

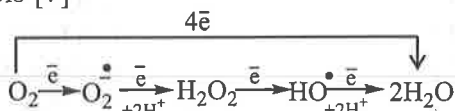
Т.М.ІВЛЄВА, мол. наук. співробітник, А.М.НІКОЛАЄВСЬКИЙ, канд. хім. наук, проф., О.І.ХИЖАН, канд. хім. наук, доц., О.П.КНИГА, ст. наук. співробітник, Ю.С.ЄФРЕМОВА

Донецький національний університет

ВЗАЄМОДІЯ ФЕНОЛЬНИХ АНТИОКСИДАНТІВ З АКТИВНИМИ ФОРМАМИ КИСНЮ

Ключові слова: перекисне окиснення ліпідів, активні форми кисню, фенольні антиоксиданти

Токсична дія активних форм кисню (АФК) на компоненти клітин відома ще з моменту їх виявлення в живих організмах, але і сьогодні проводять численні дослідження з питань механізму виникнення [3, 7] та можливості дезактивації АФК [11–15]. Різні форми АФК, до яких відносять радикал-аніон супероксид (O_2^-), пероксид водню (H_2O_2) та найбільш активний радикал — гідроксил (OH^\bullet), в організмі утворюються на різних стадіях неповного відновлення молекули O_2 за наведеною нижче схемою [7]



Донорами електрона в організмі можуть бути, наприклад, Fe^{2+} , Cu^+ , семіхінони і т.д.

Головним проявом негативної дії АФК є активація перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), кінцевим результатом якого є руйнування ліпідного біслою біологічної мембрани з утворенням токсичних продуктів [5].

Для гальмування ПОЛ та лікування хвороб, пов'язаних з ним, у медичній практиці широко застосовують фенольні антиоксиданти (АО) різної будови. Зрозуміло, що головною метою антиоксидантної терапії є зупинення небажаних окиснювальних перетворень в організмі на початкових стадіях. Отже, найефективнішими АО в такій терапії будуть ті, що запобігають ПОЛ шляхом дезактивації АФК. Тому метою даної роботи стало вивчення взаємодії ряду фенольних АО з АФК.

Матеріали та методи дослідження

Гідрохінон, пірокатехін, α -нафтол, ванілінову кислоту, кверцетин очищали шляхом сублимації; іонол — багаторазовою перекристалізацією із етилового спирту, а галову, протокатехову, бузкову, ферулову, кавову кислоти, етиловий ефір галової кислоти (ЕЕГК) — з води з подальшим висушуванням у вакуумі. Люмінол (H_2L) (гідразид 3-амінофталевої кислоти), етилендіамінтетраацетат натрію (ЕДТА), пероксид водню, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 марки «ч.д.а» застосовували без додаткового очищення. Для приготування всіх розчинів використовували дистильовану воду.

Світіння, що виникало в системі $H_2O_2-Fe^{2+}$ —люмінол, фіксували за допомогою хемілюмінесцентної установки, принципову схему якої описано в літературі [9]. Усі дослідження проводили за умов, наближених до фізіологічних, тобто при температурі 310 К у фосфатному буфері при рН 7,4 ($KH_2PO_4 - K_2HPO_4$). Фенольні сполуки вводили до реакційної суміші, попередньо розчинивши в ацетоні. Окремими дослідженнями доведено, що наявність ацетону в системі не впливала на інтенсивність хемілюмінесцентного (ХЛ) світіння.

Результати дослідження та їх обговорення

Хемілюмінесценція, яка виникає в модельній системі $\text{H}_2\text{O}_2\text{—Fe}^{2+}$ —люмінол, є доступним способом, за допомогою якого можна фіксувати радикальні форми кисню [15]. При невисоких рН люмінол вступає в послідовні реакції спочатку з гідроксильним радикалом, а потім — з радикалом супероксиду, внаслідок чого утворюється збуджена молекула продукту, при переході якої із збудженого в основний стан вивільняється енергія, яка і зумовлює ХЛ-світіння [1, 4].

Радикальні форми кисню в досліджуваній системі виникають при каталітичному розкладі пероксиду водню при $\text{pH} > 7$ за описаною схемою [6].

