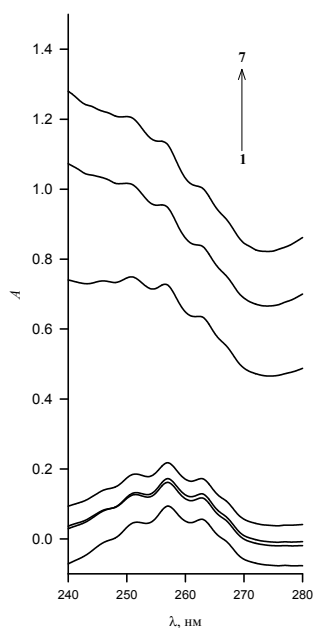


Рис. 3. УФ-спектры растворов Phe (10^{-3} M = const) при различных концентрациях гликозида 2: 0 M (кривая 1), $0.25 \cdot 10^{-4}$ M (2), $0.50 \cdot 10^{-4}$ M (3), 10^{-4} M (4), $0.50 \cdot 10^{-3}$ M (5), $0.75 \cdot 10^{-3}$ M (6) и 10^{-3} M (7).

Спустя 72 ч после обработки семян смесями гликозид–Phe их всхожесть была больше, чем у тех, которые выдерживались в растворах гликозидов. Длины ростков и корней у семян, на которые действовали смесями гликозидов с Phe, также оказались максимальными.

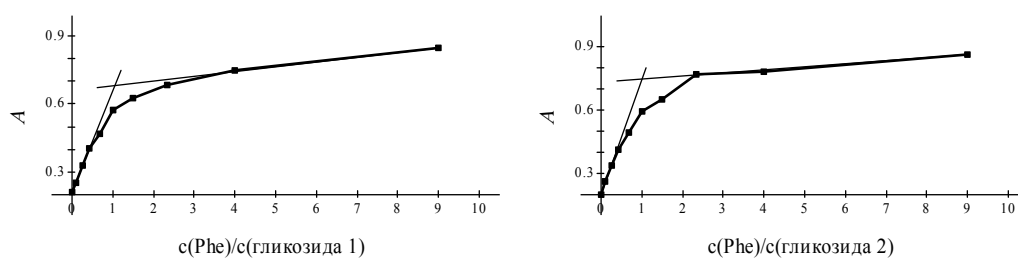


Рис. 4. Зависимость оптической плотности A от соотношения компонентов изомолярной серии при $\lambda=257$ нм: $c(\text{гликозидов})=10^{-4}$ M, $c(\text{Phe})=10^{-4}$ M.

Следовательно, взаимодействие между Phe и гликозидами 1 и 2 приводит к получению соединений, увеличивающих всхожесть семян и наиболее активно

влияющих на рост их корня и ростка. Таким образом, продукты комплексообразования являются менее токсичными, чем индивидуальные гликозиды.

ВЫВОДЫ

1. Впервые получены молекулярные комплексы тритерпеновых гликозидов с Phe в водных растворах.
2. Методом изоляричных серий установлено, что Phe образует комплексы с гликозидами **1** и **2** состава 1:1.
3. Показано, что межмолекулярное взаимодействие сопровождается гиперхромным эффектом.
4. Сделано предположение об участии группы NH_3^+ аминокислоты в связывании с гликозидами.
5. Комплексы являются менее токсичными, чем индивидуальные гликозиды. Они увеличивают всхожесть семян и наиболее активно влияют на рост их корня и ростка.

Список литературы

1. Толстикова Т.Г. На пути к низкодозным лекарствам / Т.Г. Толстикова, А.Г. Толстиков, Г.А. Толстиков // Вестник РАН. – 2007. – Т. 77, № 10. – С. 867–874.
2. Солодка: Биоразнообразие, химия, применение в медицине / [Толстиков Г.А., Балтина Л.А., Гранкина В.П. и др.]. – Новосибирск: Академическое изд-во «Гео», 2007. – 311 с.
3. Комплексообразование сердечных гликозидов с аминокислотами и щелочноземельными металлами / Н.А. Горчакова, Т.Г. Самарская, В.А. Самарский [и др.] // Фармакол. и токсикол. – 1992. – № 27. – С. 106–109.
4. Взаємодія стероїдних глікозидів з амінокислотами: дослідження методом плазменно-десорбційної мас-спектрометрії / В.В. Пилипенко, С.О. Аксьонов, О.М. Калінкевич [та ін.] // Biopolym. cell. – 2000. – Т. 16, № 3. – С. 212–219.
5. ^{252}Cf Plasma desorption mass spectrometric study of interactions of steroid glycosides with amino acids / V.V. Pilipenko, L.F. Sukhodub, S.A. Aksyonov [et al.] // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2000. – Vol. 14. – P. 819–823.
6. Яковишин Л.О. Вплив тритерпенових глікозидів та їх комплексів на молюсків / Л.О. Яковишин, В.А. Єрґахова, К.А. Базюра // Ukr. Bioorg. Acta. – 2006. – Т. 4, № 2. – С. 22–26.
7. Молекулярний комплекс тритерпенового гликозида α -хедерина с силденафілом (виагрой) / Л.А. Яковишин, М.А. Рубинсон, А.Л. Кузнецова [и др.] // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2006. – Т. 19 (58), № 1. – С. 179–182.
8. Яковишин Л.А. Комплекс тритерпеновых гликозидов лекарственного препарата Hedelix® / Л.А. Яковишин, В.И. Гришкoveц // Химия природ. соедин. – 2003. – № 5. – С. 417–418.
9. Исследование тритерпеновых гликозидов лекарственного препарата проспан® / Л.А. Яковишин, М.А. Вожжова, А.Л. Кузнецова [и др.] // Журн. орг. и фарм. химии. – 2005. – Т. 3, вып. 1. – С. 57–59.
10. Зуук Б.М. Плющ вьющийся *Hedera helix L.* / Б.М. Зуук, Р.В. Куцик, Л.И. Зуук // Провизор. – 2003. – № 12. – С. 13–14.
11. Материалы X Междунар. семинара по магнитному резонансу (спектроскопия, томография и экология), 2–7 мар. 2010 г., Ростов-на-Дону. – Ростов-на-Дону: Рос. фонд фонд. исслед. – 2010. – С. 30.
12. Молекулярное комплексообразование тритерпеновых гликозидов с триптофаном в водных растворах / Л.А. Яковишин, В.И. Гришкoveц, Н.В. Епишина [и др.] // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2010. – Т. 23 (62), № 2. – С. 270–275.

