

УДК 547.565:544.421:544.43

СИНЕРГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ КОМПОЗИЦИЙ КВЕРЦЕТИНА С АМИНОКИСЛОТАМИ АЛИФАТИЧЕСКОГО РЯДА

Н.И. Белая, А.В. Белый, К.П. Шалюто

Донецкий национальный университет, г. Донецк

Проведено исследование совместного антирадикального действия кверцетина с некоторыми аминокислотами алифатического ряда в реакции со стабильным радикалом 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразилом (DPPH[•]) при T=293±2 К в смеси этанол-фосфатный буфер (1:1) при pH=7,35. Максимальный синергический эффект проявили смеси кверцетина с аланином и валином при соотношении 80:20 % в реакции как с азот-, так и кислородцентрированными радикалами. Полученные композиции из природных соединений позволят добиваться максимального защитного эффекта при меньшей концентрации антиоксиданта и могут использоваться как потенциально безопасные средства коррекции интенсивности свободно-радикальных процессов.

Ключевые слова: синергизм, антирадикальная активность, 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразил, кверцетин, аминокислота.

Природные антиоксиданты (АО), поступая в организм человека в составе растительной пищи, проявляют положительный эффект, как правило, в больших дозах, поскольку их молекулы разрушаются в реакции со свободными радикалами [1; 2]. С другой стороны, некоторые соединения данной группы характеризуются двойным действием, т. е. антиоксидантный эффект при повышении некоторой предельной величины сменяется прооксидантным [3]. Для того чтобы антиоксидант эффективно работал в небольших количествах, необходимо присутствие восстановителей, которые будут переводить его в активное состояние.

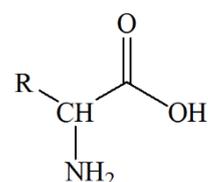
Эффективность действия природных фенолов может быть повышена путем применения добавок, обладающих свойствами синергистов. К соединениям такого типа относятся прежде всего некоторые неорганические и органические кислоты, такие, как фосфорная, аскорбиновая, лимонная кислоты, а также некоторые аминокислоты [4–6]. Такой функциональный синергизм позволит добиться максимального защитного эффекта и высокой стабильности препарата при меньшей концентрации антиоксидантов.

В связи с этим актуален поиск синергических композиций, сочетающих в себе относительно низкие количества АО и веществ, не подавляющих самостоятельно радикальные процессы, но способных

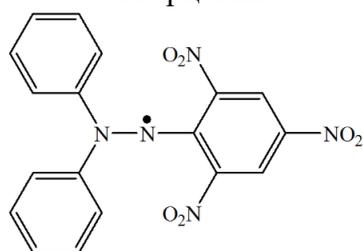
значительно усиливать действие ингибиторов окисления в процессах *in vivo* и *in vitro*.

Целью данной работы является исследование совместного антирадикального действия кверцетина с некоторыми аминокислотами алифатического ряда в реакции со стабильным радикалом 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразилом (DPPH[•]) при T=293±2 К в смеси этанол-фосфатный буфер (1:1) при pH=7.35.

Исследования проводили с использованием реактивов фирмы «Aldrich-Sigma» (Германия): антиоксиданта растительного происхождения группы флавонолов – кверцетина (PhOH), искусственного стабильного радикала DPPH[•], в качестве синергистов – аминокислоты алифатического ряда (AmNH₂).



аминокислоты:



DPPH[•]

- 1 – R=H – глицин;
- 2 – R=CH₃ – аланин;
- 3 – R=CH(CH₃)₂ – валин;
- 4 – R=CH₂CH(CH₃)₂ – лейцин;
- 5 – R=CH(CH₃)CH₂CH₃ – изолейцин.

Реакция DPPH[•] с кверцетином, аминокислотами и их смесями в разных соотношениях изучалась в смешанном растворителе этанол-фосфатный буфер (1:1) при физиологическом pH=7.35 и T=293±2 К. Установлено, что при добавлении в спиртовой раствор DPPH[•] фосфатного буфера максимум поглощения УФ-спектра наблюдается при длине волны λ=520 нм и интенсивность его сохраняется постоянной в течение одного часа, поэтому рабочий этанольно-буферный раствор радикала готовили непосредственно перед проведением опыта.