Для оптимізації умов проведення експерименту було досліджено вплив на інтенсивність ХЛ-світіння порядку введення реагентів до реакційної суміші (рис. 1),

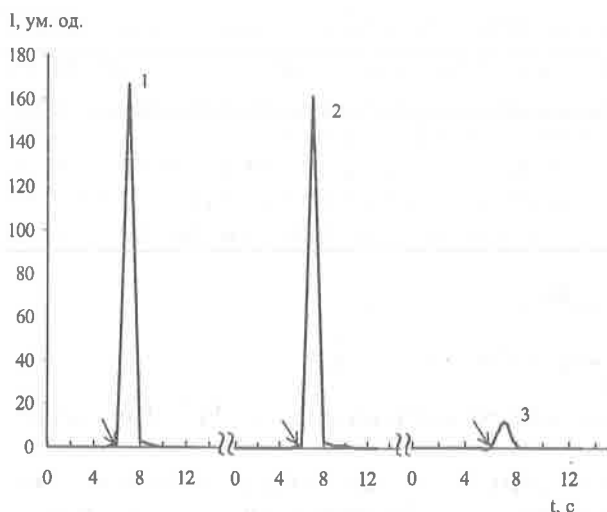


Рис. 1. Типові хемілюмінесцентні криві в системі $\text{H}_2\text{O}_2\text{—Fe}^{2+}$ —люмінол залежно від порядку введення до системи реагентів:

1 — до суміші H_2O_2 з люмінолом додали Fe^{2+} ; 2 — до суміші Fe^{2+} з люмінолом додали H_2O_2 ; 3 — до суміші H_2O_2 з Fe^{2+} додали люмінол. $C_{\text{Fe}^{2+}} = 5 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 1,25 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $C_{\text{H}_2\text{L}} = 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $T = 310$ К. Стрілками вказано час введення до системи останнього компонента суміші

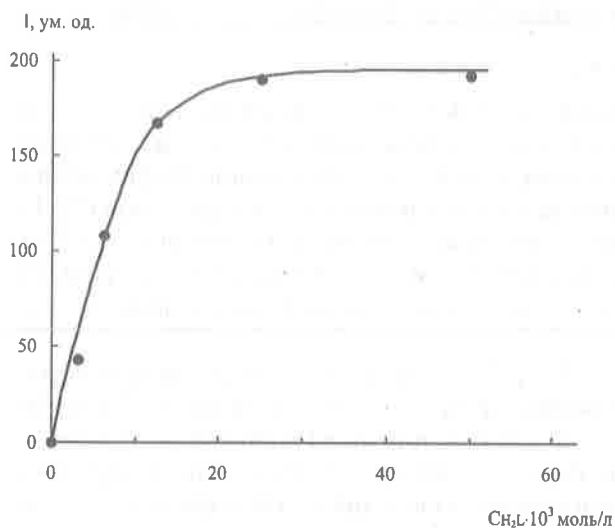


Рис. 2. Вплив концентрації люмінолу на інтенсивність ХЛ-світіння в системі $\text{H}_2\text{O}_2\text{—Fe}^{2+}$ —люмінол $C_{\text{Fe}^{2+}} = 5 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $T = 310$ К

концентрації люмінолу (рис. 2), пероксиду водню (рис. 3) та каталізатора (Fe^{2+}) (рис. 4).

Якщо попередньо змішати люмінол з H_2O_2 або з Fe^{2+} , світіння в системі не спостерігається (рис. 1). Це свідчить про відсутність за даних умов безпосередньої взаємодії між H_2L та H_2O_2 або H_2L та Fe^{2+} . При введенні до системи третього компонента, Fe^{2+} або H_2O_2 відповідно, спостерігається різкий, з приблизно однаковою інтенсивністю сплеск світіння, який триває 2—3 с. Якщо ж попередньо змішати H_2O_2 з Fe^{2+} , а потім додати люмінол, у системі не виникає інтенсивного світіння. Відомо, що реакція між H_2O_2 та Fe^{2+} відбувається дуже швидко [15], а час життя гідроксильного радикала у водному середовищі становить приблизно 10^{-4} с. Відповідно отримані таким чином радикали в системі зникали ще за час змішування H_2O_2 з Fe^{2+} , до того як у систему додали люмінол.

Інтенсивність ХЛ світіння зростає з підвищенням концентрації люмінолу і при досягненні $1,25 \cdot 10^{-4}$ моль/л H_2L суттєво не змінюється (рис. 2), що, ймовірно, пов'язано з обмеженою розчинністю люмінолу у водних розчинах [8]. Тому проведення експерименту при більш високих концентраціях люмінолу не є доцільним.

