

УДК 547.918:547.859:543.42:581.142

## СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ С ЦИТРАТОМ СИЛДЕНАФИЛА: ОБРАЗОВАНИЕ В ВОДНО- СПИРТОВЫХ РАСТВОРАХ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Яковичин Л.А.<sup>1</sup>, Гришковец В.И.<sup>2</sup>, Белаш Д.Ю.<sup>1</sup>, Яровой И.Р.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Севастопольский национальный технический университет, Севастополь, Украина

<sup>2</sup>Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина

E-mail: chemsevntu@rambler.ru

Впервые методом УФ-спектроскопии исследовано молекулярное комплексообразование цитрата силденафила с 3-*O*- $\alpha$ -*L*-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\alpha$ -*L*-арабинопиранозидом хедерагенина ( $\alpha$ -хедерин) и его 28-*O*- $\alpha$ -*L*-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -*D*-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 6)-*O*- $\beta$ -*D*-глюкопиранозидовым эфиром (хедерасапонином С) в водно-спиртовых растворах. Установлено, что гликозиды образуют комплексы с цитратом силденафила состава 1:1. Проведено сравнительное изучение влияния гликозидов и их комплексов на всхожесть семян *Avena sativa* L.

**Ключевые слова.** тритерпеновые гликозиды,  $\alpha$ -хедерин, хедерасапонин С, цитрат силденафила, супрамолекулярный комплекс, УФ-спектроскопия, *Avena sativa* L., всхожесть семян.

### ВВЕДЕНИЕ

В последнее время значительно возрос интерес к получению молекулярных комплексов на основе растительных гликозидов, что объясняется возможностью создания на их основе новых низкодозных лекарственных препаратов. Молекулярное комплексообразование также используют для улучшения растворимости, повышения биодоступности и расширения спектра биологической активности различных веществ [1, 2].

В качестве перспективных комплексообразователей биологически активных молекул нами предложены тритерпеновые гликозиды плющей (рис. 1)  $\alpha$ -хедерин (3-*O*- $\alpha$ -*L*-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\alpha$ -*L*-арабинопиранозид хедерагенина, гликозид **1**) и 3-*O*- $\alpha$ -*L*-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\alpha$ -*L*-арабинопиранозил-28-*O*- $\alpha$ -*L*-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -*D*-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 6)-*O*- $\beta$ -*D*-глюкопиранозид хедерагенина (хедерасапонин С, гликозид **2**) [3]. Недавно мы сообщали об образовании супрамолекулярных структур гликозидов **1** и **2** с протеиногенными аминокислотами [4–7], некоторыми лекарственными веществами (парацетамолом [8], левомицетином [9], стрептоцидом [10], кофеином [11, 12]) и холестеринном [13].

Были получены комплексы гликозидов **1** и **2** с цитратом силденафила (SC, рис. 1) в водных растворах. Методом изолярических серий установлено, что их состав равен 1:1 [14]. Исследовано влияние комплексов гликозидов с SC на электрическую активность нейронов моллюска *Helix albescens* [15]. Препараты на

основе SC широко используются для лечения эректильной дисфункции (виагра, дженагра, эректил, интагра IC и др.) и артериальной легочной гипертензии (revatio) [16, 17].

В настоящей работе рассмотрено комплексообразование гликозидов **1** и **2** с SC в водно-спиртовых растворах, а также влияние водных растворов комплексов на всхожесть семян овса посевного *Avena sativa* L.