Исследования проводили в области начальных концентраций реагирующих веществ от 10⁻⁴ до 10⁻⁵ моль·л⁻¹. Растворы кверцетина, аминокислот и DPPH[•] смешивали в разных соотношениях, затем методом УФ-спектроскопии (СФ-2000, Россия) измеряли их оптическую плотность и с помощью определенного молярного

коэффициента экстинкции ($\varepsilon=1.26 \cdot 10^3 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{мм}^{-1}$) рассчитывали концентрации DPPH^\bullet в заданный момент времени.

Было установлено, что кверцетин активно реагирует с радикалом, превращая его в неактивное молекулярное соединение – 2, 2'-дифенил-1-пикрилгидразин (DPPH-H):



Аминокислоты же крайне слабо окисляются гидразильным радикалом (рис. 1).

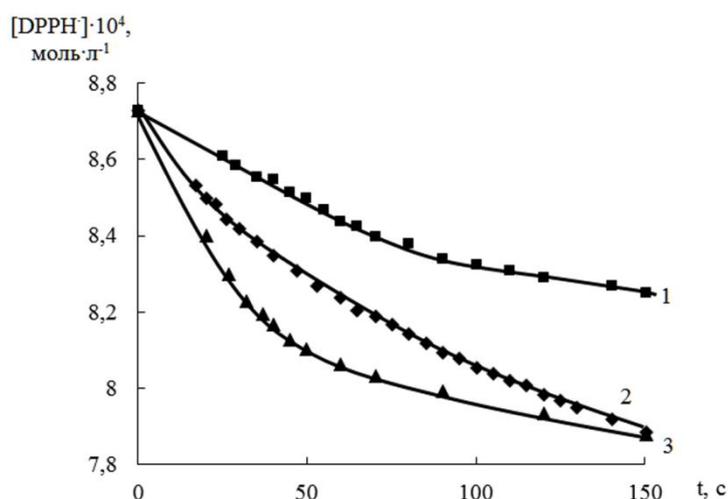


Рис. 1. Кинетические кривые расходования DPPH^\bullet в реакции с аминокислотами ($C=7,9 \cdot 10^{-4} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$): 1 – аланин; 2 – глицин; 3 – валин. Растворитель – этанол-фосфатный буфер (1:1), $\text{pH}=7.35$ и $T=293 \pm 2 \text{ К}$

Линеаризация начальных участков полученных кинетических кривых в координатах $1/[\text{DPPH}^\bullet]$ от t свидетельствует (рис. 2), что исследуемая реакция имеет 2-й общий порядок. В программе Statistica Demo 6.0 методом линейного регрессионного анализа [7] по величине углового параметра регрессии определены константы скорости реакции DPPH^\bullet с кверцетином (k) и аминокислотами при pH среды 7.35 и $T=293 \pm 2 \text{ К}$.

Видно (табл. 1), что величина k как характеристика антирадикальной активности (АРА) веществ имеет крайне низкое значение для AmNH_2 . Возможно, это связано с тем, что при физиологических pH аминокислоты действуют в виде достаточно стабильных цвиттер-ионов.

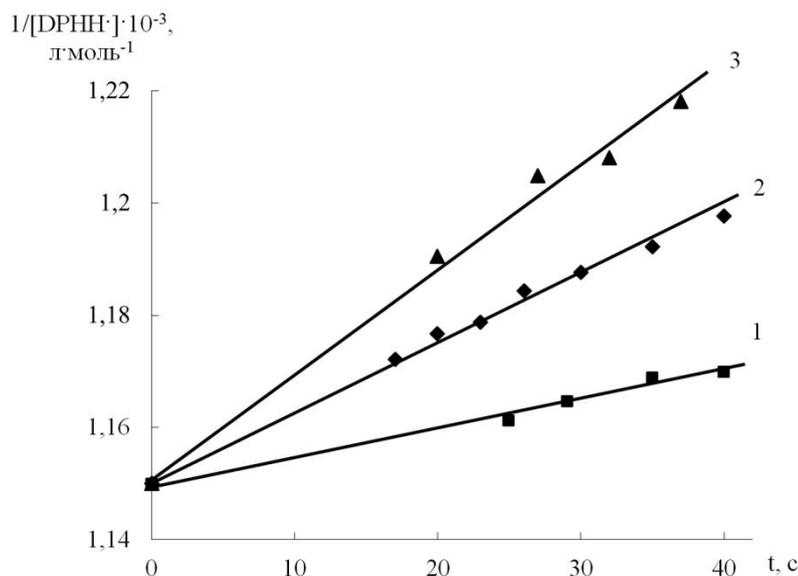


Рис. 2. Анаморфозы кинетических кривых расходования DPPH• (рис. 1) в реакции с аминокислотами ($C=7,9 \cdot 10^{-4}$ моль·л⁻¹): 1 – аланин; 2 – глицин; 3 – валин. Растворитель – этанол-фосфатный буфер (1:1), pH=7,35 и T=293±2 К