Зі збільшенням концентрації H_2O_2 збільшується і кількість радикалів, які утворюються під

час його взаємодії з Fe^{2+} , що призводить до зростання інтенсивності світіння в системі. При концентрації пероксиду водню вище за $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л спостерігається менш стрімке зростання інтенсивності ХЛ-світіння, що пов'язано з утворенням значної кількості радикалів при високому вмісті H_2O_2 в системі, які за таких умов інтенсивно рекомбінують між собою.

Залежність інтенсивності ХЛ-світіння від концентрації Fe^{2+} має вигляд кривої з максимумом при $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Зменшення інтенсивності світіння при подальшому збільшенні вмісту іонів заліза, ймовірно пов'язано з їх взаємодією з радикалами.

Виходячи з отриманих результатів, було визначено оптимальні умови проведення експерименту, за яких у системі спостерігається найбільш інтенсивне світіння. Пероксид водню та люмінал змішували так, щоб їх кінцева концентрація в розчині становила $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л та $1,25 \cdot 10^{-4}$ моль/л, відповідно, додавали необхідну кількість розчину фенольної сполуки в ацетоні або таку саму кількість ацетону в контрольних дослідах (максимальний вміст ацетону в розчині не перевищував 4% і не впливав на закономірності перебігу процесу). Останнім в реакційну суміш вводили розчин Fe^{2+} , кінцева концентрація якого в реакційній суміші становила $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Одразу після введення катализатора фіксували інтенсивність ХЛ-світіння.

За наявності водорозчинних фенольних сполук спостерігається зменшення інтенсивності світіння

(рис. 5). За параметр, що характеризує активність АО в реакціях з АФК, було обрано концентрацію антиоксиданту, при якій інтенсивність світіння зменшується на 50% ($C_{50\%}$). Чим менше значення $C_{50\%}$, тим активніше взаємодіє антиоксидант з АФК. Отже (таблиця), найактивнішими в системі були кверцетин, рутин, протокатехова кислота та α -нафтол, для яких $C_{50\%}$ становить від $6,0 \cdot 10^{-6}$ моль/л до $7,0 \cdot 10^{-6}$ моль/л відповідно. Навпаки, жиророзчинний іонол активності не виявив, що, ймовірно, пов'язано з його низькою розчинністю у водній фазі.

Зниження інтенсивності ХЛ-світіння в системі $\text{H}_2\text{O}_2 - \text{Fe}^{2+}$ - люмінал може бути пов'язано з взаємодією фенолів з радикальними формами кисню [10]. Здат-

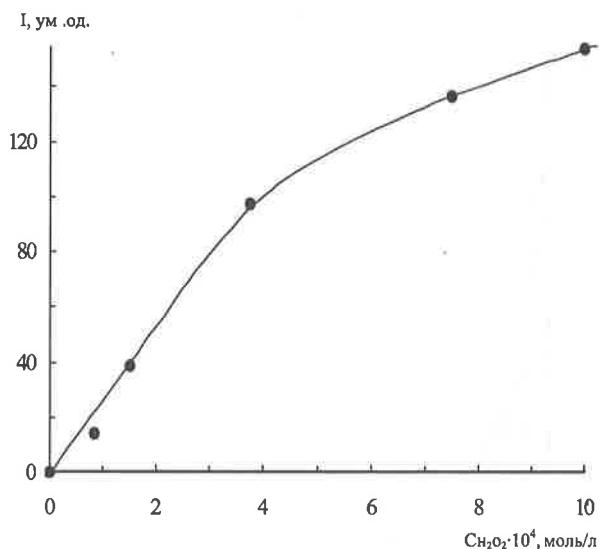


Рис. 3. Залежність інтенсивності ХЛ-світіння в системі $\text{H}_2\text{O}_2 - \text{Fe}^{2+}$ - люмінал від вмісту перекису водню. $C_{\text{Fe}^{2+}} = 5 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $C_{\text{люм}} = 1,25 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $T = 310$ К

