

DARIUSZ KIKUT-LIGAJ

## PROGNOZOWANIE SMAKU GORZKIEGO CHROMONÓW I FUROCHROMONÓW NA PODSTAWIE PROSTEGO MODELU FARMAKOFOROWEGO (SPM)

### Streszczenie

Chromony i furochromony charakteryzują się wysoką aktywnością biologiczną. Pochodne należące do tych grup związków wykazują zróżnicowane działanie farmakologiczne. Smak gorzki jest jednym z ważniejszych wyróżników sensorycznych determinujących cechy jakościowe żywności. Badania nad smakiem gorzkim mają kluczowe znaczenie dla wyjaśnienia złożonej problematyki akceptacji i nieakceptowania kompozycji smakowych wielu produktów spożywczych. W celu wyznaczenia gorzkiej aktywności smakowej badanych związków zastosowano tzw. 3D modele farmakoforowe. Przeanalizowano takie „klasyczne” funkcje farmakoforowe, jak akceptory i donory wiązań wodorowych (HBA i HBD) oraz obszary grup halogenowych (HAL) i aromatyczno-hydrofobowych (AR/H). Uzyskane reprezentacje farmakoforowe badanych ligandów zawierają obszary o cechach nukleofilowych, jak i aromatyczno-hydrofobowych. Intensywność smaku gorzkiego (ISG) badanych związków jest bezpośrednio zależna od liczby reprezentacji farmakoforowych. Stwierdzono, że ligandy dysponujące kilkoma reprezentacjami farmakoforowymi szybciej i efektywniej aktywują białko receptorowe. Dowiedziono również, że najistotniejsza dla stymulacji smakowej jest liczba obszarów pobudzających receptor (LPI) oraz wyróżnik określający liczbę wpasowań pojedynczego liganda w hipotetyczny obszar receptorowy (LIS). Parametry LIS i LPI to molekularne deskryptory opisujące powinowactwo badanych związków do receptora. Deskryptory formułujące równanie smakowe umożliwiły wyznaczenie wielkości prognozowanych gorzkiej aktywności smakowej (ISG<sub>p</sub>). Prognozowane wartości intensywności smaku gorzkiego (ISG<sub>p</sub>) badanych związków potwierdzono za pomocą sensorycznych wartości intensywności smaku gorzkiego (ISG<sub>s</sub>).

**Słowa kluczowe:** chromony, furochromony, percepcja smaku gorzkiego, gorzkie ligandy, prosty model farmakoforowy (SPM)

### Wprowadzenie

Zróżnicowanie percepcji smakowej u ludzi uwarunkowane jest zmianami w środowisku naturalnym, dziedziczeniem zmysłów smaku, a także uzależnione jest od rodzaju dostępnego pożywienia, akceptacji i preferencji smakowych oraz wieku i stanu

---

*Dr D. Kikut-Ligaj, Katedra Przyrodniczych Podstaw Jakości, Wydz. Towaroznawstwa, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu, al. Niepodległości 10, 61-875 Poznań. Kontakt: darek.kikut@ue.poznan.pl*

zdrowia [15, 27, 31]. Powszechnie przyjmuje się pięć podstawowych wyróżników smaku tj. słodki, słony, umami, kwaśny i gorzki [33]. Wymienione cechy są wykorzystywane do oceny składu kalorycznego żywności (słodki, umami), podaży elektrolitów (słony), zagrożenia stwarzanego przez potencjalnie zepsute lub niedojrzałe produkty (kwaśny) oraz składników toksycznych (gorzki) [34]. Szczególną rolę w rozpoznawaniu walorów jakościowych spożywanej żywności pełni smak gorzki. Identyfikacja gorzkich składników pokarmowych przez system rozpoznania smakowego jest niezbędna do przetrwania i prawidłowej egzystencji wielu gatunków zwierząt [2]. Rolą smaku gorzkiego jest przede wszystkim ochrona przed toksycznymi komponentami żywności [34] oraz zapewnienie koniecznej ilości naturalnych metabolitów, leków oraz neuro- i psychostymulantów [2, 34]. Konsekwencją tego jest akceptacja małych stężeń goryczy w pożywieniu oraz odrzucanie pokarmu wykazującego silne jej natężenie [28].

Smak gorzki identyfikują wyspecjalizowane komórki smakowe. Subpopulacja komórek receptorowych smaku gorzkiego tworzy odrębną i odseparowaną od innych komórek smakowych grupę komórek chemosensorycznych [2]. Pojedyncza komórka smaku gorzkiego rozpoznaje informacje smakowe pochodzące od wszystkich gorzkich ligandów, ponieważ ma pełną pulę receptorów identyfikujących smak gorzki [1, 6]. Sygnały pochodzące od wszystkich gorzkich receptorów przekazywane są do jednego obszaru w mózgu, co sprawia, że czuje się wyłącznie smak gorzki bez możliwości odróżniania poszczególnych substancji gorzkich (np. kofeiny od atropiny). W mózgu impulsy smakowe są uśredniane, wytwarzając w ten sposób obraz całkowitej intensywności gorzkiej kompozycji smakowej. Intensywność smaku gorzkiego umożliwia rozróżnienie żywności o akceptowanej kompozycji smakowej od potencjalnie toksycznej. Kompozycje smakowe produktów spożywczych są zróżnicowane nie tylko pod względem ilościowego udziału poszczególnych wyróżników smakowych, ale także pod względem składu jakościowego. Odpowiednia domieszka smaku gorzkiego może zapewnić optymalne i pożądane cechy jakościowe żywności.

W rozpoznaniu smaku gorzkiego u ludzi pośredniczą receptory sprzężone z białkiem G, do których zaliczana jest rodzina receptorów smakowych TAS2R [36]. W ostatnich latach wiele prac poświęcono charakterystyce TAS2R ssaków, a w szczególności człowieka. Ludzki genom koduje około 25 funkcjonalnych TAS2R, zaliczanych do glikoprotein [29], które mają zdolność do tworzenia homo- i heterooligomerów [19]. Coraz lepiej poznane właściwości białek receptorowych TAS2R dostarczają informacji o złożoności percepcji smakowej związanej z rozpoznawaniem smaku gorzkiego. Najnowsze badania dowiodły, że połowa gorzkich związków rozpoznawana jest przez grupę trzech białek receptorowych TAS2R10, TAS2R14 i TAS2R46 [22]. Ważnym aspektem prac badawczych nad smakiem gorzkim są badania obszarów aktywacji białek receptorowych TAS2R przez różne grupy gorzkich ligandów [3].

