

АНТИРАДИКАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА СМЕСЕЙ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ С ФЕНОЛЬНЫМИ АНТИОКСИДАНТАМИ

С.Л. Хилько, Р.А. Макарова, Р.Г. Семенова, М.И. Рогатко

Институт физико-органической химии и углехимии
им. Л.М. Литвиненко, г. Донецк

Изучена антирадикальная активность (АРА) ванилина, протокатехового альдегида и их смесей с аскорбиновой кислотой в реакциях с 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ) методом УФ спектроскопии. Показано, что антирадикальная активность протокатехового альдегида сопоставима с АРА аскорбиновой кислоты и кверцетина. Установлено, что большие концентрации аскорбиновой кислоты в смесях с ванилином способствуют проявлению эффекта антагонизма, а в смесях с протокатеховым альдегидом эффект совместного действия близок к аддитивному.

Ключевые слова: антирадикальная активность, ДФПГ (2,2'-дифенил-1-пикрилгидразил), аскорбиновая кислота, полифенолы, ванилин, протокатеховый альдегид, УФ спектроскопия, редокс-титрование.

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия резко возрос интерес к проблеме выявления антиоксидантной активности природных соединений. Методологическим подходом в рамках этой задачи является изучение антирадикальных свойств органических веществ как одной из составляющих антиоксидантной активности [1-3]. Способность некоторых индивидуальных соединений снижать интенсивность окислительных процессов находит широкое применение в различных отраслях промышленности, медицине и сельском хозяйстве. Особую значимость ингибиторы окисления (антиоксиданты, АО) приобретают при регулировании окислительных процессов, протекающих в живых организмах. Это обусловлено способностью АО инактивировать разрушительное действие промежуточных продуктов окисления – перекисных соединений и радикалов [4; 5].

Антирадикальная активность (АРА) проявляется как способность вещества взаимодействовать со свободными радикалами. Соединения, проявляющие антирадикальную активность, являются потенциальными антиоксидантами.

В настоящее время разработка смесей антиоксидантов с различным механизмом действия является актуальной задачей [6-9]. В таких смесях могут проявляться суммарные эффекты, такие как

синергизм и антагонизм, которые могут представлять интерес, как в теоретическом, так и в практическом смысле.

Наиболее распространенным и многочисленным классом природных соединений, которые проявляют биологическую, антиоксидантную и антирадикальную активность, являются производные фенолов и полифенолов [10; 11]. При этом большинство растительных фенольных соединений имеют в своем составе о-фенольную, пирокатехиновую конфигурацию атомов (флавоноиды, гормональные катехоламины, ароматические гидроксикислоты). Функции и свойства полифенолов в различных метаболических процессах в живых организмах до конца не изучены. Известно, что, попеременно окисляясь и восстанавливаясь, фенольные соединения служат связующим звеном между водородом «дыхательного» субстрата и кислородом окружающей среды [12]. Биологическое действие фенольных соединений обусловлено наличием гидроксильных групп, способных к ступенчатой отдаче электронов [13].

Витамин С (L-аскорбиновая кислота) является широко распространенным компонентом в пищевой промышленности для стабилизации качества пищевых продуктов. Синтетический витамин С широко используется в качестве пищевых добавок и имеет свой E номер (E300) [14]. Аскорбиновая кислота применяется в фармацевтической индустрии как компонент лекарственных препаратов и для антиоксидантотерапии.

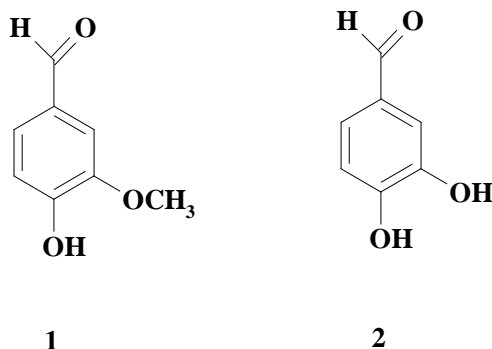
Практически во всех живых организмах аскорбиновая кислота присутствует вместе с фенольными соединениями. Аскорбиновая кислота и полифенолы в растительных и животных клетках вступают в окислительно-восстановительные реакции [15].

