

УДК 547.918:547.466:543.422.3-76:661.167.7

МОЛЕКУЛЯРНОЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ С L-ТИРОЗИНОМ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Яковишин Л.А.¹, Гришковец В.И.², Сергиенко Ю.И.¹, Довгий И.И.³

¹Севастопольский национальный технический университет, Севастополь, Украина

²Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина

³Севастопольский национальный университет ядерной энергии и промышленности,
Севастополь, Украина

E-mail: chemsevntu@rambler.ru

Впервые методом УФ-спектроскопии исследовано молекулярное комплексообразование *L*-тирозина с 3-О- α -*L*-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)-О- α -*L*-арабинопиранозидом хедерагенина (α -хедерином) и его 28-О- α -*L*-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 4)-О- β -*D*-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 6)-О- β -*D*-глюкопиранозидовым эфиром (хедерасапонином С) в водных растворах. Установлено, что *L*-тирозин образует с α -хедерином комплекс состава 1:1, а с хедерасапонином С – состава 2:3. Сделан вывод о влиянии строения гликозидов и *L*-тирозина на процесс комплексообразования. Изучена ихтиотоксичность комплексов и их компонентов против *Poecilia sphenops*.

Ключевые слова. тритерпеновые гликозиды, α -хедерин, хедерасапонин С, *L*-тирозин, молекулярный комплекс, УФ-спектроскопия, *Poecilia sphenops*, ихтиотоксичность.

ВВЕДЕНИЕ

Все большее значение приобретают супрамолекулярные продукты на основе растительных сапонинов и ароматических протеиногенных аминокислот. В частности, получены комплексы *L*-тирозина (Туг) (рис. 1), заменимой аминокислоты, образующей почти все белки. Она является предшественником дофамина, норадреналина, адреналина и тироксина [1]. Туг входит в состав лекарственных средств для парентерального питания («Вамин» и др.) [2].

Синтезированы комплексы *L*-триптофана (Трп), *L*-фенилаланина (Phe) и Туг с гликозидами К-строфантин- β и дигоксином, а также тройные комплексы, содержащие дополнительно катионы Ca^{2+} и Mg^{2+} [3]. Комплексы К-строфантин- β имеют практически одинаковые константы устойчивости. Комплекс Туг с дигоксином резко выделяется по своей устойчивости среди комплексов других ароматических аминокислот.

Методом времяпролетной плазменно-десорбционной масс-спектрометрии с ионизацией осколками деления ^{252}Cf исследовано комплексообразование Туг со стероидными агликонами неотигогенином и гитогенином, а также их гликозидами [4, 5]. При этом показано, что биозид и триозид неотигогенина образуют непрочные комплексы с Туг, а петуниозид D умеренно взаимодействует с ним.

Запатентован ветеринарный препарат «Клатирам», представляющий комплекс глицирризиновой кислоты, являющейся основным тритерпеновым гликозидом солодок, с простагландином клопростенолом и Тут [6]. Его используют для регуляции репродуктивной функции животных.

Недавно мы сообщали об образовании супрамолекулярных структур 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-глюкопиранозилового эфира (хедераспонин С, гликозид **2**, рис. 1) с Туг [7] и Phe [8]. Комплексообразование исследовано методом УФ-спектроскопии. Масс-спектрометрически с ионизацией электрораспылением рассмотрено взаимодействие ароматических аминокислот с гликозидами **1** и **2** [9]. В настоящей статье описаны молекулярные комплексы гликозидов **1** и **2** с Тут. УФ-спектроскопическое исследование комплексообразования между ними в водном растворе ранее не проводилось.