Przewidywanie gorzkiej aktywności smakowej wymaga zastosowania właściwych technik modelowania komputerowego. W poszukiwaniu aktywnych biologicznie związków chemicznych wykorzystywany jest tzw. wirtualny skrining (VS, ang. *Virtual Screening*) [8]. Metody VS uwzględniają znaną strukturę receptora (SBVS, ang. *Structure-Based* oraz *Target-Based virtual screening*) lub bazują wyłącznie na strukturach ligandów danego receptora (LBVS, ang. *Ligand-Based Virtual Screening*) [8]. Techniki te polegają na badaniach fizykochemicznych właściwości (steryczno-strukturalnych i elektronowych) wirtualnych ligandów.

Podstawową techniką stosowaną do opisu interakcji małowcząsteczkowych ligandów z dowolnym celem makromolekularnym jest technika 3D farmakoforowa [30]. Odszukanie właściwego modelu farmakoforowego jest związane z rozpoznaniem przestrzennej reprezentacji tzw. funkcji farmakoforowych (grup funkcyjnych różniących się pod względem np. właściwości elektronowych), niezbędnych do wygenerowania lub zablokowania aktywności biologicznej [15, 21].

W rzeczywistości farmakofor przedstawia przestrzenne ułożenie wybranych cech budowy cząsteczki, jak np. gęstość ładunków, miejsca donorowe i akceptorowe wiązań wodorowych, ugrupowania hydrofobowe lub obszary aromatyczne [30]. Farmakofor stanowi poniekąd ogólną 3D "formę molekularną", eksponującą powtarzające się właściwości w określonym zbiorze aktywnych ligandów [4]. Istnieje szereg technik, takich jak: dokowanie molekularne (ang. *Molecular Docking*) [20], QSAR (ang. *Quantitative Structure-Activity Relationships*) [14] czy analiza porównawcza pól molekularnych CoMFA (ang. *Comparative Molecular Field Analysis*) [5], które uzupełniają techniki farmakoforowe [35]. Zastosowanie w badaniach tzw. prostego modelu farmakoforowego (SPM, ang. *Simple Pharmacophore Model*) [15] ułatwia ocenę gorzkich ligandów pod względem intensywności smaku gorzkiego. Technika 3D farmakoforowa umożliwia wgląd w interakcje ligandów z celami molekularnymi, co pozwala na wyznaczenie matematycznych deskryptorów kodujących gorzką aktywność smakową.

Celem pracy było rozpoznanie parametrów strukturalnych kodujących gorzką aktywność smakową serii badanych związków chemicznych pochodzenia naturalnego. Wyznaczone metodami modelowania komputerowego parametry strukturalne posłużą do matematycznego opisu różnic gorzkiej aktywności smakowej tych związków. Zrozumienie istoty różnic w aktywności gorzkich związków chemicznych umożliwi precyzyjne sterowanie składem gorzkich kompozycji smakowych produktów spożywczych.

## Material i metody badań

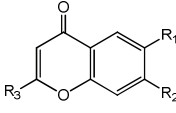
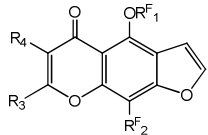
### Badane związki i ich właściwości biologiczne

W badaniach użyto przedstawicieli dwóch pokrewnych klas związków chemicznych tj. pochodnych chromonowych oraz furochromonowych.

Chromony i ich furanowe pochodne (furochromony) odznaczają się zróżnicowaną aktywnością biologiczną. Wyizolowano je z roślin i metabolitów grzybowych [7]. Furochromony występują w aminku egipskim (*Ammi visnaga*), który jest rośliną dziko rosnącą w zachodniej Azji, północnej Afryce oraz w południowej Europie. Owoce i łodygi *Ammi visnaga* zawierają: pochodne furochromonów (kelinę – około 1 - 2 %, wisnaginę – do 0,1 %). Chromony i ich pochodne wykazują zróżnicowane funkcje farmakologiczne [10].

Pod względem aktywności biologicznej najlepiej rozpoznana jest kelina. Ma ona działanie przeciwbólowe, antyspastyczne, antyastmatyczne, bakteriobójcze, a ponadto reguluje poziom VLDL i LDL cholesterolu [10]. Wszystkie użyte w badaniach związki miały czystość HPLC. Przetawiono je w tab. 1.

Tabela 1. Struktury związków użytych w badaniach (1-9).  
Table 1. Structures of compounds used in research study (1-9).

Nr związku Compound number	Chromony / Chromones			
				
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
1	-H	-H	-H	-
2	-CH <sub>3</sub>	-H	-H	-
3	-Cl	-H	-H	-
4	-Br	-H	-H	-
5	-Cl	-CH <sub>3</sub>	-H	-
6	-H	-H	-COOH	-
Nr związku Compound number	Furochromony / Furochromones			
				
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
7	-CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-H
8	-CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>
9	-CH <sub>3</sub>	-H	-H	-H

Struktura wyjściowa, jaką jest chromon (1), została poddana chemicznej modyfikacji w obszarach R<sub>1</sub>-R<sub>4</sub> oraz R<sup>F</sup><sub>1</sub> i R<sup>F</sup><sub>2</sub>. Chemiczna modyfikacja w wymienionych obszarach prowadzi do zmian właściwości nukleofilowych i elektrofilowych tych regionów.

#### *Metody komputerowe stosowane w badaniach struktur związków 1-9*

Modelowanie molekularne prowadzono przy użyciu pakietu programowego Gaussian 09W. Optymalizację geometrii struktur badanych ligandów (1-9) prowadzono stosując teorię funkcjonałów gęstości (DFT, ang. *Density Functional Theory*) z B3LYP funkcjonałem i 6-31G(2d,p) bazą [16], stymulując jednocześnie obecność wody jako rozpuszczalnika za pomocą modelu CPCM (ang. *Conducting Polarized Continuum Model*) [23, 32, 37]. Gęstość ładunków potencjału elektrostatycznego (ESP, ang. *Electrostatic Potential*) była kalkulowana i wizualizowana w pakiecie Gaussian 09W.