Таблица 1
 Величины констант скоростей (k , л·моль⁻¹·с⁻¹) реакции радикала DPPH• с кверцетином и аминокислотами алифатического ряда в этанольно-фосфатном буфере (1:1) при pH=7,35 и T=293±2 К

№	Соединение	$k_{AmNH_2} (k_{PhOH})$	$\frac{k_{PhOH}}{k_{AmNH_2}}$
1	Кверцетин	$(1.26 \pm 0.05) \cdot 10^3$	–
2	Глицин	1.28 ± 0.05	$1 \cdot 10^3$
3	Аланин	0.64 ± 0.03	$2 \cdot 10^3$
4	Валин	0.66 ± 0.03	$2 \cdot 10^3$
5	Лейцин	0.72 ± 0.03	$1 \cdot 10^3$
6	Изолейцин	0.91 ± 0.04	$1 \cdot 10^3$
7	н-Бутиламин	0.96 ± 0.04	$1 \cdot 10^3$

По данным расчета методом QSPR в программе Marvin 6.1.11. [8] при pH=7.35 изученные кислоты практически полностью (до 99%) находятся в форме цвиттер-ионов (табл. 2), которые способны проявлять как кислотные, так и основные свойства.

Таблица 2

Распределение ионных форм аминокислот при pH=7.35 и T=293±2 К

№	Соединение	[$^-OOC-Am-NH_3^+$],%	[$^-OOC-Am-NH_2$],%
1	Глицин	98.6	1.4
2	Аланин	99.2	0.8
3	Валин	99.4	0.6
4	Лейцин	99.2	0.8
5	Изолейцин	99.4	0.6

При этом ответственной за АРА является амино-, а не карбоксильная группа. Для проверки этого утверждения проводили специальные опыты (рис. 3) с уксусной кислотой, где функциональной группой является $-COOH$, и н-бутиламиноом – с H_2N -группой.

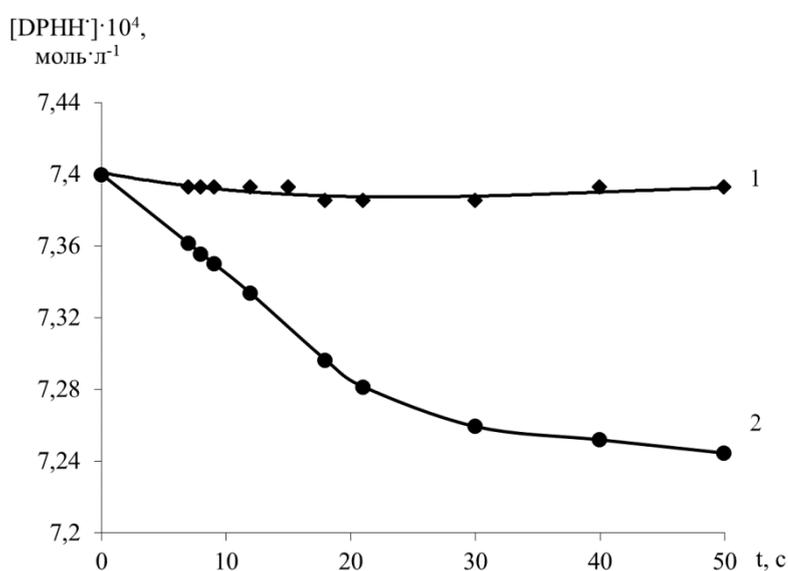


Рис. 3. Кинетические кривые расходования радикала в реакции с уксусной кислотой (1) ($C = 7.4 \cdot 10^{-4}$ моль·л⁻¹) и н-бутиламиноом (2) ($C = 7.4 \cdot 10^{-4}$ моль·л⁻¹). Растворитель – этанол-фосфатный буфер (1:1), pH=7.35, T=293±2 К

Видно, что в реакции с $DPNH^{\bullet}$ уксусная кислота не проявила АРА, а у н-бутиламина она сравнима с активностью аминокислот (табл. 1).

