



УДК 543.544.5

## Исследование связи биологической активности катехинов с физико-химическими свойствами и структурными параметрами молекул

Шафигулин Р.В., Егорова К.В., Буланова А.В.

ГОУ ВПО «Самарский государственный университет», Самара

Поступила в редакцию 15.03.2010 г.

### Аннотация

Исследована биологическая активность (БА) катехинов – основных полифенольных соединений экстрактов зеленого чая. Найдена связь с физико-химическими свойствами веществ, такими как константы сорбции  $k$ , гидрофобность  $P$ , молекулярная рефракция  $MR$ , объем молекул  $V$ , а также топологическими характеристиками – индексами Винера  $W$ , и индексами Рандича  ${}^n\chi$ . Показано, что найденные корреляции обладают высокой прогностической способностью по отношению к различного вида биологической активности катехинов.

**Ключевые слова:** биологически активные соединения, катехины, высокоэффективная жидкостная хроматография, взаимосвязь «удерживание - физико-химическое свойство - биологическая активность»

The biological activity of catechins – the main polyphenolic compounds in green tea extracts has been investigated. The connection of the physicochemical properties of substances has been founded, such as the constants of sorption  $k$ , hydrophobicity  $P$ , molecular refraction  $MR$ , molecular volume  $V$ , as well as topological features – Wiener indexes  $W$ , and indexes Randicha  ${}^n\chi$ . Shown that the correlations have a high predictive capability with respect to various kinds of biological activity of catechins.

**Keywords:** biologically active connections, catechins, a highly performance liquid chromatography, interrelation «keeping - physicochemical property - biological activity»

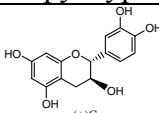
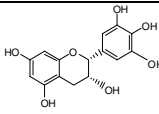
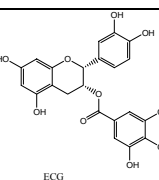
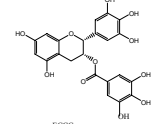
### Введение

В настоящее время во многих лабораториях ведутся исследования свойств природных и синтетических биологически активных соединений. Установление взаимосвязи биологической активности (БА) и физико-химических свойств соединений с их молекулярной структурой является актуальной задачей, поскольку позволяет прогнозировать свойства веществ и осуществлять их направленный синтез.

Интерес к полифенольным соединениям растительного происхождения достаточно велик в связи с их широкими возможностями терапевтического и фармакологического применения [1].

Целью данного исследования явилось создание спектра БА катехинов из чайного листа составляющих основную часть экстрактов чая, и нахождения связи с их физико-химическими свойствами и молекулярной структурой. Ранее [2, 3] сообщались общие сведения о полезных свойствах катехинов и их структуре. В таблице 1 представлены структура и обозначения изучаемых веществ.

Таблица 1. Структуры и названия катехинов

№	катехины	структура	название
1	(+)катехин (+)(+C)		3,5,7,3',4' - пентаоксифлаван
2	(-)эпигаллокатехин (EGC)		3,5,7,3',4',5' - гексаоксифлаван
3	(-)эпикатехингаллат (ECG)		5,7,3',4' - тетраоксифлаван – 3 – галлат
4	(-) эпигаллокатехингаллат (EGCG)		5,7,3',4',5' - пентаоксифлаван – 3 - галлат

## Эксперимент

Экспериментальным методом была выбрана обращено-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ ВЭЖХ), поскольку сорбция зачастую является первой стадией общего механизма действия физиологически активных веществ.

Эксперимент осуществляли с использованием жидкостного хроматографа Waters (USA) с УФ детектором, при длине волны равной 280 нм. Применяли колонку Optiparak OP C18 (250×4.6 мм, диаметр частиц 5 мкм) при температуре 25<sup>0</sup>С (при более высоких температурах катехины переходят в высокомолекулярные фенольные соединения [1]). В качестве подвижной фазы использовали воду с добавлением органических модификаторов ацетонитрила и метанола и рН элюента поддерживали постоянным, добавляя в него 0,1 мл уксусной кислоты. Элюирование проводили в изократических и различных градиентных режимах.