Funkcje farmakoforowe wyznaczono za pomocą programu LigandScout. Przeanalizowano "klasyczne" funkcje farmakoforowe, takie jak: ugrupowania będące akceptorami i donorami wiązania wodorowego (HBA i HBD, ang. *Hydrogen Bond Acceptors (Donors)*), obszary o właściwościach aromatyczno-hydrofobowych (AR/H) oraz regiony grup halogenowych (HAL). Wizualizacje prostego modelu farmakoforowego (SPM, ang. *Simple Pharmacophore Model*) [15] przeprowadzono za pomocą pakietu programowego ChemBioOffice.

#### *Badania sensoryczne*

W badaniach sensorycznych stosowano technikę przepłukiwania jamy ustnej (*sip-and-spit*) [9, 18] wodnymi roztworami badanych związków (1-9) [11, 12, 13, 17]. Przedmiotem badań były wodne roztwory chromonów i furochromonów (1-9) w stężeniach nadprogowych (0,002 g/100 ml wody dejonizowanej). Ocenę sensoryczną roztworów związków 1-9, przygotowanych metodą rozcieńczeń, przeprowadził 15-osobowy panel sensoryczny [24] tzw. „wybranych oceniających”. Zadaniem panelu sensorycznego było uporządkowanie związków 1-9 pod względem intensywności wrażenia smaku gorzkiego [24, 25, 26]. Uzyskane wyniki zostały przedstawione za pomocą skali liczbowej (0-100). Serie badawcze powtórzono trzykrotnie, a wyniki pomiarów opracowano statystycznie.

## **Wyniki i dyskusja**

### *Otrzymywanie prostego modelu farmakoforowego (SPM) badanej grupy ligandów*

Szczegółowa definicja precyzuje farmakofor jako zespół cech sterycznych i elektronowych niezbędnych do uzyskania optymalnych oddziaływań supramolekularnych z odpowiednią strukturą biologiczną (celem molekularnym) [30]. Rozwój metod wizualizacji i modelowania komputerowego sprawił, że płaskie modele farmakoforowe (2D) zastępowane są modelami trójwymiarowymi, tzw. 3D farmakoforami [30]. Tech-

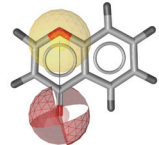
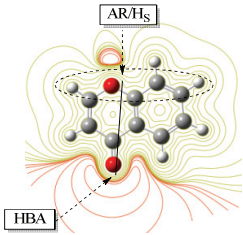
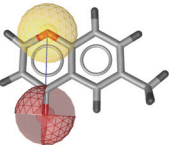
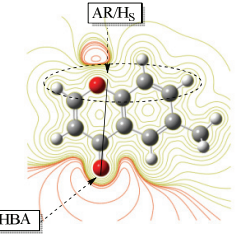
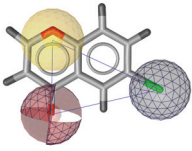
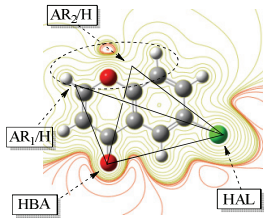
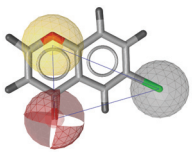
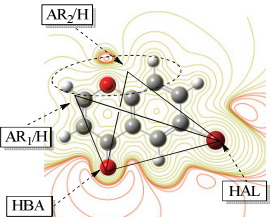
nika 3D farmakoforowa posługuje się kryterium podobieństwa, co oznacza, że podobne strukturalnie ligandy powinny wykazywać analogiczną aktywność biologiczną. Aczkolwiek pełne kryterium podobieństwa (w obrębie jednego receptora) wykazywać mogą jedynie układy multicentrowe. Reprezentacje trójcentrowe mogą różnić się między sobą, ponieważ przedstawiają jedną z kilku możliwych aktywacji siedmiomembranowego receptora. Rozpoznanie i wizualizację funkcji farmakoforowych dla związków (1-9) przeprowadzono za pomocą programu LigandScout (tab. 2). Wyjściowa struktura chromonu (1) i jego strukturalne odpowiedniki (2-9) znacząco się różnią. Chromony i furochromony zawierają obszary: nukleofilowe (HBA) (w wielu przypadkach powstałe na skutek rozprzężenia kilku blisko położonych grup nukleofilowych – HBA<sub>S</sub>), aromatyczno/hydrofobowe (AR/H) oraz regiony grup halogenowych (HAL – mające mniej elektroujemne potencjały od typowych regionów HBA).