Выяснение особенностей совместного действия различных по природе антиоксидантов, несомненно, представляет интерес, поскольку позволит целенаправленно регулировать их антиоксидантную и антирадикальную активность.

Целью работы было исследование антирадикальной активности ванилина (В), протокатехового альдегида (ПКА), их структура приведена на рисунке 1, и смесей этих веществ с аскорбиновой кислотой (АК).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для количественной оценки АРА был применен один из наиболее популярных методов, основанный на реакции стабильного свободного радикалаДФПГ (2,2'-дифенил-1-пикрилгидразил), растворенного в этаноле, с образцом антиоксиданта [16].



Р и с. 1. Структуры ванилина (1) и протокатехового альдегида (2)

За ходом реакции следили по изменению величины оптической плотности растворов методом УФ спектрофотометрии. В результате восстановления ДФПГ антиоксидантом снижается интенсивно-фиолетовая окраска раствора ДФПГ в этаноле при $\lambda = 517$ нм в видимой области спектра. При этом радикал ДФПГ, взаимодействуя с молекулой антиоксиданта, переходит в нерадикальную форму. Этанол в качестве растворителя был выбран на основании данных работы, в которой установлено, что воспроизводимость получаемых результатов в среде этанола в два раза выше, чем в среде метанола.

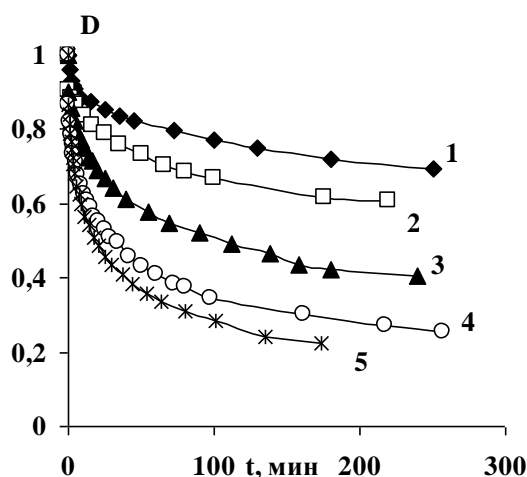
Исследования были проведены на спектрофотометре Specord UV VIS в кюветах $l = 1,0$ см при $t = 20^\circ\text{C}$. Готовили растворы ДФПГ ($C = 1,0 \times 10^{-4}$ моль/л) фирмы “Aldrich” ($\omega = 97\%$) и серию растворов субстратов разной концентрации. Для изучения кинетики реакции в кювете смешивали 2,0 мл раствора ДФПГ и 0,5 мл каждого из растворов полученной серии субстратов; сразу же после смешивания регистрировали значения оптической плотности.

Величину окислительно-восстановительного потенциала (E , мВ) определяли на прецизионном мультиметре РСТ-407 с использованием окислительно-восстановительного электрода РО50. Растворы перманганата калия готовили из стандарт-титров на дистиллированной воде. Точки эквивалентности определяли дифференциальным методом, как максимумы на дифференциальных кривых: $\Delta E/\Delta V = f(V)$.

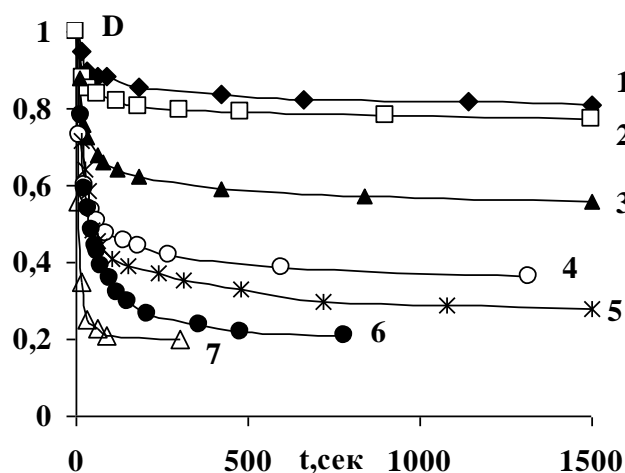
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунках 2 и 3 приведены зависимости изменения оптической плотности растворов ванилина и протокатехового альдегида от времени.

Как следует из этих данных, скорости гибели ДФПГ в реакциях с ванилином (рис. 2) и протокатеховым альдегидом (рис. 3) сильно различаются.