## Обсуждение результатов

На рис.1 представлены хроматограммы разделения катехинов с различными модификаторами. Порядок элюирования веществ остается постоянным, однако время выхода веществ из колонки заметно различается.

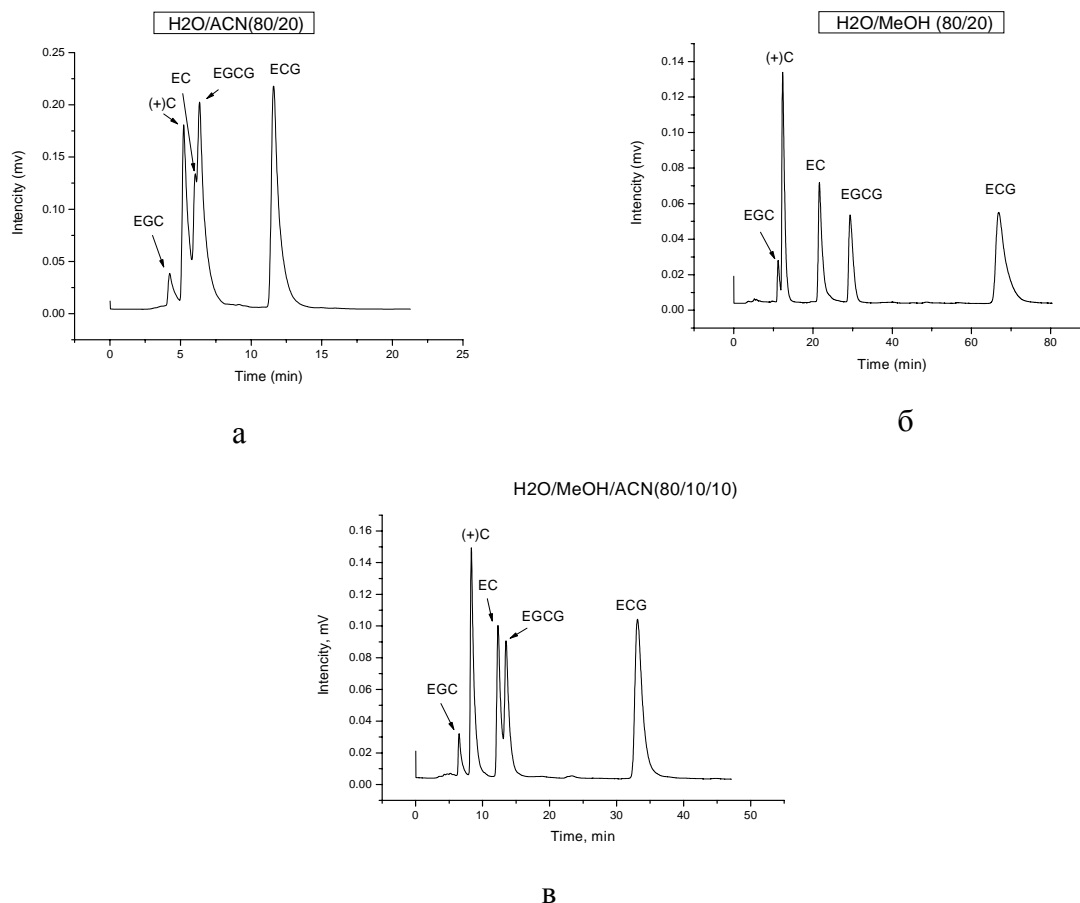


Рис. 1. Хроматограммы разделения катехинов в изократических режимах

Спектром БА данного вещества предполагается считать набор фармакологических эффектов, которые может проявить вещество в различных условиях эксперимента и в клинике. В настоящее время существует ряд подходов, основанных на применении компьютерных программ, использующих идею: биологическая активность вещества является функцией его химической структуры. Одной из таких программ является компьютерная система предсказания БА PASS C&T. Химическая структура представлена в виде различных дескрипторов (Multilevel Neighbourhoods of Atoms)[4, 5].