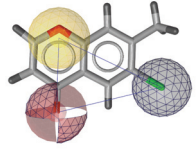
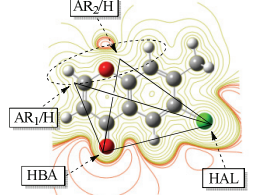
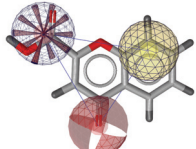
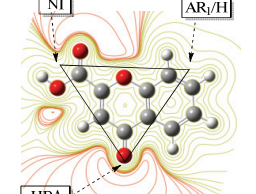
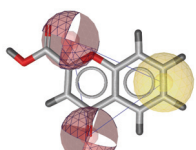
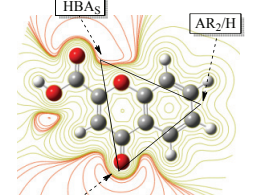
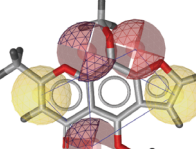
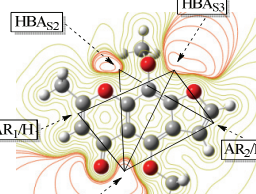
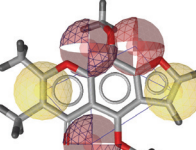
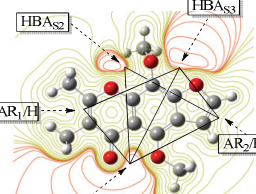
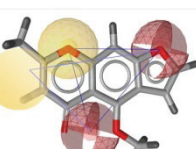
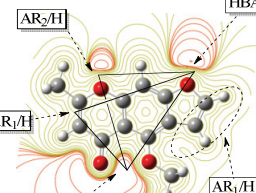
Analiza funkcji farmakoforowych (tab. 2) umożliwiła sprecyzowanie i pogrupowanie ogólnych cech powinowactwa ligandów (1-9) do receptora. Obszar grupy karbonylowej C<sub>4</sub>=O w przypadku struktur związków 1-6 jest akceptorem wiązania wodorowego (HBA), w przypadku struktur związków 7-9 obszar ten (HBA<sub>S1</sub>) jest rozmyty pomiędzy grupą karbonylową (C<sub>4</sub>=O) i blisko położoną grupą metoksyową (O-CH<sub>3</sub>). Pozostałe obszary HBA<sub>S</sub> tworzą się na skutek zmian konformacyjnych, powodujących nakładanie się elektroujemnych obszarów zawierających ugrupowania C=O, O-CH<sub>3</sub> i -O- (6a, 7, 8). Obszary nukleofilowe modulują także liczbę tworzących się obszarów o charakterze aromatyczno-hydrofobowym (AR/H). W przypadku struktur 3-5 rozpoznano także mniej elektroujemne od obszarów HBA regiony grup halogenowych (HAL). Wizualizację przestrzennych relacji pomiędzy rozpoznanymi funkcjami farmakoforowymi (tab. 2) związków 1-9 przedstawiono za pomocą tzw. prostego modelu farmakoforowego (ang. SPM) (rys. 1).

Powyższe proste modele farmakoforowe (A i B) precyzują rozmieszczenie poszczególnych obszarów powinowactwa do obszaru receptorowego. W przypadku pochodnych chromonowych (1-6) (rys. 1A) można wyróżnić trzy obszary powinowactwa: akceptorowy (HBA), rozmyty aromatyczno-hydrofobowy (AR/H<sub>S</sub>) oraz region o zróżnicowanej elektroujemności (HBA<sub>S</sub>, HAL i NI). Reprezentacje farmakoforowe, jakie tworzą ligandy 7-9, są kompilacją obszarów będących akceptorami wiązań wodorowych (HBA<sub>S1</sub>, HBA<sub>S2</sub> i HBA<sub>S3</sub>) oraz aromatyczno/hydrofobowych (AR<sub>1</sub>/H i AR<sub>2</sub>/H). Prosty model farmakoforowy dla furochromonów (rys. 1B, tab. 2) zawiera trzy trójcentrowe reprezentacje farmakoforowe HBA<sub>S1</sub>-AR<sub>1</sub>/H-HBA<sub>S3</sub>, HBA<sub>S1</sub>-AR<sub>2</sub>/H-HBA<sub>S3</sub> i HBA<sub>S1</sub>-HBA<sub>S2</sub>-AR<sub>2</sub>/H. Reprezentacje farmakoforowe, takie jak: HBA-AR<sub>1</sub>/H-HAL, (3-5) HBA-AR<sub>2</sub>/H -HBA<sub>S</sub> (6) i HBA<sub>S1</sub>-AR<sub>2</sub>/H-HBA<sub>S2</sub> (7-8) są symetryczne, co oznacza, że aktywują receptor także reprezentacjami odwróconymi HAL-AR<sub>1</sub>/H-HBA, (3-5) HBA<sub>S</sub>-AR<sub>2</sub>/H-HBA (6) i HBA<sub>S2</sub>-AR<sub>2</sub>/H-HBA<sub>S1</sub> (7-8). Odległości pomiędzy poszczególnymi obszarami trójcentrowych farmakoforów podano w tab. 3.