Р и с . 2. Кинетические кривые расходования ДФПГ в реакциях с ванилином при его различных концентрациях.
С_в, моль/л: 1 - 0,0028; 2 - 0,0060; 3 - 0,0121; 4 - 0,0242; 5 - 0,0303



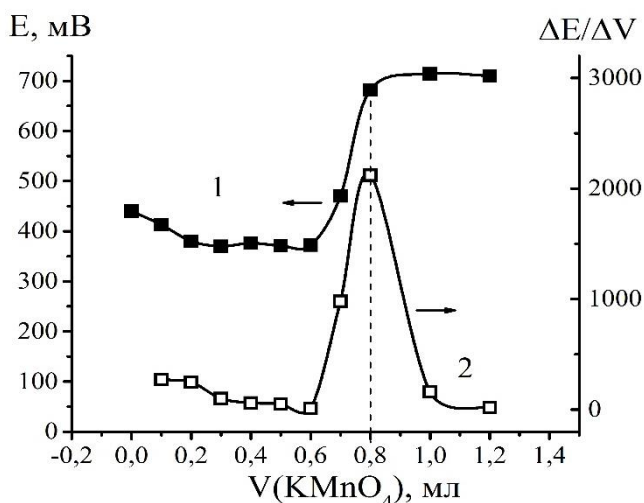
Р и с . 3. Кинетические кривые расходования ДФПГ в реакциях с протокатеховым альдегидом при различных концентрациях.
С_{ПКА}, моль/л×10³: 1 - 4,3; 2 - 6,4; 3 - 9,8; 4 - 12,9; 5 - 14,9; 6 - 18,7; 7 - 93,5

Известно, что при изучении реакционной способности фенольных антиоксидантов важно установление ее связи со строением молекул. Одним из основных параметров, определяющих активность антиоксидантов, является прочность ОН-связи в молекулах полифенолов [17; 18].

В этой связи были изучены особенности окисления ванилина и протокатехового альдегида перманганатом калия в нейтральной среде.

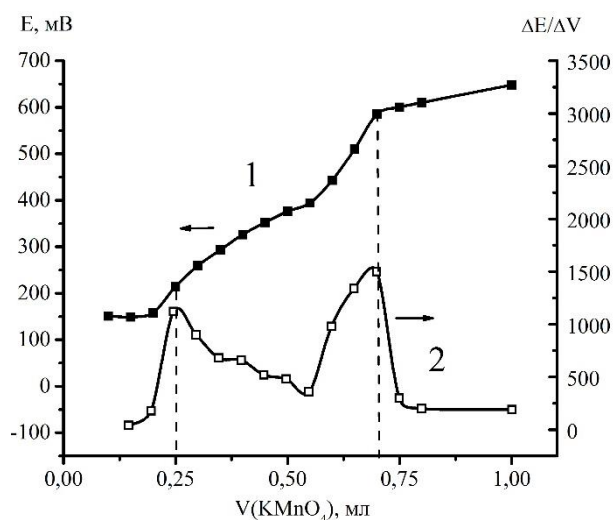
Процесс окисления контролировали при измерении окислительно-восстановительного потенциала растворов. Интегральные и дифференциальные кривые редокс-титрования ванилина приведены на рисунке 4. Как видно из этого рисунка, на дифференциальных кривых потенциометрического титрования ванилина присутствует один максимум, что свидетельствует о протекании одного окислительно-восстановительного процесса и отвечает окислению одностепенных гидроксильных групп. Скачок редокс-потенциала для ванилина находится в области $E_{max} = 680$ мВ.

На дифференциальных кривых редокс-титрования протокатехового альдегида имеется два скачка редокс-потенциала – при $E_{max} = 241$ и 600 мВ. Это указывает на протекание процессов окисления разных по реакционной способности гидроксильных групп. При этом одна –ОН группа обладает большей реакционной способностью в окислительных процессах, а вторая окисляется при значении редокс-потенциала, близком к таковому для ванилина (рис. 5).



Р и с . 4. Интегральная (1) и дифференциальная (2) кривые редокс-титрования ванилина 0,1 н раствором KMnO_4

Из этого можно сделать вывод, что высокая реакционная способность ОН-группы в мета-положении протокатехового альдегида является следствием электроноакцепторного эффекта альдегидной группы.