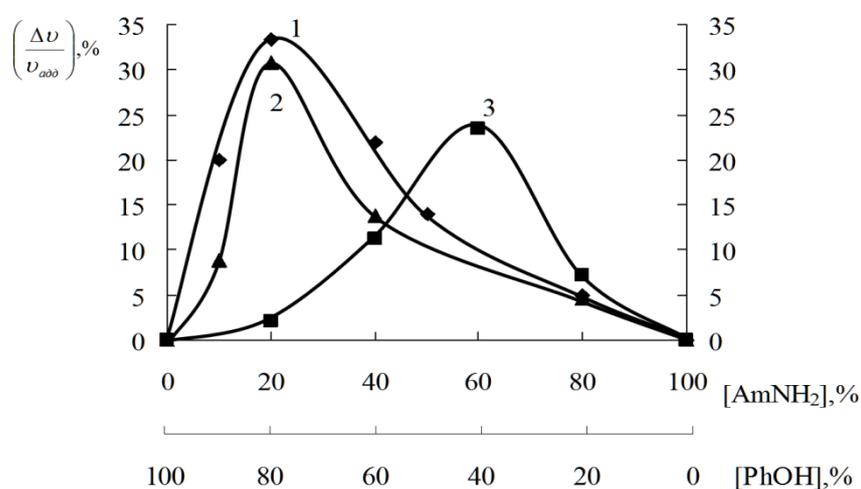
Обращает на себя внимание тот факт, что активность кверцетина в реакции (1) с радикалом на три порядка больше, чем у алифатических аминокислот (табл. 1). То есть можно считать, что аминокислоты практически не проявляют АРА, но при этом в смеси с кверцетином

способны усиливать его действие, проявляя тем самым функции синергиста.

Для определения наиболее эффективных синергических композиций варьировали концентрации кверцетина и аминокислоты в широком диапазоне при постоянной суммарной концентрации смеси. Величину синергического эффекта оценивали (рис. 4) по усилению антирадикального действия смеси по сравнению с аддитивным действием кверцетина и аминокислоты:

$$\left((v_{см} - v_{add}) / v_{add} \right)_{max} = (\Delta v / v_{add})_{max},$$

где $v_{см}$ - начальная скорость реакции DPPH* со смесью PhOH и AmNH₂; v_{add} - ожидаемая величина начальной скорости в предположении, что действие смеси аддитивно.



Р и с . 4. Зависимость критерия $(\Delta v / v_{add})$ от состава смеси кверцетина (PhOH) с аминокислотой (AmNH₂): 1 – аланин; 2 – валин; 3 – глицин. Суммарная концентрация смеси $3,97 \cdot 10^{-5}$ моль·л⁻¹, pH=7,35, T=293±2 К

Анализ зависимости $(\Delta v / v_{add})$ от состава смеси кверцетина с аминокислотой показал, что в изученном диапазоне концентраций композиции PhOH и AmNH₂ проявили либо аддитивное, либо синергического действие. Максимальный синергический эффект $(\Delta v / v_{add})_{max}$ порядка 30-33% характерен для смесей кверцетина с аланином и валином в соотношении 80 к 20%. Менее активен лейцин, изолейцин и глицин (табл. 3). Уменьшение величины $(\Delta v / v_{add})_{max}$ приводит к сдвигу максимумов на кривых в сторону большего содержания аминокислот (рис. 3).