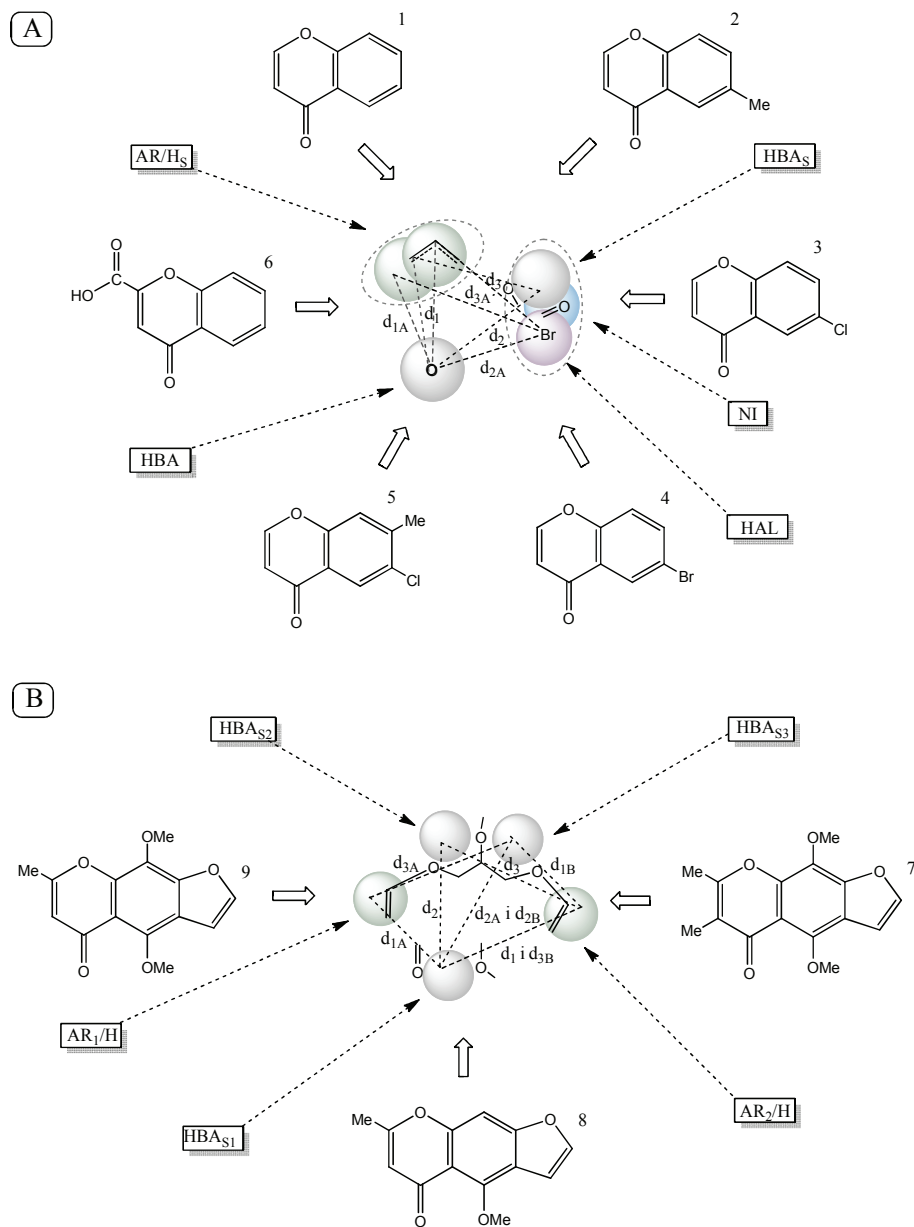


Tabela 2. Identyfikacja funkcji farmakoforowych badanych związków (1-9).  
 Table 2. Identification of pharmacophore features of compounds studied (1-9).

Nazwa/numer związku Name/Compound number	Funkcje farmakoforowe (kolor żółty - AR/H; czerwony - HBA; szary - HAL; niebieski - NI) Pharmacophoric features (yellow - AR/H; red - HBA; grey - HAL; blue - NI)	Rozkład potencjału elektrostatycznego (ESP) z rozpoznanymi funkcjami farmakoforowymi Distribution of electrostatic potential (ESP) with identified pharmacophoric features	Poszczególne reprezentacje far- makoforowe Individual pharmacophore representations
Chromon/1 Chromone/1			HBA-AR/H <sub>5</sub>
6-Metylochromon/2 6-Methylchromone/2			HBA-AR/H <sub>5</sub>
6-Chlorochromon/3 6-Chlorochromone/3			HBA-AR <sub>1</sub> /H-HAL HAL-AR <sub>1</sub> /H-HBA HBA-AR <sub>2</sub> /H-HAL
6-Bromochromon/4 6-Bromochromone/4			HBA-AR <sub>1</sub> /H-HAL HAL-AR <sub>1</sub> /H-HBA HBA-AR <sub>2</sub> /H-HAL

<p>6-Chloro-7-metylochromon/5 6-Chloro-7-methylchromone/5</p>			<p>HBA-AR<sub>1</sub>/H-HAL HAL-AR<sub>1</sub>/H-HBA HBA-AR<sub>2</sub>/H-HAL</p>
<p>Chromokarb/6a Chromocarb/6a</p>			<p>HBA-AR<sub>1</sub>/H-NI</p>
<p>Chromokarb/6b Chromocarb/6b</p>			<p>HBA-AR<sub>2</sub>/H-HBA<sub>S</sub> HBA<sub>S</sub>-AR<sub>2</sub>/H-HBA</p>
<p>Kelina/7 Khellin/7</p>			<p>HBA<sub>S1</sub>-AR<sub>1</sub>/H- HBA<sub>S3</sub> HBA<sub>S1</sub>-AR<sub>2</sub>/H- HBA<sub>S3</sub> HBA<sub>S2</sub>-AR<sub>2</sub>/H- HBA<sub>S1</sub> HBA<sub>S1</sub>-AR<sub>2</sub>/H- HBA<sub>S2</sub></p>
<p>3-Metylokelina/8 3-Metylkhellin/8</p>			<p>HBA<sub>S1</sub>-AR<sub>1</sub>/H- HBA<sub>S3</sub> HBA<sub>S1</sub>-AR<sub>2</sub>/H- HBA<sub>S3</sub> HBA<sub>S2</sub>-AR<sub>2</sub>/H- HBA<sub>S1</sub> HBA<sub>S1</sub>-AR<sub>2</sub>/H- HBA<sub>S2</sub></p>
<p>Wisnagina/9 Visnagin/9</p>			<p>HBA<sub>S1</sub>-AR<sub>2</sub>/H- HBA<sub>2</sub> HBA<sub>S1</sub>-AR<sub>1</sub>/H- HBA<sub>2</sub></p>





Rys. 1. Proponowane trzypunktowe modele farmakoforowe dla receptora smaku gorzkiego.  
 Fig. 1. Suggested 3-point pharmacophore models for bitter taste receptor.

Tabela 3. Odległości pomiędzy obszarami aktywnymi badanych chromonów i furochromonów.

Table 3. Distances amongst areas in chromones and furochromones under study.

Nr związku Compound number	Odległości / Distances [nm]								
	d <sub>1</sub>	d <sub>2</sub>	d <sub>3</sub>	d <sub>1A</sub>	d <sub>2A</sub>	d <sub>3A</sub>	d <sub>1B</sub>	d <sub>2B</sub>	d <sub>3B</sub>
	Chromony / Chromones								
1	0,492	-	-	-	-	-	-	-	-
2	0,493	-	-	-	-	-	-	-	-
3	0,496	0,532	0,546	0,438	0,546	0,697	-	-	-
4	0,492	0,556	0,542	0,443	0,556	0,716	-	-	-
5	0,491	0,543	0,544	0,442	0,544	0,707	-	-	-
6	0,511	0,565	0,495	0,590	0,605	0,673	-	-	-
Średnia odległość Mean distance	0,496	0,549	0,532	0,478	0,563	0,698	-	-	-
	Furochromony / Furochromones								
7	0,526	0,496	0,556	0,436	0,544	0,591	0,367	0,544	0,525
8	0,544	0,495	0,562	0,449	0,551	0,608	0,378	0,551	0,544
9	-	-	-	0,451	0,545	0,701	0,417	0,545	0,487
Średnia odległość Mean distance	0,535	0,496	0,559	0,445	0,547	0,633	0,388	0,547	0,519