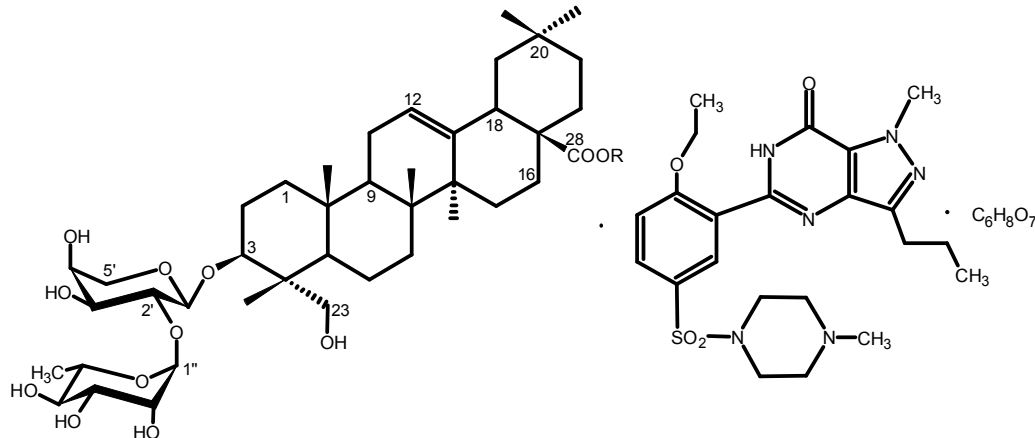


Рис. 1. Строение компонентов супрамолекулярных комплексов тритерпеновых гликозидов и цитрата силденафила (гликозид **1**: R=H; гликозид **2**: R=←βGlc<sub>p</sub>-(6←1)-βGlc<sub>p</sub>-(4←1)-αRha<sub>p</sub>).

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Гликозиды **1** и **2** выделяли из листьев плющей *Hedera taurica* Carr. и *Hedera canariensis* Willd. (Araliaceae Juss.) и подтверждали их строение по методикам, приведенным в работах [18, 19]. Использовали образец цитрата силденафила фирмы Shilpa Medicare Limited (Индия) (партия NPV0080309).

УФ-спектры получены при комнатной температуре (20–22 °С) на спектрофотометре Unico UV-Vis 4802 (США) в кварцевых кюветах (*l*=1 см). Для составления изомолярной серии использовали 10<sup>-4</sup> М водно-спиртовые растворы гликозидов и SC. Растворитель – смесь фосфатного буфера (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>–NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7.0) с 96 % С<sub>2</sub>Н<sub>5</sub>ОН в соотношении 4:1. Полученные смеси выдерживали при комнатной температуре (20–22 °С) в течение 40 мин при постоянном перемешивании. Изомолярные кривые приведены на Рис. 2 и 3.

Влияние на всхожесть проверяли в лабораторных условиях на семенах *Avena sativa* L. (Poaceae) при температуре 27–28 °С. Для биоиспытаний смеси водных растворов SC и гликозидов **1** и **2** предварительно перемешивали 40–60 мин при такой же температуре. Концентрации индивидуальных гликозидов и SC, а также веществ в смесях, составляли по 0.5·10<sup>-4</sup> М. К семенам (по 25 штук) добавляли 5 мл исследуемого раствора и выдерживали их в нем на протяжении 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  $\alpha=0.95$ .

**Таблица 1**  
**Проращивание семян *Avena sativa* в лабораторных условиях**  
**(концентрации индивидуальных веществ и веществ в смесях по  $0.5 \cdot 10^{-4}$  М)**

Параметр	Соединение					
	H <sub>2</sub> O (контроль)	1	2	SC	Комплекс 1-SC	Комплекс 2-SC
<b>Через 24 ч:</b>						
Всхожесть, %	52	8	24	56	64	80
Длина ростка, мм	0.5±0.2	0.1±0.1	0.4±0.3	0.6±0.2	0.9±0.4	1.4±0.7
Количество с корнем, %	80	56	64	72	80	88
Длина корня, мм	0.9±0.2	0.7±0.3	1.0±0.5	1.0±0.3	1.9±0.6	3.2±1.1
<b>Через 48 ч:</b>						
Всхожесть, %	76	52	64	84	76	80
Длина ростка, мм	3.9±1.4	0.5±0.2	1.6±0.8	2.2±0.9	3.1±1.2	4.4±1.8
Количество с корнем, %	88	80	76	92	84	88
Длина корня, мм	2.2±0.7	1.3±0.5	2.0±0.9	3.5±1.4	5.1±2.0	7.4±2.5
<b>Через 72 ч:</b>						
Всхожесть, %	92	68	86	88	76	92
Длина ростка, мм	7.9±1.8	1.6±0.8	3.8±1.7	5.9±2.1	9.7±3.4	10.7±3.6
Количество с корнем, %	92	80	84	92	84	92
Длина корня, мм	7.1±1.9	1.6±0.8	2.9±0.9	6.4±2.4	11.2±3.9	14.1±3.9