Результаты прогноза помимо названий активности включает в себя оценки вероятностей наличия ( $P_a$ ) или отсутствия каждого вида активности ( $P_i$ ), имеющие значения от 0 до 1. Их сумма не равна единице, т.к. вероятности рассчитываются независимо. Сведения о некоторых видах БА исследуемых соединений представлены таблице 2.

Значения  $P_a > 0,8$  (максимальное значение  $P_a = 0,985$ ) свидетельствуют о высокой вероятности наличия у соединения этого вида биологической активности. Есть мнение, что для катехинов стереохимия не оказывает существенного влияния на активность [6], поэтому в таблице приведены свойства одного из диастереоизомеров – катехина ((+)C) и не рассматриваются свойства второго изомера эпикатехина (EC). Активность катехинов связана с наличием гидроксильных групп в различных положениях. Так, большим противоопухолевым действием, количественно характеризующийся величиной ингибитора топоизомеразы II (Topoisomerase II inhibitor), обладают EGC с величиной  $P_a = 0.963$ ,

EGCG ( $P_a=0.923$ ) и эпикатехингаллат (ECG) ( $P_a=0.919$ ). Увеличение числа гидроксигрупп в кольце В приводит к увеличению вероятности БА и других видов. Эпигаллокатехин (EGC) имеет максимальное значение антиоксидантной активности (Free radical scavenger, ( $P_a=0.978$ )), т.к. продукты перекисного окисления липидов влияют на процесс секреции гистамина. Он является потенциальным противоаллергическим соединением.

Таблица 2. Оценка биологической активности, рассчитанная по программе PASS C&T

Вещество	$P_a$	$P_i$	Активность
(+)С	0.985	0.002	Membrane integrity agonist
	0.901	0.005	Free radical scavenger
	0.850	0.007	Vascular (peripheral) disease treatment
	0.854	0.015	Phosphatase inhibitor
	0.817	0.005	Sweetener
EGC	0.983	0.002	Membrane integrity agonist
	0.978	0.002	Free radical scavenger
	0.963	0.001	Topoisomerase II inhibitor
	0.867	0.004	Fibrinolytic
	0.862	0.014	Phosphatase inhibitor
ECG	0.964	0.004	Membrane integrity agonist
	0.961	0.003	Free radical scavenger
	0.919	0.003	Topoisomerase II inhibitor
	0.811	0.006	Fibrinolytic
	0.809	0.029	Phosphatase inhibitor
EGCG	0.965	0.003	Free radical scavenger
	0.966	0.004	Membrane integrity agonist
	0.923	0.002	Topoisomerase II inhibitor
	0.819	0.006	Fibrinolytic
	0.832	0.022	Phosphatase inhibitor

Весьма полезную информацию о БА катехинов можно получить, изучив их сорбционные и физико-химические свойства, а также структурные параметры молекул в виде различных групп дескрипторов [7, 8]. Использование различных корреляций БА с коэффициентами корреляций  $r \geq 0.8$  дает возможность прогнозировать применение наилучших производных катехинов для конкретно поставленных целей. На основании хроматографического эксперимента определяли фактор удерживания  $k = \frac{(t_R - t_M)}{t_M}$ , где  $t_R$  и  $t_M$  – время удерживания исследуемого соединения и несорбирующегося компонента (нитрит натрия). В настоящем исследовании квантово-химические расчеты осуществляли с использованием программы *HyperChem Professional 7* в рамках метода PM3 с полной оптимизацией геометрии молекул. В работе были рассчитаны значения молекулярного объема с учетом ван-дер-ваальсовых расстояний ( $V$ ), поляризуемости ( $\alpha$ ), значения дипольных моментов ( $\mu$ ), молекулярной рефракции ( $MR$ ), логарифма коэффициента распределения в системе н-октанол-вода ( $\log P$ ). В качестве дескрипторов использовались также интегральные характеристики структуры молекул – топологические индексы связанности Рандича различных порядков  ${}^n\chi$  и индексы Винера  $W$ . Некоторые свойства катехинов, для которых получены наилучшие значения коэффициентов корреляции с БА приведены в таблице 3. Представленные в таблице дескрипторы являются наиболее интегративными характеристиками природы вещества и дают достаточно полный комплекс свойств, наиболее ответственных за проявляемые биологические эффекты.

