

© Коллектив авторов, 2002

*Р. С. Насибуллин, Т. И. Никитина, Ю. Г. Афанасьева, Т. Р. Насибуллин,  
Л. В. Спирихин*

## **КОМПЛЕКС 3,5,7,3',4'-ПЕНТАОКСИФЛАВОНОЛА С ФОСФАТИДИЛХОЛИНОМ**

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа;  
ИОХ РАН Башкортостан, Уфа

Флавоноиды — это многочисленная группа растительных фенольных соединений, в основе структуры которых лежит скелет, состоящий из двух бензольных колец, соединенных между собой трехуглеродной цепочкой. Значительное количество флавоноидов можно рассматривать как производные 2-фенилхромана или 2-фенилхромона. Они широко распространены в растительных организмах, являются неотъемлемой частью высших растений и участвуют в важных процессах их метаболизма [1, 2].

В настоящее время описано около 4000 природных флавоноидных соединений различной структуры [1, 3], для которых выявлено более 40 видов биологической активности. Большинство из них обладает высокой Р-витаминной активностью, способностью уменьшать хрупкость и проницаемость стенок капилляров [4]. Установлено также, что флавоноиды обладают противовоспалительными [5], гепатопротекторными [6], антиоксидантными [7], антиаллергическими [8], противовирусными [9] и многими другими свойствами.

Широкий спектр биологического действия флавоноидов дает возможность предположить, что фармакологическая активность указанной группы соединений обусловлена взаимодействием физического характера [10, 11]. Она проявляется при значительных изменениях в структуре заместителей, в частности в том случае, когда они создают пространственные затруднения при сближении молекул на необходимое для образования водородной связи расстояние с объектом воздействия. Эта особенность взаимодействия свидетельствует о том, что для данной группы соединений характерен механизм взаимодействия, слабо зависящий от структуры и положения заместителей. Указанный механизм позволяет предполагать, что флавоноидные соединения могут препятствовать действию различных веществ, в том числе и аллергенов. Анализ литературных данных и результатов квантовохимических расчетов показывает, что молекулы, имеющие сопряженные системы  $\pi$ -электронов, образуют многочисленные комплексы с клеточными фосфолипидами [10, 11].

Молекула 3,5,7,3',4'-пентаоксифлавонола (кверцетина) (рис. 1) является типичным представителем группы флавоноидов, сохраняющим основную структуру при изменении некоторых заместителей. Хотя этот класс соединений давно вызывает пристальный интерес исследователей, в литературе практически отсутствуют сведения о молекулярном механизме биоло-

гической активности этих молекул. Особенно интересным является механизм их противоаллергического действия, препятствующий выделению из тучных клеток гистамина [12], дающего типичную патогенетическую картину аллергических реакций.

В настоящей работе, проведенной методами ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и квантовой химии, представлены результаты исследования взаимодействия 3,5,7,3',4'-пентаоксифлавонола с фосфатидилхолином (лецитином)-структурообразующей молекулой клеточной мембраны.

Для исследований использовали фосфатидилхолин, выделенный из куриных яиц по известному методу [13]. Очистка препарата проводилась колоночной хроматографией [14]; чистота препарата контролировалась методом тонкослойной хроматографии. Стандартный образец 3,5,7,3',4'-пентаоксифлавонола был получен из института органической химии (Иркутск). Растворы готовили с концентрацией фосфатидилхолина — 0,005 М и различными концентрациями кверцетина.

Исследования велись при относительно малых концентрациях обоих реагентов. При использовании больших концентраций фосфатидилхолина сигналы ЯМР уширяются вследствие мицеллообразования, и точность измерения химического сдвига (ХС) уменьшается. Одновременно возникает препятствие для доступа кверцетина к точкам связывания, оказывающимся внутри мицелл. При этом плато кривой титрования кверцетина фосфатидилхолином не достигается. Очень малая концентрация приводит к тому, что время накопления спектра делается несоразмерно большим. Необходимость использования низкой концентрации кверцетина обуславливается также его способностью формировать цепочечные структуры посредством водородных связей.