13. Тритерпеновые гликозиды *Hedera taurica* L. Строение таурозида E из листьев *Hedera taurica* / А.С. Шашков, В.И. Гришкoveц, А.А. Лолойко [и др.] // Химия природ. соедин. – 1987. – № 3. – С. 363–366.
14. Тритерпеновые гликозиды *Hedera canariensis* L. Строение гликозидов L-A, L-B1, L-B2, L-C, L-D, L-E1, L-G1, L-G2, L-G3, L-G4, L-H1, L-H2 и L-I1 из листьев *Hedera canariensis* / В.И. Гришкoveц, Д.Ю. Сидоров, Л.А. Яковишин [и др.] // Химия природ. соедин. – 1996. – № 3. – С. 377–383.
15. Булатов М.И. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа / М.И. Булатов, И.П. Калинин. – [5-е изд.]. – Л.: Химия, 1986. – 432 с.
16. Куликов О.В. Термодинамика образования молекулярных комплексов в водных растворах аминокислот, пептидов, нуклеиновых оснований и макроциклических соединений: автореф. дис. на соиск. уч. степени докт. хим. наук: спец. 02.00.04 «Физическая химия» / О.В. Куликов. – Иваново, 2005. – 36 с.
17. Комплексообразование тритерпенового гликозида α -хедерина с гидрофильными протеиногенными аминокислотами / Л.А. Яковишин, В.И. Гришкoveц, М.А. Рубинсон [и др.] // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2009. – Т. 22 (61), № 1. – С. 208–213.
18. Яковишин Л.О. Молекулярні комплекси тритерпенового глікозиду α -хедерину з аліфатичними протеїногенними амінокислотами / Л.О. Яковішин, М.А. Рубінсон // Ukr. Bioorg. Acta. – 2009. – Т. 7, № 1. – С. 32–35.
19. Анисимов М.М. О биологической роли тритерпеновых гликозидов / М.М. Анисимов, В.Я. Чирва // Успехи современной биологии. – 1980. – Т. 6, № 3. – С. 351–364.

Яковішин Л.О. Молекулярне комплексоутворення тритерпенових глікозидів з L-фенілаланіном у водних розчинах / Л.О. Якові шин, В.І. Гришкoveць, Ю.І. Сергієнко, Е.Н. Корж // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2010. – Т. 23 (62), № 3. – С. 255-261.

Уперше методом УФ-спектроскопії досліджено молекулярне комплексоутворення L-фенілаланіну з 3-O- α -L-рамнопіранозил-(1 \rightarrow 2)-O- α -L-арабінопіранозидом хедерагеніну (α -хедерином) та його 28-O- α -L-рамнопіранозил-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-глюкопіранозил-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-глюкопіранозидовим естером (хедерасaponіном С) у водних розчинах. Встановлено, що глікозиди утворюють комплекси з L-фенілаланіном складу 1:1. Зроблено висновок про вплив будови глікозидів та L-фенілаланіну на процес комплексоутворення. Проведено порівняльне вивчення впливу глікозидів та їх комплексів на проростання насіння *Avena sativa* L.

Ключові слова: тритерпенові глікозиди, α -хедерин, хедерасaponін С, L-фенілаланін, молекулярний комплекс, УФ-спектроскопія, *Avena sativa* L., проростання насіння.

Yakovishin L.A. Molecular complexation of triterpene glycosides with L-phenylalanine in water solutions / L.A. Yakovishin, V.I. Grishkovets, U.I. Sergienko, E.N. Kordg // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2010. – Vol. 23 (62), No. 3. – P. 255-261.

Using a method UV-spectroscopy, the molecular complexation of L-phenylalanine with hederagenin 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O- α -L-arabinopyranoside (α -hederin) and its 28-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucopyranosyl ester (hederasaponin C) in water solutions was for the first time investigated. The glycosides form complexes with L-phenylalanine in the 1:1 molar proportion. The structures of glycosides and L-phenylalanine are concluded to have an impact on the complexation process. Comparative study of influence of glycosides and complexes on seeds germination *Avena sativa* L. has been made.

Keywords: triterpene glycosides, α -hederin, hederasaponin C, L-phenylalanine, molecular complex, UV-spectroscopy, *Avena sativa* L., seeds germination.

Поступила в редакцію 20.09.2010 г.