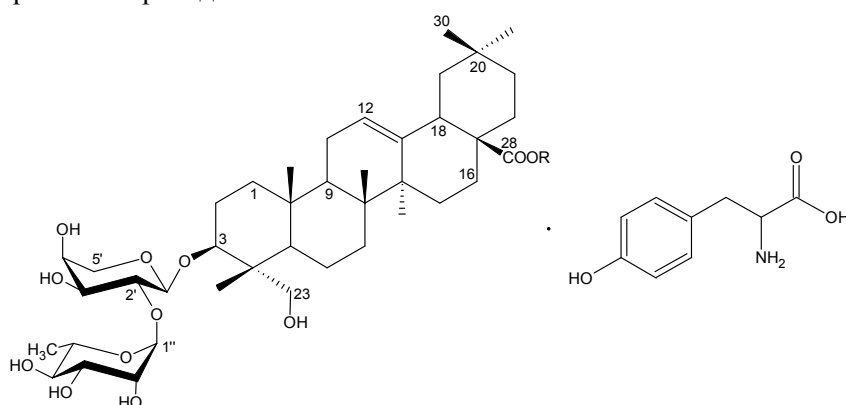


Рис. 1. Строение компонентов молекулярных комплексов гликозидов и Тут (гликозид **1**: R=H; гликозид **2**: R= \leftarrow β GlcP-(6 \leftarrow 1)- β GlcP-(4 \leftarrow 1)- α Rhap).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Гликозиды **1** и **2** выделяли из листьев плющей *Hedera taurica* Carst. и *Hedera canariensis* Willd. (Araliaceae Juss.) и подтверждали их строение по методикам, приведенным в работах [10, 11]. Комплексы получали путем смешивания водных растворов Тут 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 изомольярной серии использовали 10^{-4} М растворы гликозидов и Тут. УФ-спектры приведены на Рис. 2, изомольярные кривые – на Рис. 3 и 4.

Ихтиотоксичность проверяли на *Poecilia sphenops* (Poeciliidae). Использовали растворы гликозидов и Тут в дистиллированной воде. Для изучения действия каждой отдельной концентрации веществ было взято по 10 рыб. Рыб помещали в

растворы гликозидов, Туг и их комплексов и определяли время инкубации $t_{LD_{100}}$, в течение которого происходил 100% летальный исход (табл. 1). Доверительный интервал вычисляли со степенью надежности $\alpha=0.95$.

Таблица 1

Ихтиотоксичность Туг, гликозидов 1 и 2 и их комплексов против *Poecilia sphenops*

Соединение	c, M	Время экспозиции $t_{LD_{100}}$ до летального исхода, мин
Туг	$0.50 \cdot 10^{-3}$	На протяжении 120 мин не токсично
Гликозид 1	$0.50 \cdot 10^{-3}$	10.5 ± 1.1
Гликозид 2	$0.50 \cdot 10^{-3}$	На протяжении 120 мин не токсично
Комплекс гликозид 1–Туг	По $0.50 \cdot 10^{-3}$ Туг и гликозида 1	10.6 ± 2.1
Комплекс гликозид 2–Туг	$0.50 \cdot 10^{-3}$ Туг и $0.75 \cdot 10^{-3}$ гликозида 2	На протяжении 120 мин не токсично

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Межмолекулярные взаимодействия между Туг и гликозидами 1 и 2 исследованы методом УФ-спектроскопии. При увеличении концентрации гликозидов 1 и 2 и постоянной концентрации аминокислоты (10^{-4} М) наблюдается повышение оптической плотности растворов, т.е. гиперхромный эффект (см. рис. 2). При анализе спектральных данных установлено, что максимум поглощения Туг, составляющий 274 нм (10^{-4} М раствор), при увеличении концентрации гликозидов 1 и 2 возрастает до 281–282 нм, т.е. происходит слабый батохромный сдвиг.

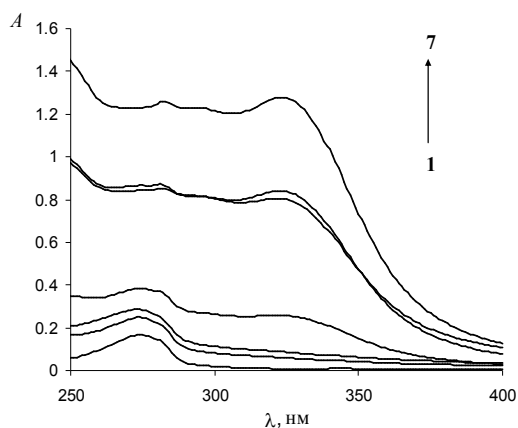


Рис. 2. УФ-спектры растворов Туг (10^{-4} М = const) при различных концентрациях гликозида 2: 0 М (1), $0.50 \cdot 10^{-4}$ М (2), 10^{-4} М (3), $0.25 \cdot 10^{-3}$ М (4), $0.50 \cdot 10^{-3}$ М (5), $0.75 \cdot 10^{-3}$ М (6) и 10^{-3} М (7).

Соотношение компонентов в комплексах определено методом изомолярных серий [12]. На изомолярной кривой, составленной для смесей гликозида **1** с Tyr, максимум находится при молярном отношении 1.00 (рис. 3), что соответствует комплексу состава 1:1. Образование комплекса аналогичного состава было недавно подтверждено масс-спектрометрически с ионизацией электрораспылением [9]. Для комплексов гликозида **1** с Trp и Phe, ранее полученных в водных растворах, молярное соотношение компонентов также составило 1:1 [7, 8].