Odległości przedstawione w tab. 3. odczytano w przypadku struktur związków 1-9 zoptymalizowanych metodą DFT (B3LYP/6-31G (2d,p)) w wodzie. Wartości średnich odległości (d<sub>1</sub>---d<sub>2</sub>---d<sub>3</sub>) (tab. 3) potwierdzają symetrię rozmieszczenia funkcji farmakoforowych w reprezentacjach, takich jak: HBA-AR<sub>1</sub>/H-HAL, (3-5) HBA-AR<sub>2</sub>/H-HBA<sub>S</sub> (6) i HBA<sub>S1</sub>-AR<sub>2</sub>/H-HBA<sub>S2</sub> (7-8). Pozostałe reprezentacje wyrażone odległościami d<sub>1A</sub>---d<sub>2A</sub>---d<sub>3A</sub> i d<sub>1B</sub>---d<sub>2B</sub>---d<sub>3B</sub> nie wykazują symetrycznego rozmieszczenia obszarów farmakoforowych.

#### *Prognozowanie intensywności smaku gorzkiego ISG ligandów 1-9*

Prognozowanie intensywności smaku gorzkiego (ISG<sub>p</sub>) badanych ligandów przeprowadzono na podstawie tzw. deskryptorów molekularnych. Wszystkie ligandy (1-9) zostały scharakteryzowane deskryptorami określającymi liczbę miejsc aktywnych (LPI – liczba punktowych interakcji) oraz liczbę możliwych wpasowań (reprezentacji farmakoforowych) w teoretyczny obszar receptorowy (LIS – liczba interaktywnych sty-

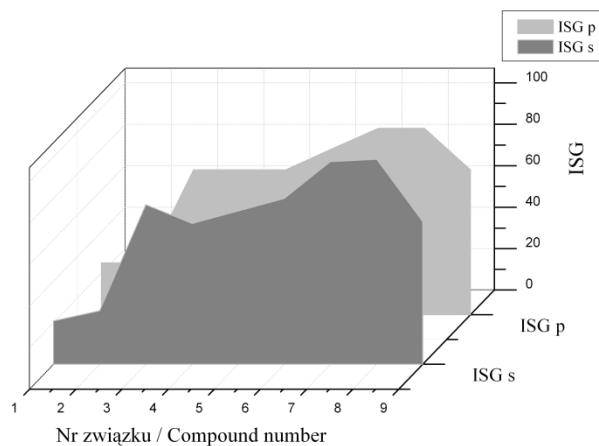
mulacji). Prognozowany indeks smaku gorzkiego wyrażano jako sumę deskryptorów LIS i LPI ( $ISG_p = (\sum LPI + \sum LIS) \times 10$ ).

Tabela 4. Wartości prognozowanych i sensorycznych intensywności smaku gorzkiego (ISG) związków 1-9.

Table 4. Predicted and sensory values of intensity of bitter taste (IBT) of 1-9 compounds.

Numer związku Compound number	Deskryptory molekularne Molecular descriptors		Wartości prognozowane intensywności smaku gorzkiego (ISG <sub>p</sub> )	Wartości sensoryczne intensywności smaku gorzkiego (ISG <sub>s</sub> )
	LPI/LIS	LPI+LIS	Predicted values of intensi- ty of bitter taste (IBT <sub>p</sub> )	Sensory values of intensity of bitter taste (IBT <sub>s</sub> )
1	2/0,5	2,5	25	20,9 ± 3,2
2	2/0,5	2,5	25	25,8 ± 3,3
3	4/3	7	70	80,7 ± 4,2
4	4/3	7	70	68,0 ± 3,9
5	4/3	7	70	74,0 ± 4,1
6a	5/3	8	80	79,6 ± 4,1
6b				79,6 ± 4,1
7	5/4	9	90	97,8 ± 4,4
8	5/4	9	90	98,9 ± 4,5
9	5/2	7	70	68,9 ± 3,9

Wartości prognozowanych i sensorycznych intensywności smaku gorzkiego (ISG<sub>p</sub> i ISG<sub>s</sub>) ligandów 1-9 wykazują porównywalne wartości (tab. 4). Największą prognozowaną i sensoryczną intensywność smaku gorzkiego mają ligandy 7 i 8, odpowiednio: ISG<sub>p7</sub> = 90 i ISG<sub>s7</sub> = 97,8 oraz ISG<sub>p8</sub> = 90 i ISG<sub>s8</sub> = 98,9. Najmniejsze wartości prognozowanej i sensorycznej intensywności smaku gorzkiego mają zaś ligandy 1 i 2, odpowiednio: ISG<sub>p1</sub> = 25 i ISG<sub>s1</sub> = 20,9 oraz ISG<sub>p2</sub> = 25 i ISG<sub>s2</sub> = 25,8. Struktury związków 1 i 2 charakteryzują się brakiem typowego układu trójcentrowego, a ich stabilizacja w receptorze możliwa jest dzięki rozmyciu obszaru AR/H. Układy dwucentrowe wykazują mniej stabilne kotwiczenie od układów trójcentrowych, co przekłada się bezpośrednio na siłę powstającego wrażenia smakowego. Pozostałe ligandy (3-6 i 9) przedstawiają wysokie wartości prognozowanego ISG<sub>p</sub> w zakresie od 70 do 80 i odpowiednio sensoryczny ISG<sub>s</sub> w zakresie od 68,0 do 80,7. Porównanie wartości prognozowanej ISG<sub>p</sub> i sensorycznej ISG<sub>s</sub> przedstawiono na rys. 2.



Rys. 2. Obraz prognozowanych i sensorycznych wartości intensywności smaku gorzkiego związków 1-9.

Fig. 2. Illustration of predicted and sensory values of the intensity of bitter taste (IBT) for compounds 1-9.

Zmiany prognozowanej intensywności smaku gorzkiego ( $ISG_p$ ) związków 1-9 są proporcjonalne do zmian wartości sensorycznych intensywności smaku gorzkiego ( $ISG_s$ ).