Таблица 3

Максимальные значения критериев синергического эффекта для смесей кверцетина с аминокислотами в реакции с DPPH[•] при pH=7.35 и T=293±2 К

№	Синергическая композиция	$v_{\max} \cdot 10^7$, моль·л ⁻¹ ·с ⁻¹	$\left(\frac{\Delta v}{v_{add}}\right)_{\max}$, % (УФ)	$\left(\frac{\Delta v}{v_{add}}\right)_{\max}$, % (ХЛ)
1	Кверцетин:глицин (40:60)	3.9±0.6	23.4	33.4
2	Кверцетин : аланин (80:20)	4.77±0.14	33.4	53.8
3	Кверцетин : валин (80:20)	4.36±0.21	30.8	53.9
4	Кверцетин : изолейцин (60:40)	3.02±0.16	11.4	36.0
5	Кверцетин : лейцин (80:20)	4.22±0.34	26.6	40.9

Прослеживается зависимость между активностью аминокислот в реакции с DPPH[•] (k_{AmNH_2}) и их способностью к синергизму. Чем меньше k_{AmNH_2} , тем более выражен синергический эффект (табл. 1, 3). Это, по-видимому, объясняется тем, что с увеличением АРА аминокислоты происходит её расходование не только на восстановление окисленной формы кверцетина, но и на реакцию с DPPH[•]. Таким образом, требуется большее количество кислоты для проявления синергического эффекта, что выражается в смещении максимума на кривых в сторону более высоких концентраций AmNH₂ для слабых синергических композиций (рис. 3, табл. 3).

Для проверки полученных результатов наиболее эффективные синергические смеси изучали в реакции с активными кислородцентрированными радикалами, моделирующими активные формы кислорода (АФК). С этой целью генерировали пероксильные радикалы при распаде водорастворимого азоинициатора 2,2'-азобис-(2-амидинопропан)дигидрохлорид (ААРН) при pH=7.35–7.4 в фосфатном буфере и T=323±2 К.

Оценивали синергический эффект методом хемилюминесценции [9] (ФЭУ-34), активированной люминолом (LN₂), по величине периода индукции (τ), в течение которого антиоксидант расходуется, подавляя образование свободных радикалов (рис. 5).

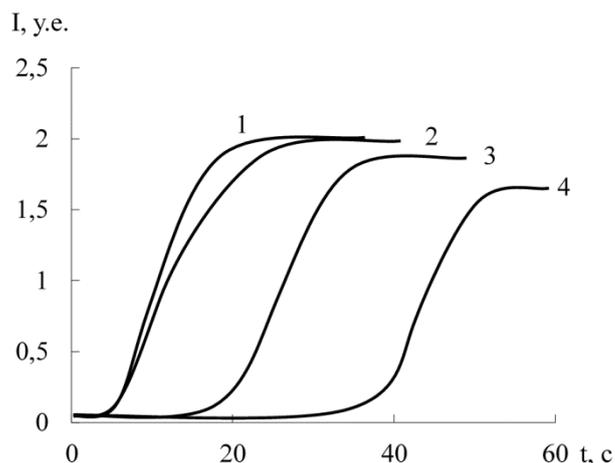
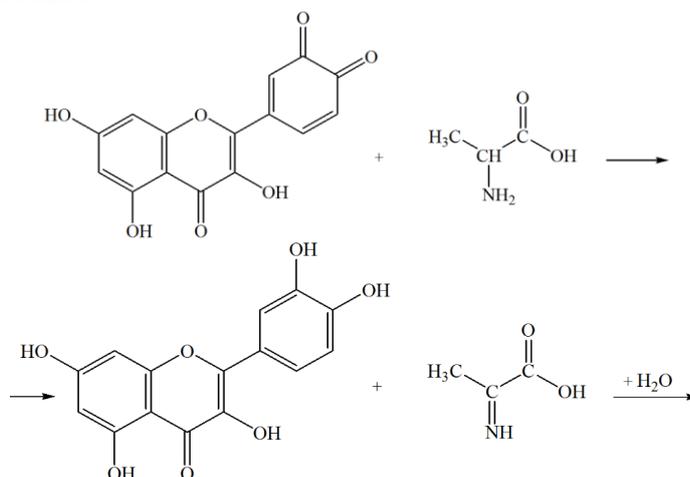
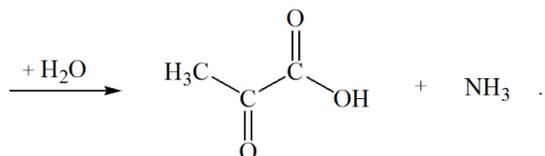