Значение  $pD$  среды поддерживалось равным 7,1. Величина  $pD$  контролировалась прибором ОР-165/3 (МОМ, Венгрия) с точностью измерения 0,01. Как показано в работе [15], зависимость ХС в области  $pD = 7,0$  на спектре ЯМР  $^{13}C$  является наиболее слабой. Молекула кверцетина локализуется на нескольких точках лецитина, поэтому эксперименты проводились в условиях, когда концентрация кверцетина превышала концентрацию лецитина. Повышение концентрации лецитина по сравнению с кверцетином не влияло на изменение ХС.

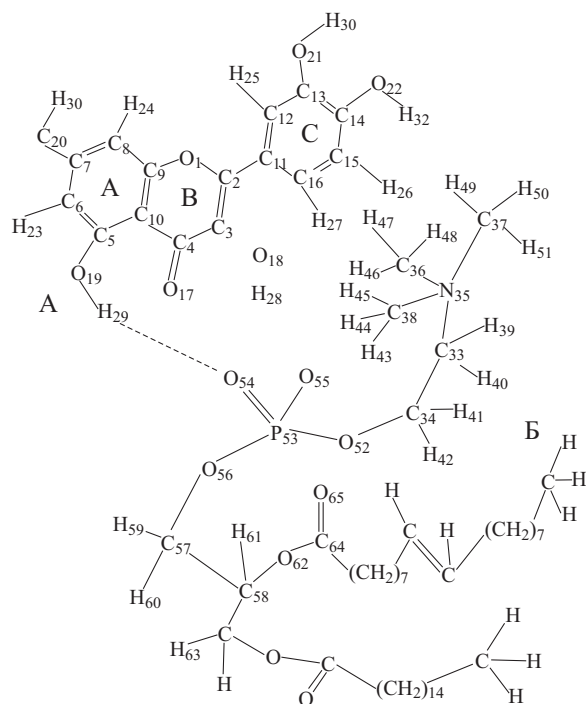


Рис. 1. Строение комплекса: А — молекула 3,5,7,3',4'-пентаоксифлавонола, Б — молекула фосфатидилхолина.

Спектры ЯМР  $^{13}\text{C}$  кверцетина и фосфатидилхолина и их смеси сняты при температуре 30 °С на спектрометре AM-300 ("Bruker" ФРГ) с рабочей частотой на ядрах  $^{13}\text{C}$  75 МГц. Температура образца, равная 30 °С, поддерживалась с точностью 0,2 °С. Спектры  $^{13}\text{C}$  записаны с использованием стандартных методик, за-

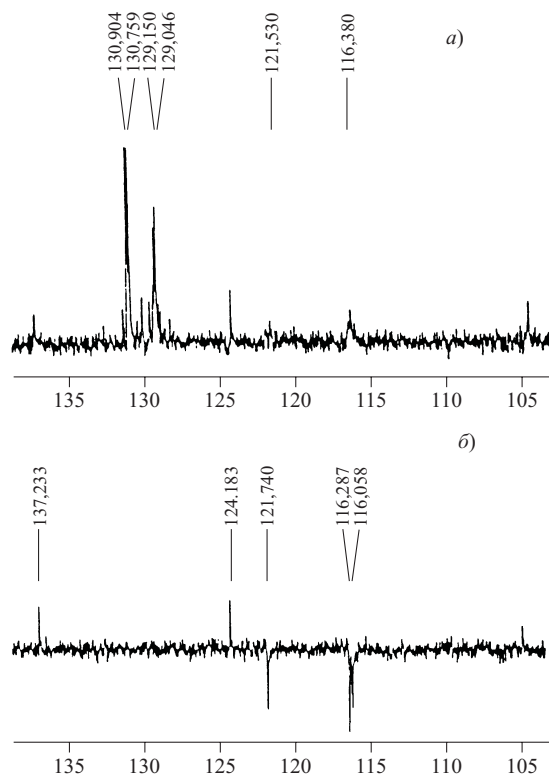


Рис. 2. Фрагмент спектра ЯМР  $^{13}\text{C}$ : а — раствор 0,01 М кверцетина и 0,005 М фосфатидилхолина в  $\text{CD}_3\text{OD}$ . б — 0,01 М раствор кверцетина.