Р и с . 5. Интегральная (1) и дифференциальная (2) кривые редокс-титрования протокатехового альдегида 0,1 н раствором KMnO_4

Для количественной оценки антирадикальной активности строили зависимости остаточного содержания ДФПГ (%) от концентрации субстратов. Эти зависимости описываются линейными уравнениями, позволяющими определить величины EC_{50} – концентраций, необходимых для уменьшения концентрации ДФПГ на 50% за 25 мин. Остаточное содержание ДФПГ в реакционной смеси оценивали по формуле:

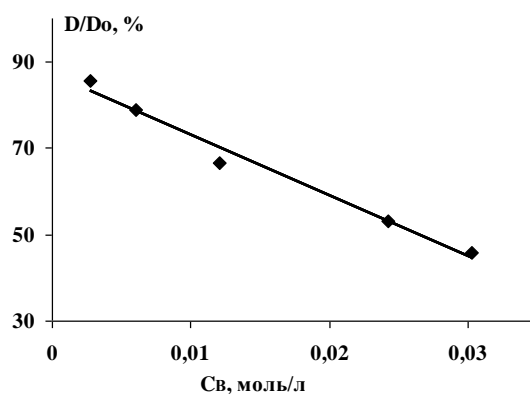
$$\% \text{ДФПГ} = \frac{D_t}{D_0} \cdot 100\% ,$$

где D_t - оптическая плотность реакционной смеси в момент времени t ;
 D_0 - оптическая плотность раствора в начальный момент времени.

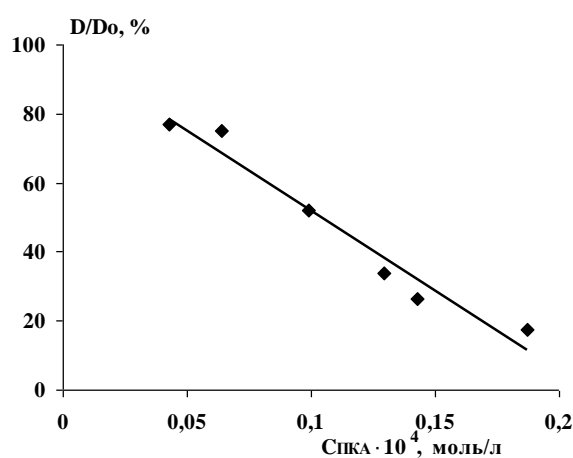
На рисунках 6 и 7 приведены зависимости остаточного содержания ДФПГ (%) в реакциях с ванилином и протокатеховым альдегидом от концентраций компонентов.

В таблице 1 приведены вычисленные характеристики антирадикальной активности ванилина и протокатехового альдегида, EC_{50} (моль/л), полученные графическим методом.

Сравнение полученных значений EC_{50} для протокатехового альдегида со значениями EC_{50} известных антиоксидантов показывает, что протокатеховый альдегид обладает сопоставимой антирадикальной активностью с аскорбиновой кислотой ($\text{EC}_{50} = 3,79 \times 10^{-5}$ моль/л) и кверцетином ($\text{EC}_{50} = 1,77 \times 10^{-5}$ моль/л) [19; 20].