Таблица 3. Сорбционные, физико-химические и структурные характеристики катехинов

Вещество	lgk	logP	MR, Å <sup>3</sup> /моль	W	<sup>1</sup> χ	<sup>2</sup> χ	V, Å <sup>3</sup>	μ, D
(+)C	0.2950	2.11	72.85	894	6,369	4,753	770.80	2.211
EGC	0.0835	1.83	74.55	1005	6,509	4,912	789.53	3.205
ECG	1.3187	6.11	104.26	2839	9,330	7,109	1113.4	4.024
EGCG	0.7135	5.82	105.96	3056	9,478	7,269	1112.32	5.231

Примечание. Фактор удерживания  $k$  получен для водно-цетонитрильного элюента в градиентном режиме: в течение 30 мин. Концентрация ацетонитрила линейно увеличивалась от 10 до 30 % об.

На рис. 2 представлена одна из исследованных зависимостей «БА-свойство», являющейся наиболее предпочтительной, с хорошей прогностической способностью ( $r = 0.999$ ).

Многими авторами принято считать начальной стадией фармакологического действия веществ адсорбцию с последующим проникновением через клеточную мембрану, что имеет решающее значение для включения их в процесс биосинтеза [9]. На рис. 3 представлена зависимость величины БА вида membrane integrity agonist от гидрофобности катехинов, аналогичная зависимость наблюдается для молекулярной рефракции MR.

Из рисунка видно, что исследуемые вещества можно разделить на две группы: 1 – катехин и эпигаллокатехин; 2 – эпикатехингаллат и эпигаллокатехингаллат. Первая группа характеризуется существенно меньшим значением величины гидрофобности по сравнению со значениями второй группы, в молекуле которых в качестве заместителя в положении 3 находится галлат. За счет

увеличения гидрофобности катехинов происходит увеличение вклада дисперсионных взаимодействий с гидрофобными микроканалами клеток, которые образуются за счет липидных молекул и обращены перпендикулярно по отношению к поверхности клетки [10]. Именно за счет дисперсионных взаимодействий происходит концентрирование молекул катехинов на поверхности клетки и дальнейшем транспорте их внутрь клетки для биохимических процессов. Таким образом, можно сделать вывод, что галлатные производные катехинов легче проникают внутрь клетки.

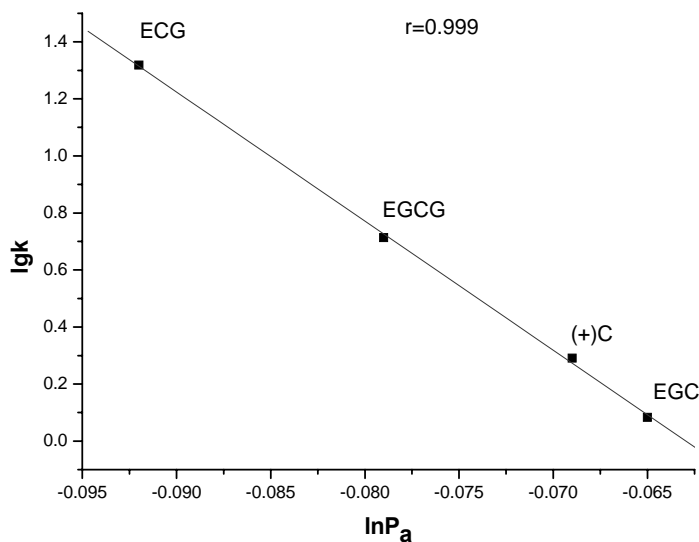


Рис. 2. Зависимость логарифма фактора удерживания  $\lg k$  от логарифма биологической активности (Phosphatase inhibitor)  $\ln P_a$ .