Таблица 1  
Электронное строение и заряды в а.е. 3,5,7,3',4'-пентаоксифлавонола, фосфатидилхолина и их комплекса

N атома	Величина	Кверцетин		N атома	Величина	Лецитин	
		свободный	связанный			свободный	связанный
C <sub>15</sub>	S	1,206	1,207	N <sub>35</sub>	S	1,548	1,545
	P <sub>x</sub>	0,907	0,906		P <sub>x</sub>	1,184	1,210
	P <sub>y</sub>	0,928	0,981		P <sub>y</sub>	1,226	1,184
	P <sub>z</sub>	1,079	1,027		P <sub>z</sub>	1,188	1,191
	q	-0,121	-0,121		q	-0,145	-0,131
C <sub>16</sub>	S	1,206	1,210	C <sub>34</sub>	S	1,205	1,207
	P <sub>x</sub>	0,925	0,929		P <sub>x</sub>	0,846	0,875
	P <sub>y</sub>	0,910	0,933		P <sub>y</sub>	0,832	0,813
	P <sub>z</sub>	0,963	0,944		P <sub>z</sub>	0,852	0,848
	q	-0,007	-0,018		q	0,265	0,257
H <sub>26</sub>	S	0,934	0,930	C <sub>36</sub>	S	1,247	1,246
	q	0,066	0,069		P <sub>x</sub>	0,936	0,919
H <sub>27</sub>	S	0,925	0,917		P <sub>y</sub>	0,927	0,784
	q	0,075	0,083		P <sub>z</sub>	0,774	0,946
					q	0,116	0,105
			H <sub>46</sub>	S	0,941	0,917	
				q	0,059	0,083	
			H <sub>47</sub>	S	0,965	0,915	
				q	0,051	0,085	
			H <sub>48</sub>	S	0,949	0,982	
				q	0,051	0,018	

программированных в спектрометре Брюкер серии AM-300, с полным подавлением по протонам в режиме CPD. Длительность импульса составляла 45°, задержка между импульсами 1,5 с. Число накоплений составило 20000. При таком числе накоплений соотношение сигнал/шум было не меньше 60. Накопление проводилось на 64 – 128 к точек с шириной развертки 100 – 150 м.д. При развертке в 100 м.д. на 128 к точек, времени выборки 8,65 с получается цифровое разрешение 0,06 Гц, что дает возможность определить значение ХС с точностью до 0,001 м.д. На основании усреднения полученных по нескольким экспериментам данных можно сделать вывод о том, что точность измерения ХС не хуже 0,005 м.д. Методика снятия спектров в режиме модуляции константы С-Н взаимодействия является стандартной (JMODCH) и имеется в библиотеке спектрометра.

Предварительный поиск минимума энергии систем проводили методом молекулярной механики [16]. Определенные таким образом структуру и электронное строение комплекса уточняли полуэмпирическим методом MNDO [17]. Использовалась программа, реализующая метод MNDO из фонда программ по квантовой химии ИХК и ГРАН.