Р и с . 6. Изменение концентрации ДФПГ в реакциях с ванилином



Р и с . 7. Изменение концентрации ДФПГ в реакциях с протокатеховым альдегидом

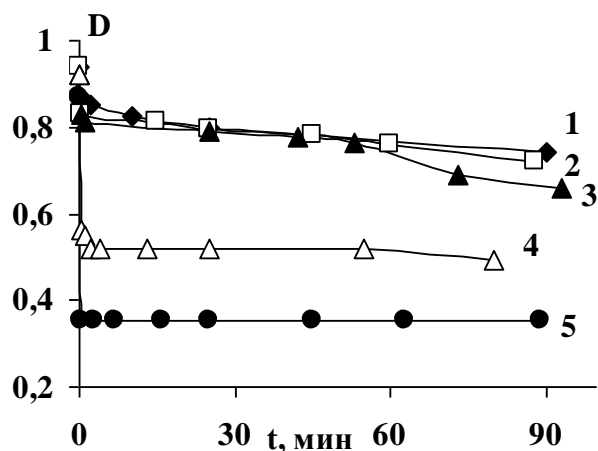
Т а б л и ц а 1

Характеристики антирадикальной активности

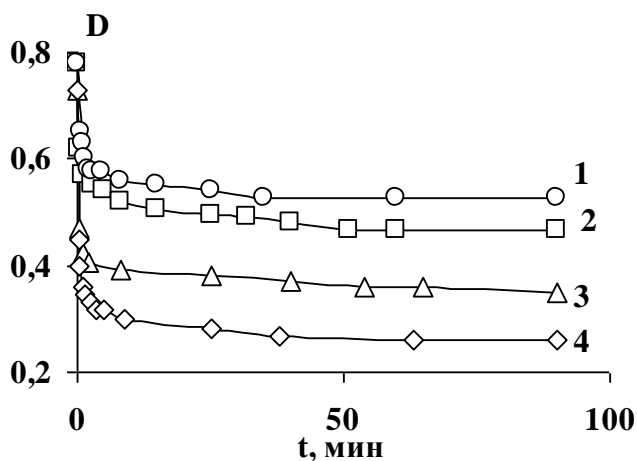
Субстрат	EC ₅₀ , моль/л	Уравнение линии	r
Ванилин	0,026	$D/D_0 = -1884,9C + 99,6$	0,99
Протокадетовый альдегид	0,000011	$D/D_0 = -4,54 \times 10^6 C + 97,50$	0,98

Полученные данные согласуются с результатами исследования окислительно-восстановительных свойств ванилина и протокатехового альдегида в реакциях с перманганатом калия.

На рисунках 8 и 9 приведены зависимости изменения оптической плотности растворов ДФПГ в реакциях со смесями аскорбиновой кислоты с ванилином и протокатеховым альдегидом от времени.

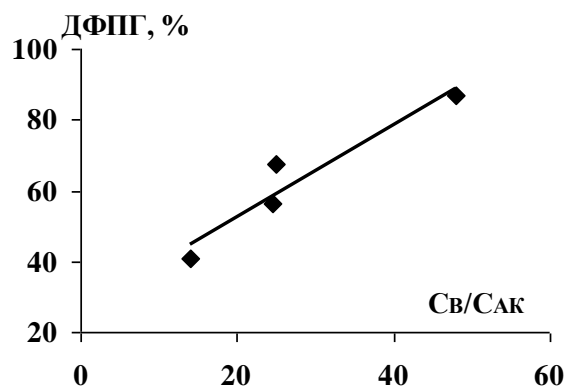


Р и с. 8. Кинетические кривые расходования ДФПГ в реакциях с ванилином и аскорбиновой кислотой. $C_B = \text{const} = 1,66 \cdot 10^{-3}$ моль/л.
 C_{AK} , моль/л: 1 – 0; 2 – $0,5 \cdot 10^{-5}$; 3 – $3,4 \cdot 10^{-5}$; 4 – $5,8 \cdot 10^{-5}$; 5 – $11,6 \cdot 10^{-5}$

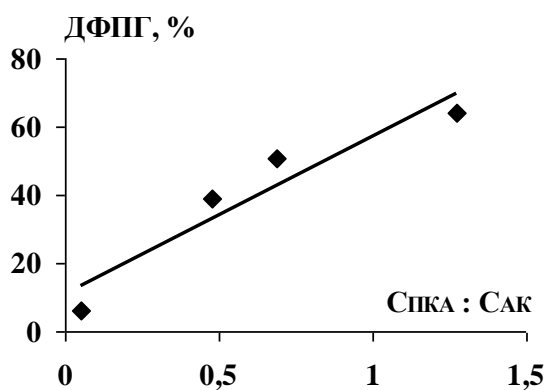


Р и с. 9. Кинетические кривые расходования ДФПГ в реакциях с протокатеховым альдегидом и аскорбиновой кислотой.
 C_{AK} , моль/л: 1 – 0; 2 – $0,47 \cdot 10^{-5}$; 3 – $0,86 \cdot 10^{-5}$; 4 – $1,2 \cdot 10^{-5}$.
 $C_{ПКА} = \text{const} = 5,93 \cdot 10^{-6}$ моль/л

На рисунках 10 и 11 приведены зависимости остаточного содержания ДФПГ (%) в этих реакциях от соотношения компонентов.