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Межмолекулярные взаимодействия исследованы методом УФ-спектроскопии. Состав комплексов определен методом изомольных серий [20]. На Рис. 2 показана изомольная кривая, полученная для смеси гликозида **1** и SC при использовании в качестве растворителя буферного раствора с добавкой этанола. При этом для компонентов получено молярное отношение  $\approx 1.0$ , что соответствует комплексу состава 1:1. С помощью изомольной кривой, составленной для смесей гликозида **2** и SC, также найдено молярное отношение  $\approx 1.0$  (рис. 3). Гликозид **2** и SC дают супрамолекулярный комплекс состава 1:1. Комплексы аналогичного состава были ранее получены для гликозидов **1** и **2** с SC в водных растворах [14]. Таким образом, состав комплексов, образующихся в водных и водно-спиртовых растворах оказался одинаковым. Изменение растворителя не повлияло на соотношение компонентов в комплексах.

Тритерпеновые гликозиды являются факторами аллелопатического взаимодействия в фитоценозах, т.к. благодаря их токсичности подавляется рост и

развитие растений [21]. В отличие от бисдесмозидных, монодесмозидные гликозиды обычно проявляют высокую токсичность [21, 22]. Имеются сведения о влиянии SC на развитие растений [23, 24]. Поэтому определенный интерес представляет исследование активности комплексов гликозидов и SC. Для оценки биологической активности комплексов **1** и **2** с SC нами рассмотрено их действие на всхожесть семян *Avena sativa* (табл. 1).

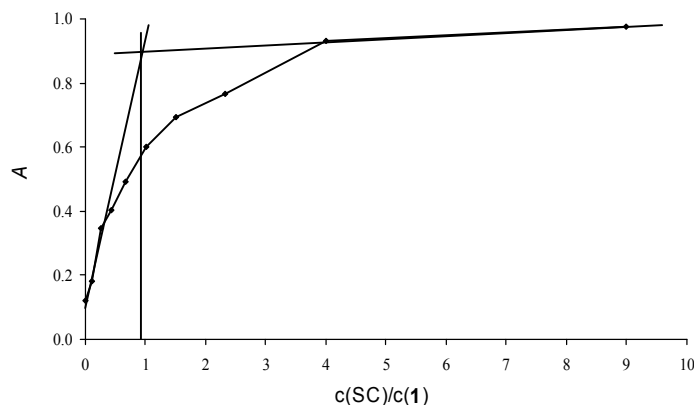


Рис. 2. Зависимость оптической плотности A от соотношения компонентов изомолярной серии при  $\lambda = 291$  нм:  $c(\text{SC}) = 10^{-4}$  М,  $c(1) = 10^{-4}$  М (растворитель – смесь фосфатного буфера ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--NaH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7.0) с 96 %  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  в соотношении 4:1).

Монодесмозидный гликозид **1** подавляет всхожесть семян (табл. 1). Бисдесмозидный гликозид **2** существенно не влиял на всхожесть. Через 72 ч всхожесть, количество семян с корнем и длина корня под воздействием SC оказались наибольшими по сравнению теми, на которые действовали растворы гликозидов. Ранее сообщалось, что SC увеличивал у *Nicotiana tabaccum* количество корней и их длину, а также количество листьев [23].