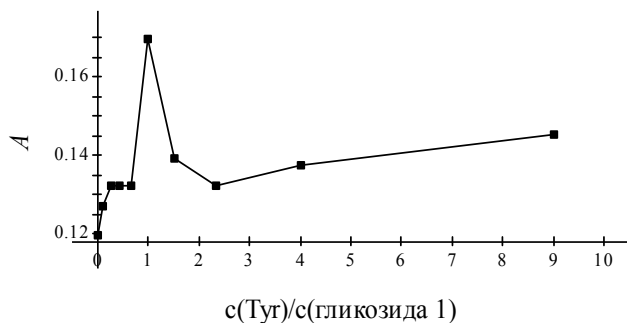


Рис. 3. Зависимость оптической плотности A от соотношения компонентов изомолярной серии при $\lambda=274$ нм: $c(\text{гликозида } \mathbf{1})=10^{-4}$ М, $c(\text{Tyr})=10^{-4}$ М.

Для комплекса гликозида **2** и Tyr получено молярное отношение 0.67 (рис. 4). Таким образом, комплекс образован двумя молекулами аминокислоты и тремя молекулами гликозида **2**. В масс-спектре смеси гликозида **2** и Tyr был найден пик протонированной молекулы $[3M^2+2M^{\text{Tyr}}+H]^+$ [9], в которой наблюдается аналогичное молярное соотношение компонентов. Состав полученных нами комплексов гликозида **2** с Trp и Phe был определен как 1:1 [7, 8].

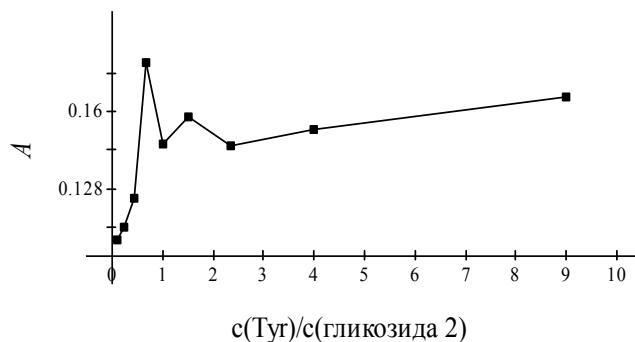


Рис. 4. Зависимость оптической плотности A от соотношения компонентов изомолярной серии при $\lambda=274$ нм: $c(\text{гликозида } \mathbf{2})=10^{-4}$ М, $c(\text{Tyr})=10^{-4}$ М.

С учетом литературных данных [7, 8, 13–15], а также строения гликозида **1** и Туг можно предположить, что комплексообразование между ними происходит за счет водородной связи при участии группы NH_3^+ цвиттер-ионной формы аминокислоты и карбоксильной группы гликозида: $\text{NH}_3^+ \cdots \text{O}=\text{C}$. В комплексе гликозида **2** внутренняя полость образуется из трех его молекул, очевидно ассоциированных за счет водородных связей с участием углеводных гидроксильных групп. В полости располагается димер Туг. Самоассоциация Туг возможна посредством гидрофобных взаимодействий ароматических колец. Гидроксильные группы моносахаридных остатков гликозида **2** могут связываться с NH_3^+ аминокислоты водородными связями и за счет ион-дипольных взаимодействий $\text{N}^+ \cdots \text{OH}$. В молекуле Туг имеется фенольный гидроксил, который может участвовать в образовании дополнительных водородных связей и тем самым способствовать стабилизации комплексов. Не исключены гидрофобные взаимодействия ароматического кольца аминокислоты с неполярным агликоном гликозидов.

Известно, что бисдесмозидные тритерпеновые гликозиды обычно проявляют низкую токсичность, что объясняется отсутствием свободной карбоксильной группы в их агликонах. Наоборот, гликозиды со свободной (негликозилированной) карбоксильной группой высокоактивны [16, 17]. Для предварительной оценки биологической активности комплексов **1** и **2** с Туг нами рассмотрено их действие на рыб моллинезия черная *Poecilia sphenops* (табл. 1).