Р и с. 10. Изменения концентрации ДФПГ в реакциях со смесями аскорбиновой кислоты и ванилина от соотношения компонентов



Р и с. 11. Изменения концентрации ДФПГ в реакциях со смесями аскорбиновой кислоты и протокатехового альдегида от соотношения компонентов

Как следует из данных, приведенных в таблице 2, остаточное содержание ДФПГ в растворах после реакции со смесями аскорбиновой кислоты с ванилином и протокатеховым альдегидом, больше чем остаток ДФПГ в случае аддитивного действия обоих антиоксидантов $[100 - (ДФПГ_{AK} + ДФПГ_{Ф})] = (\Sigma ДФПГ)$.

При этом видно, что, чем больше концентрация аскорбиновой кислоты в смесях с ванилином, тем больше разница $\Delta ДФПГ = [ДФПГ_{AK+Ф} - \Sigma ДФПГ]$. На основании этого можно полагать, что большие концентрации аскорбиновой кислоты оказывают отрицательное влияние на антирадикальную активность ванилина, то есть их совместное действие способствует проявлению эффекта антагонизма.

Содержание остаточного содержания ДФПГ в системах
 ($C_B = 1,66 \times 10^{-3}$ моль/л, $C_{ПКА} = 5,93 \times 10^{-6}$ моль/л; ДФПГ_В = 85,2 %;
 ДФПГ_{ПКА} = 69,2%)}

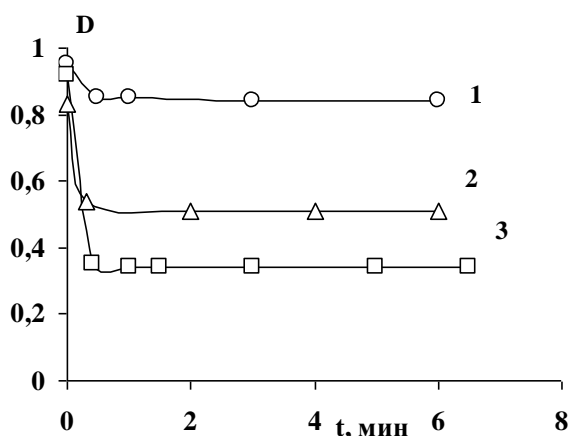
C_{AK} , моль/л	ДФПГ*, %	ДФПГ** _{АК+Ф} , %	Σ ДФПГ, %	Δ ДФПГ, %
Ванилин				
$5,54 \times 10^{-6}$	84,3	84,5	69,5	15,0
$5,78 \times 10^{-5}$	40,2	55,4	25,4	30,0
$1,16 \times 10^{-4}$	25,0	40,8	10,2	30,6
Протокатеховый альдегид				
$4,67 \times 10^{-6}$	87,2	64,1	56,4	7,7
$8,60 \times 10^{-6}$	82,2	59,0	51,4	7,6
$1,23 \times 10^{-5}$	61,6	38,8	30,8	8,0

*Смеси (ДФПГ + АК)

**Смеси (ДФПГ + АК + В) и (ДФПГ + АК + ПКА)

Следует отметить, что величины Δ ДФПГ для смесей ванилина и протокатехового альдегида с АК различаются (табл. 2). Для смесей аскорбиновой кислоты с протокатеховым альдегидом величины Δ ДФПГ существенно ниже, чем для смесей АК с ванилином. Это, по-видимому, связано с различной антирадикальной активностью этих соединений. Высокая антирадикальная активность протокатехового альдегида сопоставима с АРА аскорбиновой кислоты. Вследствие этого суммарные антирадикальные эффекты смесей (АК+ПКА) близки к аддитивным.