### Podsumowanie

Koncepcja prostego modelu farmakoforowego (SPM) umożliwiła sprecyzowanie lokalizacji kluczowych obszarów powinowactwa serii pochodnych chromonów i furochromonów do hipotetycznego receptora. Reprezentacje farmakoforowe wszystkich badanych ligandów są kombinacjami obszarów o właściwościach nukleofilowych i aromatyczno-hydrofobowych. Intensywność smaku gorzkiego można bezpośrednio powiązać z liczbą reprezentacji farmakoforowych charakteryzującą poszczególne badane związki. Ligandy dysponujące kilkoma reprezentacjami farmakoforowymi mają zdolność do szybszej i efektywniejszej aktywacji białka receptorowego bez względu na to, jakim fragmentem skierowane są w obszar kieszeni receptorowej.

Przeprowadzone badania pozwoliły sformułować matematyczną zależność pomiędzy strukturami badanych związków a ich gorzką aktywnością ( $ISG = \sum LPI + \sum LIS$ ). Proste równanie smakowe umożliwia przetworzenie danych zawartych w strukturze przestrzennej badanych ligandów w prognozowaną wartość intensywności smaku gorzkiego. Zidentyfikowane reprezentacje farmakoforowe dowodzą, że najistotniejsza dla stymulacji smakowej jest liczba obszarów pobudzających receptor (LPI) oraz wyróżnik określający ilość wpasowań pojedynczego liganda w hipotetyczny obszar receptorowy (LIS). Intensywność smaku gorzkiego przewidywaną za pomocą

równania smakowego potwierdziły wyniki analiz sensorycznych wodnych roztworów badanych związków.

Zrozumienie istoty różnic aktywności gorzkich związków jest szczególnie istotne do wyjaśnienia zależności pomiędzy składem a sensoryczną jakością gorzkich kompozycji smakowych produktów spożywczych. Eliminacja związków o wysokim ISG i zastąpienie ich mniej aktywnymi ligandami może ograniczyć negatywny wpływ gorzkich składników na jakość żywności oraz poprawić akceptację smakową takiej żywności.

### Literatura

- [1] Behrens M., Foerster S., Staehler F., Raguse J.D., Meyerhof W.: Gustatory expression pattern of the human TAS2R bitter receptor gene family reveals a heterogeneous population of bitter responsive taste receptor cells. *J. Neurosci.*, 2007, **27** (46), 12630-12640.
- [2] Behrens M., Meyerhof W.: Bitter taste receptor research comes of age: from characterization to modulation of TAS2Rs. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2013, **24** (3), 215-21.
- [3] Biarnés X., Marchiori A., Giorgetti A., Lanzara C., Gasparini P., Carloni P., Born S., Brockhoff A., Behrens M., Meyerhof W.: Insights into the binding of Phenyltiocarbamide (PTC) agonist to its target human TAS2R38 bitter receptor. *PLoS One*. 2010; 5(8):e12394. doi: 10.1371/journal.pone.0012394.
- [4] Bielenica A., Kossakowski J.: Zastosowanie metod obliczeniowych do wyznaczania budowy modeli farmakoforowych receptorów 5-ht<sub>1a</sub>, 5-ht<sub>2a</sub> oraz 5-ht<sub>7</sub>. *Biul. Wydz. Farm. WUM*, 2010, **1**, 1-12.
- [5] Caballero J.: 3D-QSAR (CoMFA and CoMSIA) and pharmacophore (GALAHAD) studies on the differential inhibition of aldose reductase by flavonoid compounds. *J. Mol. Graph. Model.*, 2010, **29** (3), 363-371.
- [6] Caicedo A., Roper S.D.: Taste receptor cells that discriminate between bitter stimuli. *Science*. 2001, **291** (5508), 1557-1560.
- [7] Chen X., Kagan J.: Photosensitized cleavage and cross-linking of pBR322 DNA with khellin and visnagin. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 1993, **20** (2-3), 183-189.
- [8] Cortés-Cabrera A., Gago F., Morreale A.: A reverse combination of structure-based and ligand-based strategies for virtual screening. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 2012, **26** (3), 319-327.
- [9] Delwiche J.F., Halpern B.P., Lee M.Y.: A comparison of tip of the tongue and sip and spit screening procedures. *Food Qual. Prefer.*, 1996, **7** (3-4), 293-297.
- [10] Ellenbogen W.C., Rump E.S., Geary P.A., Burke M.: Khellin. Part II. Method for the determination of two principles isolated from *Ammi visnaga* Lam. *J. Am. Pharm. Assoc.*, 1951, **40** (8), 287-290. doi: 10.1002/jps.3030400609.
- [11] Frank O., Blumberg S., Kunert C., Zehentbauer G., Hofmann T.: Structure determination and sensory analysis of bitter-tasting 4-vinylcatechol oligomers and their identification in roasted coffee by means of LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55** (5), 1945-1954.
- [12] Frank O., Blumberg S., Krümpel G., Hofmann T.: Structure determination of 3-O-caffeoyl-epiquinide, an orphan bitter lactone in roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56** (20), 9581-9585.
- [13] Jasiczak J., Kikut-Ligaj D.: Prediction of the Bitter Taste. Part III. Methodology. In: *Current Trends in Commodity Science*. Ed. R. Zieliński, Wyd. AE, Poznań, 2007, **2**, 855-862.
- [14] Kikut-Ligaj D., Jasiczak J.: The application of molecular mould of bitter taste receptor in combination with the QSAR method for prediction of taste. Part II. *Ann. Polish Chem. Soc.*, 2004, **3**, 675-679.