Рис. 5. Изменение интенсивности хемилюминесцентного свечения (I) во времени (t) при протекании реакции генерирования пероксильных радикалов амидинопропана без добавок (1) и в присутствии аминокислот: 2 – лейцин ($C=2 \cdot 10^{-7}$ моль·л⁻¹); 3 – кверцетин ($C=8 \cdot 10^{-7}$ моль·л⁻¹); 4 – смесь 80:20% кверцетина и лейцина (суммарная концентрация $1 \cdot 10^{-6}$ моль·л⁻¹). $[AAPH]=6 \cdot 10^{-3}$ моль·л⁻¹, $[LH_2]=1 \cdot 10^{-5}$ моль·л⁻¹, pH = 7.35, T=323±2 K

Предполагаемый механизм действия изученных аминокислот как синергистов заключается в восстановлении окисленной формы кверцетина либо путем замещения в бензольном кольце, либо путем окислительного дезаминирования аминокислоты с образованием в качестве конечного продукта соответствующей оксокислоты. Согласно литературным данным [10] последний механизм является предпочтительнее:





Его реализация проверялась качественно в галоформной реакции на образующуюся оксокислоту путем исчерпывающего галогенирования метилкетонов (молекулы, содержащие R-CO-CH₃ группу) в присутствии основания. При этом наблюдается характерное изменение окрашивания реакционной смеси и появление резкого запаха йодоформа.

Таким образом, в результате проделанной работы предложены композиции кверцетина с аланином и валином в процентном соотношении 80:20%, которые проявляют выраженный синергический эффект в реакции с радикалами разной природы. Такие смеси из природных соединений позволят добиваться максимального защитного эффекта при меньшей концентрации АО и могут использоваться как потенциально безопасные средства коррекции интенсивности свободно-радикальных процессов.

Список литературы

1. Vermerris W., Nicolson R. Phenolic Compound Biochemistry. Springer, 2006. 276 p.
2. Shang Y.-J., Liu B.-Y., Zhao M.-M. // Czech J. Food Sci. 2015. V. 33. P. 210–216.
3. Рогинский В.А. Фенольные антиоксиданты. Реакционная способность и эффективность. М.: Наука, 1988. 247 с.
4. Kadoma Y., Fujisawa S. // Molecules. 2011. V. 16. P. 10457–10470.
5. Наумова Ю.А. // Вестник МИТХТ. 2013. № 3. С. 76-86.
6. Jones E.G., Blaster L.M. // Energy & Fuels. 2000. V. 14. P. 640–645.
7. Statistica: [сайт]. URL: <http://www.statsoft.ru> (дата обращения: 01.07.2016).
8. ChemAxon: [сайт]. URL: <http://www.chemaxon.com> (дата обращения: 01.07.2016).
9. Шляпинтох В.Я., Карпухин О.Н., Постников Л.М., Захаров И.В., Вичутинский А.А., Цепалов В.Ф. Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов. М.: Наука. 1966. 299 с.
10. Эммануэль Н.М., Лясковская Ю.Н. Торможение процессов окисления жиров. М.: Пищепромиздат, 1961. 358 с.

THE SYNERGISTIC EFFECT OF THE COMPOSITION OF QUERCETIN WITH ALIPHATIC AMINO ACIDS

N.I. Belaya, A.V. Belyj, K.P. Shaluto

Donetsk National University, Donetsk

This paper describes the results of investigation of joint antiradical action of quercetin and certain aliphatic amino acids in the reaction with the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) at $T = 293 \pm 2$ K in ethanol-phosphate buffer (1: 1) at pH = 7.35. The maximum synergistic effect is demonstrated in mixtures of quercetin valine and alanine in a ratio of 80:20% in a reaction with both nitrogen- and oxygen-centered radicals. The resulting mixtures of natural compounds will help to achieve the maximum protective effect at a lower concentration of antioxidant and can potentially be used as a safe means of correcting the intensity of free-radical processes.

Keywords: *synergism, antiradical activity, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, quercetin, amino acid.*

Об авторах:

БЕЛАЯ Наталья Ивановна – кандидат химических наук, доцент кафедры физической химии химического факультета Донецкого национального университета, e-mail: nat.iv.belaya@gmail.com

БЕЛЫЙ Александр Владимирович – кандидат химических наук, доцент кафедры физической химии химического факультета Донецкого национального университета, e-mail: a.v.belyj@gmail.com

ШАЛЮТО Карина Петровна – магистр химии, кафедра физической химии химического факультета Донецкого национального университета, e-mail: karinashaluto@gmail.com