Причины отрицательного влияния больших концентраций аскорбиновой кислоты на антирадикальные свойства ее смесей с фенольными соединениями в модельных реакциях могут быть связаны с разной скоростью взаимодействия компонентов с ДФПГ. В случае смесей аскорбиновой кислоты и протокатехового альдегида, скорость взаимодействия их с ДФПГ сопоставима: при реакции каждого компонента в отдельности с ДФПГ равновесие достигается в течение 1 минуты (рис. 3 и 12). Данные по скорости взаимодействия АК с ДФПГ согласуются с литературными источниками [21]. Можно полагать, что в смесях этих компонентов конкуренция за связывание с ДФПГ равновероятна. Ванилин реагирует с ДФПГ гораздо медленнее даже в условиях концентраций, превышающих концентрации протокатехового альдегида на 2-3 порядка (рис.2). То есть, в смесях с ванилином аскорбиновая кислота более конкурентноспособна в реакциях с ДФПГ. При совместном действии ванилина и аскорбиновой кислоты суммарный антирадикальный эффект меньше суммы эффектов каждого компонента в отдельности (антагонизм).

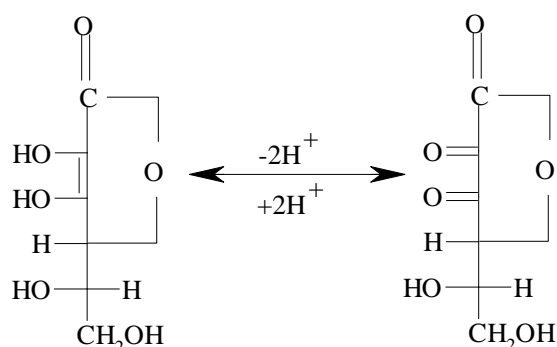


Р и с. 12. Кинетические кривые расходования ДФПГ в реакциях с аскорбиновой кислотой. C_{AK} , моль/л: 1 – $1,1 \cdot 10^{-5}$; 2 – $3,4 \cdot 10^{-5}$; 3 – $5,8 \cdot 10^{-5}$

Отрицательное влияние больших концентраций аскорбиновой кислоты на свойства различных систем описано в литературе. Так, при больших концентрациях аскорбиновая кислота действует как восстановитель катализатора при окислении липидных субстратов, переводя его в неактивную форму [9]. При совместном действии с природными полифенолами на основе гуминовых кислот большие концентрации аскорбиновой кислоты переводят антиоксидантные системы в прооксидантные [22].

В модельных ферментативных реакциях закономерности совместного действия фенолов с аскорбиновой кислотой отличаются от реакций с ДФПГ. Так, известно, что при пероксидазном окислении аскорбиновой кислоты и гидрохинона субстраты окисляются последовательно: сначала гидрохинон окисляется до хинона, затем хинон отнимает водород у аскорбиновой кислоты, превращая ее в дегидроаскорбиновую кислоту, то есть гидрохинон активирует окисление аскорбиновой кислоты, а избыток аскорбиновой кислоты ингибирует фермент [23].

Аскорбиновая кислота в радикальных реакциях способна легко восстанавливаться до дегидроаскорбиновой кислоты, образуя редокс-пару (рис. 13). Аскорбиновая кислота является веществом кислого характера (для 0,1 н раствора $pH = 2,2$), а дегидроаскорбиновая кислота кислотные свойства утрачивает [24].



Р и с . 13. Окислительно-восстановительная пара аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот

ВЫВОДЫ

1. Выявлена высокая антирадикальная активность протокатехового альдегида, которая сопоставима с АРА кверцетина и аскорбиновой кислоты.
2. В смесях протокатехового альдегида и аскорбиновой кислоты суммарный антирадикальный эффект близок к аддитивному.
3. Для совместного антирадикального действия ванилина и аскорбиновой кислоты в условиях высоких концентраций последней характерен эффект антогонизма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Яшин А.Я. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2014. Т. 14. Вып. 5. С. 869-878.
2. Мисин В.М., Сажина Н.Н., Короткова Е.И. // Химия растительного сырья. 2011. №2. С. 137–143.
3. Milardovic S., Ivekovic D., Grabaric B.S. // Bioelectrochemistry. 2006. V. 68, № 2. С. 175-180.
4. Breese K. D., Lemethe J.-F., De Armit C. // Polymer Degradation and Stability. 2000. V. 70. P. 89 - 96.
5. Денисов Е. Т., Азатян В.В. Ингибирование цепных реакций // Черноголовка: ИПХФ РАН, 1997. 268 с.
6. Левин П.И., Михайлов В.В. // Успехи химии. 1970. Т. 39, № 9. С. 1687-1706.
7. Карпухина Г.В., Эмануэль Н.М. // Докл. АН СССР. 1984. Т. 276, № 5. С. 1163 - 1167.
8. Пат. 4713408 США. Polybutylene terephthalate resin composition. Katsuhiko T., Yoshihisa T.; Polyplastics Co., Ltd. Оpubл. 15.12.87.
9. Перевозкина М.Г. Тестирование антиоксидантной активности полифункциональных соединений кинетическими методами. Новосибирск: Изд-во СибАК. 2014. 240 с.
10. Farkas O., Jakus J., Heberger K. // Molecules. 2004. V. 9. P. 1079-1088.
11. Yang J.-G., Liu B.-G. , Liang G.-Zh. // Molecules. 2009. V. 14. P. 46-52.