Для установления строения комплексов методами квантовой химии производились многократные расчеты с начальными конфигурациями расположения центров составляющего комплекса по сетке с последующей оптимизацией геометрии и поиском локального минимума энергии [18 – 20]. Многократно проведен-

Значение химических сдвигов 3,5,7,3',4'-пентаоксифлавонола

Элемент	ХС		Элемент	ХС	
	свободный	в комплексе		свободный	в комплексе
C <sub>4</sub>	177,357	177,264	C <sub>11</sub>	124,181	124,110
C <sub>7</sub>	165,589	165,640	C <sub>16</sub>	121,740	121,530
C <sub>9</sub>	162,513	162,480	C <sub>15</sub>	116,287	116,380
C <sub>5</sub>	158,254	158,191	C <sub>12</sub>	116,050	116,260
C <sub>14</sub>	148,795	148,848	C <sub>6</sub>	99,286	99,457
C <sub>13</sub>	146,246	146,304	C <sub>8</sub>	99,482	94,589
C <sub>3</sub>	137,257	137,231	—	—	—

ные подобным образом расчеты из различных исходных точек показали, что кверцетин с участием системы  $\pi$ -электронов образует три комплекса. Энергия образования комплекса с кольцами А, В, С имеет значение 34,1; 21,6; 34,9 кДж/моль, соответственно. Энергия образования комплекса, определяемая как разность достаточно больших величин, получается со значительной погрешностью и приведение соотношения значений энергии комплексообразования имеет качественный характер. Это соотношение энергий сохраняется при расчетах другими полуэмпирическими методами (MNDO) и подтверждается более значительными изменениями ХС углеродных атомов кольца С. Полученные данные свидетельствуют о том, что наиболее прочным является комплекс, образующийся с кольцом С. Табл. 1 содержит рассчитанные числа заполнения некоторых атомных состояний кверцетина и фосфатидилхолина, активно участвующих в образовании этого комплекса, и их изменения при взаимодействии друг с другом.

Расчитанные данные показывают, что комплекс формируется за счет кулоновского взаимодействия, вызванного переносом некоторой части заряда между составляющими комплекса. Величина переносимого с кверцетина заряда составляет около 0,1 е. Расстояние между центром кольца С и атомом азота равно 6,34 Å. Метод MNDO систематически завышает длины связей в подобных комплексах. Оценка этой ошибки описана в работе [21].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что для изучаемого комплекса характерно изменение распределения электронов в  $\pi$ -электронной системе пирокатехинового кольца и связанных с ним атомах водорода.

Спектральные линии ЯМР от ядер <sup>13</sup>С кольца С кверцетина при введении в раствор фосфатидилхолина смещаются навстречу друг другу (рис.2). При образовании комплекса через  $\pi$ -систему электронов ХС-углеродов кольца сближаются [22, 23]. В нашем случае при введении 0,005 М раствора фосфатидилхолина и 0,01 М раствора кверцетина ХС уменьшается у С (16) от 121,740 до 121,530, а у С (15) увеличивается с 116,287 до 116,380 м.д. При увеличении концентрации кверцетина до 0,015 М ХС у С (16) становится равным 121,459, а у С (15) 116,414 м.д. При дальнейшем возрастании концентрации кверцетина ХС заметно не меняется, по-видимому, из-за формирования цепочечных структур. На остальных атомах углерода, как видно из табл. 2, изменение ХС не наблюдается, что дает возможность предположить одновременное существование комплексов, образованных через водородные связи.

Идентификация спектров проводилась по данным работы [24].

Наиболее устойчивая конфигурация комплекса соответствует случаю, когда кверцетин одновременно взаимодействует с фосфатной группой. Расстояние между О(54) фосфатной группы лецитина и гидроксильной группой кольца А кверцетина-О(19)Н(29) составляет 5,38 Å.

Формирование комплекса вызывает изменение ХС и от углеродов фосфатидилхолина. Химический сдвиг от С(36), С(37), С(38) метильных групп, связанных с атомом азота, равный 53,203 смещается в слабое поле и становится равным 54,787 м.д., а от С(34), примыкающего к фосфатной группе, смещается на 2,052 м.д. в сторону сильного поля, что подтверждает взаимодействие фосфатной группы лецитина с кверцетином [21]. Изменение ХС качественно согласуется с полученными значениями изменения электронной плотности (табл. 1), если в расчетах одновременно учитывается взаимодействие системы  $\pi$ -электронов кверцетина с холиновой головкой и фосфатной группой лецитина с О(19)Н(29) кольца А. Эти значения электронного строения представлены в скобках для С(34) и С(36). В системе фосфатидилхолин — кверцетин возникает несколько конкурирующих взаимодействий, между которыми происходит быстрый обмен (в шкале времени ЯМР), поэтому наблюдается усредненная величина ХС.