Возрастание всхожести семян после их вымачивания в растворе SC было замечено через 24 и 48 ч. Однако через 72 ч всхожесть семян в контрольной группе стала наибольшей (92 %), хотя доли семян с корнем после обработки SC и без таковой оказались одинаковыми (по 92 %).

Комплекс **2**–SC не подавлял всхожесть семян. Уже через 24 ч после обработки этим комплексом она составила 80 % (контроль – 52 %). По сравнению с гликозидом **1**, его комплекс незначительно подавлял всхожесть, т.е. оказался малотоксичным. Интересно отметить, что под действием комплекса **2**–SC длина корня стала наибольшей. Она превысила длину корня в контрольной группе почти в 2 раза. Сами компоненты комплекса по отдельности такого существенного действия не проявили. В отличие от гликозидов, комплекс **1**–SC также существенно способствовал росту корня.

Недавно показано, что оксид азота (II) NO стимулирует гуанилатциклазу, способствующую синтезу сGMP, который приводит к образованию придаточных корней [24]. SC ингибирует фосфодиэстеразу, вызывающую превращение сGMP в GMP [16, 24]. Этим можно объяснить активирующее действие SC на корневую систему растений.

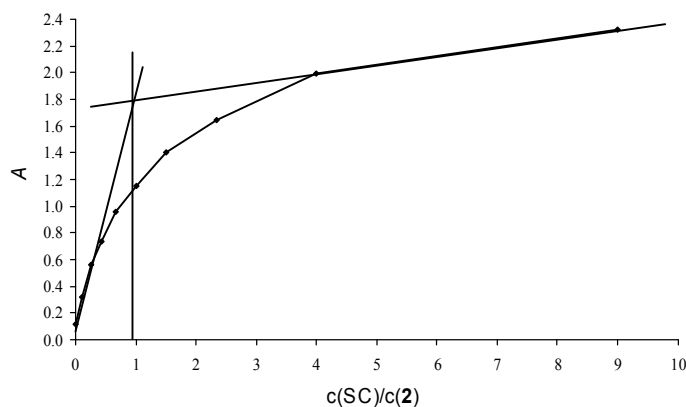


Рис. 3. Зависимость оптической плотности  $A$  от соотношения компонентов изомолярной серии при  $\lambda = 291$  нм:  $c(\text{SC}) = 10^{-4}$  М,  $c(\mathbf{2}) = 10^{-4}$  М (растворитель – смесь фосфатного буфера ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--NaH}_2\text{PO}_4$ ; рН 7.0) с 96 %  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  в соотношении 4:1).

Работа выполнена при поддержке Фонда социально-экономического развития г. Севастополя (2010 и 2011 гг.). Авторы выражают благодарность Кашуцкому С.Н. (ОАО «ИнтерХим», г. Одесса) за предоставленный образец цитрата силденафила.

### ВЫВОДЫ

1. Впервые в водно-спиртовых растворах получены молекулярные комплексы тритерпеновых гликозидов с SC и методом изомолярных серий установлен их состав.
2. Показано, что в водно-спиртовых и водных растворах между гликозидами и SC образуются комплексы одинакового состава, равного 1:1.
3. Наблюдали активирующее действие SC на всхожесть семян через 24 и 48 ч после их обработки. Комплекс  $\mathbf{2}$ –SC не подавлял всхожесть семян, а комплекс  $\mathbf{1}$ –SC оказался малотоксичным. После вымачивания семян в растворе комплекса  $\mathbf{2}$ –SC длина корня почти в 2 раза превысила длину корня в контрольной группе.