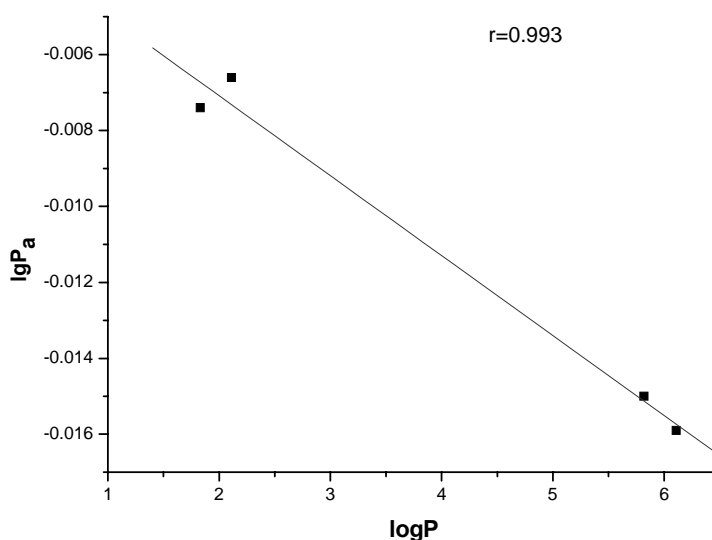


Рис. 3. Зависимость  $\lg P_a$  (membrane integrity agonist) от гидрофобности ( $\log P$ ) катехинов

Характеристическими структурными дескрипторами являются индексы Винера  $W$ , а также молекулярные индексы связанности Рандича  ${}^n\chi$  различных порядков. Из таблицы 3 видно, что замена гидроксогрупп в положении 3 на галлат при переходе от эпигаллокатехина (EGC) к эпигаллокатехингаллату (EGCG) увеличивает  ${}^1\chi$  примерно на 2,97 ед., индекс  ${}^2\chi$  – на 2,36 ед. Аналогичная ситуация

наблюдается при сравнении (+)С и ECG. Некоторое увеличение порядка  ${}^2\chi$  по сравнению с  ${}^1\chi$  отражает уменьшение взаимного влияния атомов внутри ее топологического пространства. Зависимость величин БА от величин топологических индексов имеет характер, аналогичный представленной на рис.3. Топологические индексы наряду с молекулярной рефракцией MR характеризует компактность молекулы. Чем меньше соответствующие величины, тем структура компактнее, следовательно, для 1-й группы катехинов ((+)С и ECG) проникающая способность через клеточную мембрану максимальна, о чем свидетельствует значение БА этого вида. Указанные корреляции адекватны. Факторы удерживания и величины БА катехинов свидетельствуют о преобладающем дисперсионном характере взаимодействий, в то время как низкие значения коэффициента корреляций ( $r < 0,5$ ) с дипольным моментом  $\mu$  указывают на незначительный вклад электростатических взаимодействий. Несмотря на то, что коэффициенты сорбции  $k$  и величины БА катехинов коррелированы в различных системах (хроматографических и биологических), модели «БА-свойство» можно считать адекватными и способными оптимизировать направленный поиск веществ заданной биологической активностью.

Нами была проанализирована связь величин БА со свойствами молекул катехинов, которая аппроксимировалась линейными полиномиальными функциями вида:

$$P_a = a_0 + \sum_i a_i \cdot D_i$$

где  $a_0$  и  $a_i$  - коэффициенты уравнения,  $D_i$  - молекулярные дескрипторы (таблица 4). В таблице приведены выборочные корреляции с максимальными значениями  $P_a$  и коэффициентами корреляции  $r$ . Анализ полученных уравнений позволяет сделать заключение о возможности их применения для оценки и прогнозирования БА исследуемых соединений. Полученный *a priori*, путем расчетов, комплекс БА в сочетании с экспериментом позволяет подтвердить концепцию о начальной стадии биологического действия катехинов (сорбция и проникновение через клеточную мембрану молекул).