12. Андреева В.А. Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений. М., Наука, 1988. 128 с.
13. Барабай В.А. Растительные фенолы и здоровье человека. М.: Наука, 1984. 160 с.
14. Гладких С.П. // Технология. 1970. С. 37-42.
15. Кения М.В., Лукаш А.И., Гуськов Е.П. // Успехи совр. биологии. 1999. Т. 113. С. 456-470.
16. Marinova G., Batchvarov V. // Bulg. J. Agric. Sci. 2011. V. 17. P. 11-24.
17. Рогинский В.А. Фенольные антиоксиданты: Реакционная способность и эффективность. М.: Наука, 1988. 247 с.
18. Wright J.S., Johnson E.R., DiLabio G.A. // J. Am. Chem. Soc. 2001. V. 123, № 6. P. 1173-1183.
19. Lebeau J., Furman C., Bernier J.-L., Duriez P., Teissier E., Cotelle N. // Free Radical Biol. Med. 2000. V. 29, № 9. P. 900-912.
20. Quan H., Ninorimbera V. // Zhejiang Univ SCI. 2004. V. 5, № 6. P. 676-683.
21. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. // Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 1995. V.28. P. 25-30.
22. Смирнова О.В., Ефимова И.В., Хилько С.Л. // Журнал прикладной химии. 2012. Т. 85, № 2. С. 253-256.
23. Рогожин В.В., Верхотуров В.В. // Биоорганическая химия. 1999. Т. 25, № 5. С. 377-382.
24. Девис М. Витамин С. Химия и биохимия. М. : Мир, 1999. 179 с.

ANTIRADICAL PROPERTIES OF MIXTURES OF ASCORBIC ACID WITH PHENOLIC ANTIOXIDANTS

S.L. Khil'ko, R.A. Makarova, R.G. Semenova, M.I.Rogatko

The L.M.Litvinenko Institute of Physical Organic and Coal Chemistry,
Donetsk

It was studied antiradical activity (ARA) of vanillin, protocatechuic aldehyde and their mixtures with ascorbic acid in the reactions with 2,2' diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) by UV spectroscopy. It is shown that the antiradical activity of the protocatechuic aldehyde is comparable to that of ARA of ascorbic acid and quercetin. It is established that high concentration of ascorbic acid in mixtures with vanillin contribute to the manifestation of the effect of antagonism, and in mixtures with the protocatechuic aldehyde the effect of joint action is close to additive.

Keywords: antiradical activity, DPPH (2,2' diphenyl-1-picrylhydrazyl), ascorbic acid, polyphenols, vanillin, protocatechuic aldehyde, UV spectroscopy, redox titration.

Об авторах:

ХИЛЬКО СВЕТЛАНА ЛЕОНИДОВНА – кандидат химических наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник Института физико-органической химии и углехимии им. Л.М. Литвиненко (г. Донецк), e-mail: sv-hilko@yandex.ru

СЕМЕНОВА РИММА ГРИГОРЬЕВНА – кандидат химических наук, старший научный сотрудник Института физико-органической химии и углехимии им. Л.М. Литвиненко (г. Донецк).

МАКАРОВА РАИСА АЛЕКСАНДРОВНА – кандидат химических наук, старший научный сотрудник Института физико-органической химии и углехимии им. Л.М. Литвиненко (г. Донецк).

РОГАТКО МАРИНА ИГОРЕВНА – аспирант Института физико-органической химии и углехимии им. Л.М. Литвиненко (г. Донецк).

Поступила в редакцию 30 мая 2018 г.