## Список литературы

1. Солодка: Биоразнообразие, химия, применение в медицине / [Г.А. Толстикова, Л.А. Балтина, В.П. Гранкина и др.]. – Новосибирск: Гео, 2007. – 311 с.
2. Толстикова Т.Г. На пути к низкодозным лекарствам / Т.Г. Толстикова, А.Г. Толстикова, Г.А. Толстикова // Вестник РАН. – 2007. – Т. 77, № 10. – С. 867-874.
3. Molecular complexation of ivy saponins with some drugs and biologically active substances / L.A. Yakovishin, V.I. Grishkovets, G. Schroeder, N.I. Borisenko // Functionalized molecules – synthesis, properties and application; ed. V.I. Rybachenko. – Donetsk: Schidnyj vydavnyczyj dim, 2010. – Chapter 4. – P. 85–103.
4. Молекулярное комплексообразование тритерпеновых гликозидов с триптофаном в водных растворах / Л.А. Яковишин, В.И. Гришконец, 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.
5. Молекулярное комплексообразование тритерпеновых гликозидов с L-фенилаланином в водных растворах / Л.А. Яковишин, В.И. Гришконец, Ю.И. Сергиенко [и др.] // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2010. – Т. 23 (62), № 3. – С. 255–261.
6. Молекулярное комплексообразование тритерпеновых гликозидов с L-тирозином в водных растворах / Л.А. Яковишин, В.И. Гришконец, Ю.И. Сергиенко [и др.] // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2011. – Т. 24 (63), № 1. – С. 232–238.
7. Электроспрей-ионизационная масс-спектрометрия смесей тритерпеновых гликозидов с L-фенилаланином / А.В. Лекарь, Е.В. Ветрова, Н.И. Борисенко [и др.] // Журн. прикл. спектр. – 2011. – Т. 78, № 4. – С. 535–540.
8. Электроспрей-ионизационная масс-спектрометрия смесей тритерпеновых гликозидов с парацетамолом / А.В. Лекарь, Е.В. Ветрова, Н.И. Борисенко [и др.] // Журн. прикл. спектр. – 2010. – Т. 77, № 5. – С. 668–672.
9. Комплексообразование антибиотика левомецитина (хлорамфеникола) с  $\alpha$ -хедерином и хедерасапонином С в условиях ионизации электрораспылением / А.В. Лекарь, Л.А. Яковишин, С.Н. Борисенко [и др.] // Масс-спектрометрия. – 2011. – Т. 8, № 2. – С. 111–114.
10. 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. 29.
11. Яковишин Л.О. Молекулярне комплексоутворення тритерпенового глікозиду  $\alpha$ -хедерину з кофеїном у водному розчині / Л.О.Яковишин // Укр. Bioorg. Acta. – 2010. – Т. 8, № 1. – С. 42–46.
12. Яковишин Л.А. Молекулярное комплексообразование тритерпенового гликозида хедерасапониона С и кофеина в водном растворе / Л.А. Яковишин // Химия природ. соедин. – 2010. – № 5. – С. 629–631.
13. Самоассоциация и комплексообразование тритерпеновых гликозидов и холестерина / Л.А. Яковишин, Н.И. Борисенко, М.И. Руднев [и др.] // Химия природ. соедин. – 2010. – № 1. – С. 45–48.
14. Материалы VII Междунар. научно-технич. конф. «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ–2011», 26–30 апр. 2011 г., Севастополь. – Севастополь: Изд-во СевНТУ. – 2011. – С. 269–270.
15. Влияние виагры и ее комплексов с тритерпеновыми гликозидами на электрическую активность нейронов моллюска *Helix albescens* / О.И. Колотилова, Л.А. Яковишин, И.И. Коренюк [и др.] // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2010. – Т. 23 (62), № 2. – С. 96–103.
16. Drewes S.E. Recent findings on natural products with erectile-dysfunction activity / S.E. Drewes, J. George, F. Khan // Phytochemistry. – 2003. – Vol. 62. – P. 1019–1025.
17. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. The task force for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension of the european society of cardiology (ESC) and the european respiratory society (ERS), endorsed by the international society of heart and lung transplantation (ISHLT) / N. Galie, M.M. Hoeper, M. Humbert [et al.] // Eur. Heart J. – 2009. – Vol. 30. – P. 2493–2537.