Таким образом, спектры ЯМР на ядрах <sup>13</sup>С и результаты квантово-химических расчетов изменения заряда, возникающих при взаимодействии кверцетина с фосфолипидом, показывают, что наиболее вероятным является комплекс с участием  $\pi$ -электронной системы кольца С, чему способствует и образование водородной связи между ОН группой кольца А и фосфатной группой лецитина. Образующийся комплекс является достаточно прочным и, по-видимому, может блокировать точки взаимодействия патогенетических веществ с фосфолипидами клеточных мембран.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. П. Георгиевский, Н. Ф. Комиссаренко, С. Е. Дмитрук, *Биологически активные вещества лекарственных растений*, Наука, Новосибирск (1990), сс. 101 – 104, 107 – 113.
2. Л. К. Клышев, В. А. Бандюкова, Л. С. Люкина, *Флавоноиды растений*, Наука, Алма-Ата (1978), сс. 3 – 8.
3. E. Middleton, *Ann. Allergy*, **61**(6), 53 – 57 (1988).
4. M. Gabor, *Acta pharm. hung.*, **57**(6), 275 – 282 (1987).
5. S. S. Gambhir, *Indian J. med. Res.*, **85**, 689 – 693 (1987).
6. I. Lang, *Acta med. hung.*, **45**(3 – 4), 287 – 295 (1988).
7. I. B. Afanas'ev, *Biochem. Pharmacol.*, **38**(11), 1763 – 1769 (1989).
8. R. T. Davies, I. Moodley, *Pharmacol. Ther.*, **17**, 279 (1982).
9. M. Wleklík, *Acta Virol.*, **32**(6), 522 – 525 (1988).

10. R. Alan, *Comprehensive heterocyclic chemistry*, **2**(2), 99 – 394 (1984).
11. Р. С. Насибуллин, Л. В. Спирихин, В. А. Пономарева, *Биофизика*, **36**(4), 594 – 598 (1991).
12. А. С. Сафар, Э. Т. Оганесян, *Хим-фарм. журн.*, **25**(2), 4 – 8 (1991).
13. R. M. C. Dawson, *Biochim*, **88**(3), 414 – 423 (1993).
14. Ю. Е. Шапиро, А. В. Викторов, Л. И. Барсуков, Л. Д. Бергельсон, Сб. статей *Биофизика мембран*, Москва (1981), сс. 22 – 32.
15. E. Breitmaier, K. N. Spohn, *Tetrahedron*, **29**(8), 1145 – 1152 (1973).
16. У. Буркет, Н. Л. Эллинджер, *Молекулярная механика*, Мир, Москва (1986).
17. M. Z. S. Dewar, *Am. Chem. Soc.*, **99**, 4899 (1977).
18. В. Г. Дашевский, *Конформационный анализ органических молекул*, Химия, Москва (1982).
19. Б. Я. Симкин, М. Н. Глуховцев, *Химия гетероцикл. соед.*, № 12, 1587 – 1603 (1989).
20. Р. С. Насибуллин, А. Б. Ремизов, М. В. Алпарова, *Хим-фарм. журн.*, **25**(12), 15 (1991).
21. K. Larsson, *Chemistry and Physics of Lipids*, 14, 233 – 235 (1975).
22. Р. С. Насибуллин, Л. В. Спирихин, В. А. Пономарева, *Биофизика*, **36**(4), 594, (1991).
23. А. В. Иоганин, *Водородная связь*, Наука, Москва (1981).
24. Pretsch, Clerc, Seibl, Simon, *Tabls of spectral data for structure determination of organic comraunds*, 2 (1987).

Поступила 14.05.01.