Таблица 4. Зависимость вероятностной оценки БА ( $P_a$ ) от физико-химических и структурных параметров катехинов

Вид биологической активности	Функциональная зависимость $P_a = f(k, P, MR, V, W, {}^1\chi, {}^2\chi)$	r
Membrane integrity agonist	$P_a = 1.041 + 0.002 \log P + 0.001 MR - 0.0002 V$	0.999
	$P_a = 0.993 + 0.001 \lg k - 0.005 \log P$	0.984
	$P_a = 1.064 - 0.010 \lg k + 0.007 \log P - 0.001 MR$	0.999
	$P_a = 1.292 + 8.138 \cdot 10^{-5} W - 0.023 {}^1\chi - 0.049 {}^2\chi$	0.999
Phosphatase inhibitor	$P_a = -0.676 - 0.210 \log P - 0.030 MR + 0.005 V$	0.999
	$P_a = -1.309 + 0.276 \lg k - 0.361 \log P + 0.039 MR$	0.999
	$P_a = -4.929 - 0.002 W - 0.979 {}^1\chi + 2.891 {}^2\chi$	0.999
Free radical scavenger	$P_a = -0.203 - 0.147 \log P - 0.020 MR + 0.004 V$	0.999
	$P_a = -0.649 + 0.192 \lg k - 0.252 \log P + 0.028 MR$	0.999
	$P_a = -3.146 - 0.001 W - 0.685 {}^1\chi + 2.02 {}^2\chi$	0.999
Fubrinolytic	$P_a = -0.852 + 0.123 \lg k - 0.961 \log P + 0.077 MR$	0.984

## Список литературы

1. Запрометов М.Н. Фенольные соединения. Распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука, 1993. С.22-24.
2. Шафигулин Р.В., Егорова К.В., Буланова А.В. Исследование корреляционных зависимостей «хроматографическое удерживание- структура - свойство» для катехинов в условиях ОФ ВЭЖХ // Альманах современной науки и образования. 2008. №59(12). С. 143-147.
3. Шафигулин Р.В., Егорова К.В., Буланова А.В. Структурно-сорбционные характеристики полифенольных соединений // Всероссийская конференция «Техническая химия. Достижения и перспективы», Пермь, 5-9 июня 2006 г. С.418-421.
4. Поройков В.В. Компьютерное предсказание биологической активности веществ: пределы возможного // Химия в России. 1999, №2, С.8-12.
5. Поройков В.В. Филимонов Д.А. Компьютерный прогноз биологической активности химических соединений как основа для поиска и оптимизации базовых структур новых лекарств // Азотистые гетероциклы и алкалоиды. Сб. Материалов: Иридиум –пресс 2001. Т.1. С.123-129.
6. Сараф А.С., Оганесян Э.Т. Флавоноиды как потенциальные противоаллергические соединения (обзор) // Хим.-фарм. журн. 1991. №2. С. 4-8.
7. Трепалин С.В., Раздольский А.Н. Раевский О.А. Программный комплекс для компьютерного конструирования эффективных физиологически активных веществ, основанный на двух- и трехмерных физико-химических дескрипторах // Хим.-фарм. журн. 2000. Т.34. №12. С. 23-25.
8. Раевский О.А., Сапегин А.М. Моделирование связи «структура-активность». III. Системный физико-химический подход к конструированию биологически активных веществ // Хим.-фарм. журн. 1990. №1. С.43-46.
9. Оганесян, Э. Т. Использование квантово-химических методов для обоснования антирадикального (ОН) действия полигидроксихалконов // Хим.-фарм. журн. 2002. Т. 36. № 12. С. 21-25.
10. Бекер М.Е. Введение в биотехнологию. Пищевая промышленность, 1978. 228 с.

**Шафигулин Роман Владимирович** - к.х.н., ассистент кафедры физической химии и хроматографии, Самара

**Егорова Клара Витальевна** - к.х.н., доцент кафедры физической химии и хроматографии, Самара, тел. (846)334-54-47

**Буланова Анджела Владимировна** - доктор химических наук, профессор кафедры физической химии и хроматографии, Самара

**Shafigulin Roman V.** - Samara State University, Candidate of science Chemistry, assistant of department physical chemistry and chromatography, Samara, E-mail: [shafiro@mail.ru](mailto:shafiro@mail.ru)

**Egorova Klara V.** - Samara State University, Candidate of science Chemistry, docent of department physical chemistry and chromatography, Samara

**Bulanova Andgela V.** - Samara State University, doctor of science Chemistry, professor of department physical chemistry and chromatography, Samara