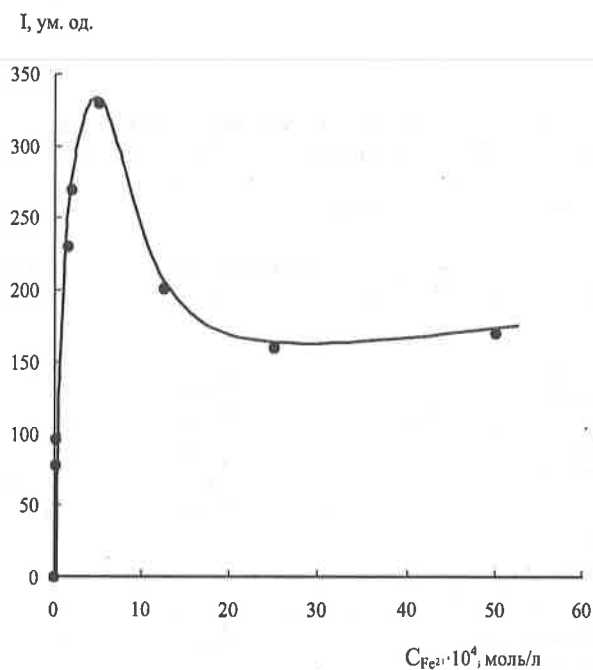


Рис. 4. Вплив концентрації Fe^{2+} на інтенсивність ХЛ-світіння в системі $\text{H}_2\text{O}_2 - \text{Fe}^{2+}$ - люмінал. $C_{\text{люм}} = 1,25 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $T = 310$ К

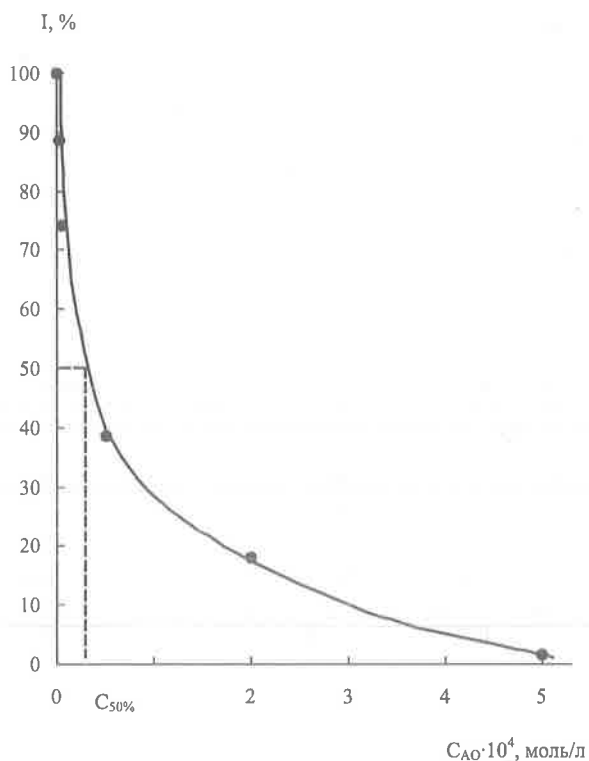


Рис. 5. Вплив гідрохінону на інтенсивність хемілюмінесцентного ХЛ-світіння в системі H_2O_2 —люмінол— Fe^{2+} . $C_{H_2L} = 1,25 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $C_{H_2O_2} = 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $C_{Fe^{2+}} = 5 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $T = 310$ К

Здатність фенольних антиоксидантів зменшувати інтенсивність ХЛ-світіння ($C_{50\%}$) в системі H_2O_2 —люмінол— Fe^{2+} . $C_{H_2L} = 1,25 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $C_{H_2O_2} = 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $C_{Fe^{2+}} = 3 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $T = 310$ К

Антиоксидант	$C_{50\%} \cdot 10^6$ моль/л	D_{O-H} , кДж·моль ⁻¹
ЕДТА	100,0	-
Ванілінова кислота	75,9	332
Гідрохінон	24,8	350
Пірокатехін	23,5	338
БЕГК	21,0	301
Галова кислота	18,3	302
Кавова кислота	15,5	311
Бузова кислота	12,7	314
Ферулова кислота	10,6	317
Протокатехова кислота	7,0	318
Рутин	6,5	320
α -Нафтол	6,4	341
Кверцетин	6,0	317
Іонол	Не виявив активності	306

*Літературні дані [2, 10].

$C_{50\%}$ для ЕДТА на 1—2 порядки вище ніж для фенолів. Це свідчить, що зв'язування іонів заліза деякими фенольними сполуками є важливою, проте не єдиною їх функцією у боротьбі з активними формами кисню.

Таким чином, активність фенолів відносно до АФК пов'язана з кількома факторами: розчинністю у воді, здатністю легко віддавати атом водню в реакціях з радикалами; стабільністю фенокисильного радикала, що утворюється з фенолу;

ність фенолів віддавати атом водню в радикальних реакціях в першу чергу залежить від міцності O—H зв'язку (D_{O-H}). Однак, як видно з даних, наведених у таблиці, не спостерігається чіткої залежності між ефективністю фенольних сполук у даній системі та D_{O-H} , що, ймовірно, пов'язано з різною активністю у водній фазі фенокисильних радикалів.