18. Тритерпеновые гликозиды *Hedera taurica* I. Строение таурозида E из листьев *Hedera taurica* / А.С. Шашков, В.И. Гришковец, А.А. Лолойко [и др.] // Химия природ. соедин. – 1987. – № 3. – С. 363–366.
19. Тритерпеновые гликозиды *Hedera canariensis* I. 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. Гришковец, Д.Ю. Сидоров, Л.А. Яковішин [и др.] // Химия природ. соедин. – 1996. – № 3. – С. 377–383.
20. Булатов М.И. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа / М.И. Булатов, И.П. Калинин. – [5-е изд.]. – Л.: Химия, 1986. – 432 с.
21. Анисимов М.М. О биологической роли тритерпеновых гликозидов / М.М. Анисимов, В.Я. Чирва // Успехи современной биологии. – 1980. – Т. 6, № 3. – С. 351–364.
22. Podolak I. Saponins as cytotoxic agents: a review / I. Podolak, A. Galanty, D. Sobolewska // Phytochem. Rev. – 2010. – Vol. 9. – P. 425–474.
23. Vaidyanathan P. Impact of sildenafil citrate on tissue culture of tobacco (*Nicotiana tabacum*) / P. Vaidyanathan, K. Francis // Plant Cell Biotech. Mol. Biol. – 2009. – Vol. 10, No. 1/2. – P. 49–56.
24. Pagnussat G.C. Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process / G.C. Pagnussat, M.L. Lanteri, L. Lamattina // Plant Physiol. – 2003. – Vol. 132. – P. 1241–1248.

**Яковішин Л.О. Супрамолекулярні комплекси тритерпенових глікозидів з цитратом силденафілу: утворення у водно-спиртових розчинах та біологічна активність / Л.О. Яковішин, В.І. Гришковець, Д.Ю. Білаш, І.Р. Яровой // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2011. – Т. 24 (63), № 2. – С. 408–414.**

Уперше методом УФ-спектроскопії досліджено молекулярне комплексоутворення цитрату силденафілу з 3-*O*- $\alpha$ -*L*-рамнопіранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\alpha$ -*L*-арабінопіранозидом хедерагеніну ( $\alpha$ -хедерином) та його 28-*O*- $\alpha$ -*L*-рамнопіранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -*D*-глюкопіранозил-(1 $\rightarrow$ 6)-*O*- $\beta$ -*D*-глюкопіранозидом естером (хедерасAPONІНОМ С) у водно-спиртових розчинах. Встановлено, що глікозиди утворюють комплекси з цитратом силденафілу складу 1:1. Проведено порівняльне вивчення впливу глікозидів та їх комплексів на проростання насіння *Avena sativa* L.

**Ключові слова.** тритерпенові глікозиди,  $\alpha$ -хедерин, хедерасAPONІН С, цитрат силденафілу, супрамолекулярний комплекс, УФ-спектроскопія, *Avena sativa* L., проростання насіння.

**Yakovishin L.A. Supramolecular complexes of the triterpene glycosides with sildenafil citrate: formation in aqueous-alcoholic solutions and biological activity / L.A. Yakovishin, V.I. Grishkovets, D.Yu. Belash, I.R. Yarovoy // Scientific Notes of Taurida V. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2011. – Vol. 24 (63), No. 2. – P. 408–414.**

Using a method UV-spectroscopy, the molecular complexation of sildenafil citrate with hederagenin 3-*O*- $\alpha$ -*L*-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\alpha$ -*L*-arabinopyranoside ( $\alpha$ -hederin) and its 28-*O*- $\alpha$ -*L*-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl ester (hederasaponin C) in aqueous-alcoholic solutions was for the first time investigated. It was found that the glycosides form complexes with sildenafil citrate in the 1:1 molar ratio. Comparative study of influence of glycosides and complexes on seeds germination *Avena sativa* L. has been made.

**Keywords.** triterpene glycosides,  $\alpha$ -hederin, hederasaponin C, sildenafil citrate, supramolecular complex, UV-spectroscopy, *Avena sativa* L., seeds germination.

Поступила в редакцію 20.02.2011 г.