Бисдесмозидный гликозид **2** и Туг не проявили токсичности против *Poecilia sphenops* (табл. 1). Монодесмозид **1** оказался ихтиотоксичным. Полученные нами результаты соответствуют общепринятым выводам о соотношении активности моно- и бисдесмозидных сапонинов [16, 17]. Активность комплексов **1**–Туг и **2**–Туг практически не отличается от активности индивидуальных гликозидов.

ВЫВОДЫ

1. Впервые получены молекулярные комплексы моно- и бисдесмозидных тритерпеновых гликозидов с Туг в водных растворах.
2. Методом изомолярных серий установлено, что Туг образует с гликозидом **1** комплекс состава 1:1, а с гликозидом **2** – состава 2:3.
3. Показано, что межмолекулярное взаимодействие сопровождается гиперхромным эффектом и батохромным сдвигом.
4. Активность комплексов Туг с гликозидами **1** и **2** практически не отличается от активности индивидуальных гликозидов.

Список литературы

1. Химическая энциклопедия: в 5 т. / [гл. ред. Зефирова Н.С.]. – М.: Большая Рос. энцикл., 1988. – Т. 4. – 1995. – 639 с.
2. Машковский М.Д. Лекарственные средства: в 2 т. / Машковский М.Д. – [13-е изд.]. – Харьков: Торсинг, 1997. – Т. 2. – 1997. – 592 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. ²⁵²Cf 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. Солодка: Биоразнообразие, химия, применение в медицине / [Г.А. Толстикова, Л.А. Балтина, В.П. Гранкина и др.]. – Новосибирск: Гео, 2007. – 311 с.
7. 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.
8. Молекулярное комплексообразование тритерпеновых гликозидов с L-фенилаланином в водных растворах / Л.А. Яковишин, В.И. Гришкoveц, 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.
9. Матеріали X Міжнарод. семінара по магнітному резонансу (спектроскопія, томографія і екологія), 2–7 мар. 2010 г., Ростов-на-Дону. – Ростов-на-Дону: Рос. фонд фонд. дослід. – 2010. – С. 30.
10. 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.
11. 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.
12. Булатов М.И. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа / М.И. Булатов, И.П. Калинин. – [5-е изд.]. – Л.: Химия, 1986. – 432 с.
13. 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.
14. 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.
15. Яковішин 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.
16. Анисимов М.М. О биологической роли тритерпеновых гликозидов / М.М. Анисимов, В.Я. Чирва // Успехи современной биологии. – 1980. – Т. 6, № 3. – С. 351–364.
17. Podolak I. Saponins as cytotoxic agents: a review / I. Podolak, A. Galanty, D. Sobolewska // Phytochem. Rev. – 2010. – Vol. 9. – P. 425–474.

Яковішин Л.О. Молекулярне комплексоутворення тритерпенових глікозидів з L-тирозином у водних розчинах / Л.О. Яковішин, В.І. Гришковець, Ю.І. Сергієнко, І.І. Довгий // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2011. – Т. 24 (63), № 1. – С. 232-238.

Уперше методом УФ-спектроскопії досліджено молекулярне комплексоутворення *L*-тирози́ну 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 *L*-тирозин утворює з α -хедерином комплекс складу 1:1, а хедерасaponін С – складу 2:3. Зроблено висновок про вплив будови глікозидів та *L*-тирози́ну на процес комплексоутворення. Вивчено іхтіотоксичність комплексів та їх компонентів проти *Poecilia sphenops*.

Ключові слова. тритерпенові глікозиди, α -хедерин, хедерасaponін С, *L*-тирозин, молекулярний комплекс, УФ-спектроскопія, *Poecilia sphenops*, іхтіотоксичність.

Yakovishin L.A. Molecular complexation of triterpene glycosides with L-tyrosine in aqueous solutions / L.A. Yakovishin, V.I. Grishkovets, U.I. Sergienko, I.I. Dovguy // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2011. – Vol. 24 (63), No. 1. – P. 232-238.

Using a method UV-spectroscopy, the molecular complexation of *L*-tyrosine 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 aqueous solutions was for the first time investigated. It was found that *L*-tyrosine form complex with α -hederin in the 1:1 molar ratio, but with hederasaponin C – in the 2:3 molar ratio. The structures of glycosides and *L*-tyrosine are concluded to have an impact on the complexation process. The ichthyotoxicity of the complexes and its components against *Poecilia sphenops* was studied.

Keywords. triterpene glycosides, α -hederin, hederasaponin C, *L*-tyrosine, molecular complex, UV-spectroscopy, *Poecilia sphenops*, ichthyotoxicity.

Поступила в редакцію 20.02.2011 г.