- [15] Kikut-Ligaj D., Jasiczak J.: Simple pharmacophore model for the prediction of bitter taste of caffeine derivatives. In: *New trends in food analytics*. Red. M. Szoltysik, A. Dąbrowska, Wyd. Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław 2011, pp. 85-98.
- [16] Kim J.H., Odutola J.A., Popham J., Jones L., von Laven S.: Tautomeric energetics of xanthine oxidase substrates: xanthine, 2-oxo-6-methylpurine, and lumazine. *J. Inorg. Biochem.*, 2001, **84** (1-2), 145-150.
- [17] Klimacka-Nawrot E., Suchecka, W., Błońska-Fajfrowska B.: Przydatność gustometrii swoistej do oceny sprawności zmysłu smaku. *Wiad. Lek.*, 2007, **60** (9-10), 409-414.
- [18] Kreppenhofer S., Frank O., Hofmann T.: Identification of (furan-2-yl) methylated benzene diols and triols as a novel class of bitter compounds in roasted coffee. *Food Chem.*, 2011, **126** (2), 441-449.
- [19] Kuhn C., Bufe B., Batram C., Meyerhof W.: Oligomerization of TAS2R bitter taste receptors. *Chem. Senses*, 2010, **35** (5), 395-406.
- [20] Lauria A., Ippolito M., Fazzari M., Tutone M., Di Blasi F., Mingoia F., Almerico AM.: IKK-beta inhibitors: an analysis of drug-receptor interaction by using molecular docking and pharmacophore 3D-QSAR approaches. *J. Mol. Graph. Model.*, 2010, **29** (1), 72-81.
- [21] Martin Y.C.: Pharmacophore Modeling: 1-Methods. *Comprehensive Med. Chem. II*, 2007, **406**, 119-147.
- [22] Meyerhof W., Batram C., Kuhn C., Brockhoff A., Chudoba E., Bufe B., Appendino G., Behrens M.: The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chem. Senses*, 2010, **35** (2), 157-170.
- [23] Nunes S.C., Jesus Lopes A.J., Ermelinda M., Eusébio S., Redinha J.S.: Conformational preferences of 2-isopropylaminoethanol in aqueous solution using the CPCM continuum solvation model. *J. Mol. Struct.*, 2008, **867** (1-3), 101-106.
- [24] PN-ISO 8586-1(2):1998. Analiza sensoryczna. Ogólne wytyczne wyboru, szkolenia i monitorowania oceniających. Wybrani oceniający.
- [25] PN-ISO 8589:1998. Analiza sensoryczna. Ogólne wytyczne dotyczące projektowania pracowni analizy sensorycznej.
- [26] PN-ISO 6658:1998. Analiza sensoryczna. Metodologia. Wytyczne ogólne.
- [27] Reed D.R., Toshiko T., McDaniel A. H.: Diverse tastes: Genetics of sweet and bitter perception. *Physiol Behav.*, 2006, **88** (3), 215-226.
- [28] Reed D.R., Knaapila A.: Genetics of taste and smell: poisons and pleasures. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 2010, **94**, 213-240.
- [29] Reichling C., Meyerhof W., Behrens M.: Functions of human bitter taste receptor depend on N-glycosylation. *J. Neurochem.*, 2008, **106** (3), 1138-1148.
- [30] Seidel T., Ibis G., Bendix F., Wolber G.: Strategies for 3D pharmacophore-based virtual screening. *Drug Discov. Today Technol.*, 2010, **7** (4), 221-228.
- [31] Stevens D.A., Dooley D.A., Laird J.D.: Explaining individual differences in flavour perception and food acceptance. Ed. D.M.H. Thomson. *Food Acceptability*, Elsevier Applied Science, London 1988.
- [32] Takano Y., Houk K.N.: Benchmarking the Conductor-like Polarizable Continuum Model (CPCM) for aqueous solvation free energies of neutral and ionic organic molecules. *J. Chem. Theory Comput.*, 2005, **1** (1), 70-77.
- [33] Temussi P.A.: Sweet, bitter and umami receptors: a complex relationship. *Trends Biochem. Sci.*, 2009, **34** (6), 296-302.
- [34] Travers S.P., Geran L.C.: Bitter-responsive brainstem neurons: Characteristics and functions. *Physiol. Behav.*, 2009, **97** (5), 592-603.
- [35] Wolber G., Seidel T., Bendix F., Langer T.: Molecule-pharmacophore superpositioning and pattern matching in computational drug design. *Drug Discov. Today*, 2008, **13** (1-2), 23-29.



- [36] Yarmolinsky D.A., Zuker C.S., Ryba N.J.: Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell*, 2009, **139** (2), 234-244.
- [37] Chen Z., Baker N.A., Wei G.W.: Differential geometry based solvation model I: Eulerian formulation. *J. Comput. Phys.*, 2010, **229** (22), 8231-8258.

### PREDICTING BITTER TASTE OF CHROMONES AND FUROCHROMONES ON THE BASIS OF SIMPLE PHARMACOPHORE MODEL (SPM)

#### S u m m a r y

Chromones and furochromones are characterized by the high biological activity. Derivatives that belong to the groups of those chemical compounds show diverse pharmacological effects. Bitter taste is one of the more important sensory indicators to determine qualitative properties of food. The studies on bitter taste play a key role in accounting for complex issues involved in the acceptance (or non-acceptance) of flavour compositions of many food products. In order to assess the bitter taste activity of the compounds under study, the so-called 3D pharmacophore models were applied. A number of "conventional" pharmacophoric functions were analyzed, such as: acceptors and donors of hydrogen bonds (HBA and HBD), areas of halogen groups (HAL), and aromatic/hydrophobic groups (AR/H). The pharmacophoric representations of the ligands studied have areas of both nucleophilic and aromatic/hydrophobic properties. The intensity of bitter taste (IBT) of the compounds analyzed depends directly on the number of pharmacophore representations. The ligands with several pharmacophore representations were found to activate the receptor protein quicker and more effectively. It was also proved that the most significant for taste stimulation were the number of areas stimulating the receptor (NPI- number of point interactions) and the indicator to determine the number of possible alignments of a single ligand into a hypothetical receptor area (NIS- number of interactive stimulations). The NPI and NIS parameters are molecular descriptors defining the affinity of the compounds studied to the receptor. The descriptors formulating the taste equation made it possible to determine the predicted values of bitter taste activity. The predicted values of the intensity of bitter taste (IBT<sub>p</sub>) of the compounds under study were successfully verified by sensory analyses of aqueous solutions of the study compounds (IBT<sub>s</sub>).

**Key words:** chromones, furochromones, bitter taste perception, bitter ligands, simple pharmacophore model (SPM) 