До того ж, о-заміщені фенольні сполуки можуть утворювати міцні комплекси з іонами металів, у складі яких Fe^{2+} не здатний каталізувати розпад пероксиду водню з утворенням радикальних продуктів [5, 10]. Щоб оцінити внесок комплексоутворення фенолів з Fe^{2+} у зниження інтенсивності ХЛ-світіння, у досліджуваній системі, було перевірено дію типового комплексоутворювача — етилендіамінтетраацетату натрію (ЕДТА). Ця сполука також зменшує інтенсивність світіння у системі, але в меншому ступені, ніж фенольні АО (див. таблицю).

можливістю утворення комплексів між о-заміщеними фенольними сполуками та іонами заліза, що призводить до дезактивації Fe^{2+} .

1. Бабко А.К., Дубовенко Л.И., Луковская Н.М. Хемиллюминесцентный анализ. — К., 1966. — 251 с.
2. Белая Н.И., Овчарова О.Ю., Николаевский А.Н. и др. // Теорет. и эксперим. химия. — 2004. — Т. 40, № 4. — С. 227–232.
3. Брусков В.И., Масалимов Ж.К., Черников А.В. // ДАН — 2002. — Т. 384, № 6. — С. 821–824.
4. Владимиров Ю.А. // Биофизика. — 1987. — Т. 32, № 5. — С. 830–844.
5. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М., 1972. — 252 с.
6. Долгоплоск Б.А., Тунякова Е.И. Окислительно-восстановительные системы как источники свободных радикалов. — М.:Наука, 1972. — 240 с.
7. Кулинский В.И. // Соросовский образовательный журнал. — 1999. — № 1. — С. 2–7.
8. Химическая энциклопедия: в 5 т. — 1990. — Т. 2. — 671 с.
9. Эмануэль Н.М., Денисов Е.Т., Майзус З.К. Цепные реакции окисления углеводов в жидкой фазе. — М.:Наука, 1965. — 375 с.
10. Denisov E.T., Afanas'ev I.V. Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology. — CRC Press, 2005. — 992 p.
11. Hua C., Ming-Juan Sh., Rong M. at al. // Photochemistry and photobiology. — 2004. — Vol. 79, № 3. — P. 233–241.
12. Kahi R., Weimann A., Weinke S. at al. // Arch Toxicol. — 1987. — Vol. 60. — P. 158–162.
13. Novas M.J., Jimenez A. M., Asuero A.G. // J. of Analytical Chemistry. — 2004. — Vol. 59, № 1. — P. 84–86.
14. Shi M.-J., Aung M., Dong Y.-P. at al. // Guang pu. — 2007. — Vol. 27, № 10. — P. 1945–1950.
15. Zhiyong Ch., Guantano Y., Yuanzong L. // Anal. Bioanal. Chem. — 2003. — Vol. 375. — P. 375–380.

Надійшла до редакції 19.01.2010.

Т.Н.Ивлева, А.Н. Николаевский, Е.И. Хижан, О.П. Книга, Ю.С.Ефремова

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФЕНОЛЬНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ С АКТИВНЫМИ ФОРМАМИ КИСЛОРОДА

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, активные формы кислорода, фенольные антиоксиданты

Изучено взаимодействие фенольных соединений с активными формами кислорода хемиллюминесцентным методом в системе $H_2O_2-Fe^{2+}$ -люминол. Эффективность фенольных соединений в данной системе зависит от их растворимости в воде, антирадикальных свойств, стабильности фенокислородных радикалов, способности к комплексообразованию. Наиболее активными в данной системе были кверцетин, α -нафтол, рутин и протокатеховая кислота.

T.M.Ioleva, A.M.Nikolaevskiy, O.I.Khyzhan, O.P.Kniga, J.S.Efremova

INTERACTION OF PHENOLIC ANTIOXIDANTS WITH THE REACTIVE OXYGEN SPECIES

Key words: lipid peroxidation, active oxygen species, phenolic antioxidants

SUMMARY

Interaction of phenolic compounds with the reactive oxygen species was investigated by the chemiluminescent method in the luminol- $H_2O_2-Fe^{2+}$ system. Action of phenolic compounds related with their solubility in water, radical scavenger properties, stability if phenoxyl radical, complexation in system. Kwercetin, α -naphthol, rutin, protocatexic acid were the most active in this system.