

И. В. Лагута, О. Н. Ставинская, Т. В. Фесенко, В. Г. Пивоваренко

Антирадикальные и комплексообразующие свойства синтетических производных флавонола

(Представлено академиком НАН Украины Н. Т. Картелем)

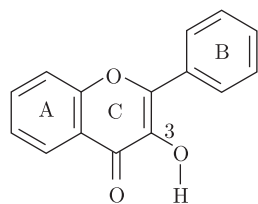
С использованием ДФПГ-теста и метода спектрофотометрического титрования изучены антирадикальные и комплексообразующие свойства трех синтетических производных флавонола: 3',4'-ди(гидроксикарбонилметокси)флавонол, 4'-[N,N-ди(2-гидроксиэтиламино)]флавонол и 4'-(N,N-диметиламино)флавонол. Определена стехиометрия комплексов флавонолов с ионом Fe(III), а также рассчитаны кажущиеся константы образования этих комплексов. Показано, что синтезированные соединения характеризуются более высокой антирадикальной активностью и повышенной способностью к хелатированию металла-прооксиданта по сравнению с исходным флавонолом.

Антиоксиданты, т. е. вещества, способные значительно замедлять или предотвращать окисление субстрата [1, 2], широко используются в составе лекарственных средств, в косметологии, пищевой промышленности, ветеринарии. В зависимости от механизма действия различают первичные (“обрывающие цепь”) и вторичные (“превентивные”) антиоксиданты. Первичные, — присутствуя в среде в следовых количествах, реагируют непосредственно с радикалами и превращают их в более стабильные продукты. Вторичные — уменьшают скорость окисления субстрата, например, за счет поглощения УФ-света, деактивирования синглетного кислорода, хелатирования металлов-промоторов окислительных процессов [1, 2].

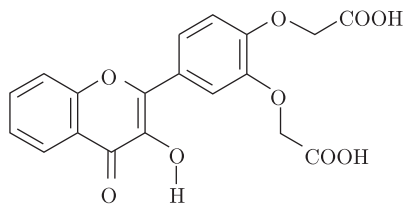
Флавонолы (ФЛ) — природные биоактивные вещества широкого спектра действия, обладающие антиоксидантной активностью. Благодаря особенностям своего строения, соединения этого класса могут участвовать в реакциях ингибирования радикалов, а также выступать в качестве хелатирующих агентов, связывающих металлы-прооксиданты. Одним из недостатков природных антиоксидантов, в том числе ФЛ, является недостаточно высокая эффективность, а также дороговизна и сложность их выделения из природного сырья. Таким образом, представляет интерес поиск и исследование более активных и/или более дешевых синтетических аналогов природных ФЛ.

В работе использовали исходный флавонол (ФЛО) и три его производных, отличающихся структурой боковых заместителей В-кольца: 3',4'-ди(гидроксикарбонилметокси)флавонол, 4'-[N,N-ди(2-гидроксиэтиламино)]флавонол и 4'-(N,N-диметиламино)флавонол. Структурные формулы ФЛО и синтезированных соединений приведены ниже.

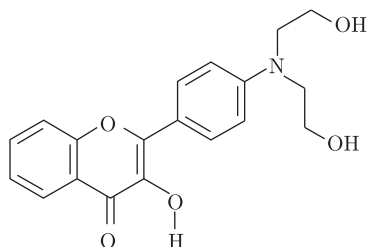
Синтез проводили путем щелочной конденсации *o*-гидроксиацетофенона с соответствующими ариллальдегидами и дальнейшей окислительной циклизации продуктов в целевые соединения [3]. Структура и индивидуальность синтезированных соединений были подтверждены данными ¹H ЯМР спектроскопии и хроматомасс-спектрометрии [3].



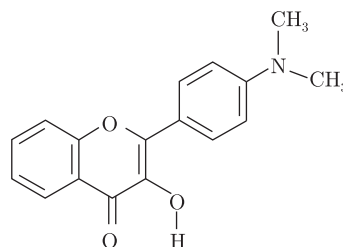
ФЛ0



3',4'-ди(гидроксикарбонилметокси)флавонол (ФЛ1)



4'-[N,N-ди(2-гидроксиэтиламино)]флавонол (ФЛ2)



4'-(N,N-диметиламино)флавонол (ФЛ3)

Для определения антирадикальной активности флавонолов использовали реакцию со стабильным свободным радикалом дифенилпикрилгидразилом (ДФПГ•) [4, 5]. К раствору исследуемого вещества в 70%-м этаноле добавляли раствор ДФПГ•, так что соотношение ФЛ : ДФПГ• изменялось в пределах от 0,1 до 2,5. Концентрацию стабильных радикалов через различные промежутки времени после начала реакции определяли спектрофотометрически по изменению оптической плотности в максимуме поглощения при длине волны 520 нм. Для контроля использовали раствор с той же концентрацией ДФПГ•, но без антиоксиданта.

ЛДИ масс-спектры образцов получали с помощью масс-спектрометра Autoflex II (“Bruker Daltonics Inc”, Германия), оборудованного азотным лазером (337 нм). Ионизация образцов производилась импульсами длительностью 3 нс с частотой 20 Гц. Спектры регистрировали в линейном режиме с временной задержкой экстракции ионов в 10 нс при мощности лазера 37 мДж. Исследуемые растворы наносили на стандартную металлическую подложку. Каждый спектр, записанный в массовом диапазоне от 0 до 1000 а. е. м., представлял собой накопленную сумму не менее 100 отдельных масс-спектров.

Способность соединений к хелатированию металлов-прооксидантов изучали методом спектрофотометрического титрования [6] на примере катионов Fe^{3+} .

Готовили 0,04 моль/л раствор антиоксиданта в KH_2PO_4 буфере (рН 6,86) и 1 моль/л раствор хлорида железа в 0,1 моль/л HCl. К 2 мл раствора ФЛ в кварцевой кювете последовательно добавляли по 8–40 мкл раствора Fe^{3+} , так что соотношение Fe^{3+} : ФЛ в реакционной смеси изменялось в пределах от 0,2 до 2,5, выдерживали до установления равновесия и регистрировали УФ-спектры. Концентрацию в растворе антиоксидантов и их комплексов с железом определяли по изменению оптической плотности в максимумах поглощения при 340, 357, 403 нм и 407 нм (соединения ФЛ0, ФЛ1, ФЛ2 и ФЛ3 соответственно) и при 410, 420, 550 нм и 480 нм (комплексы железа с ФЛ0, ФЛ1, ФЛ2 и ФЛ3 соответственно). Кажущуюся константу комплексообразования рассчитывали с учетом данных о структуре комплекса и концентрации компонентов в равновесном состоянии.

Кинетические кривые гибели стабильных свободных радикалов ДФПГ• в реакции с синтезированными соединениями ФЛ0–ФЛ3, а также с двумя контрольными антиоксидантами из класса флавонолов — рутином и кверцетином иллюстрирует рис. 1. Как видно из рисун-

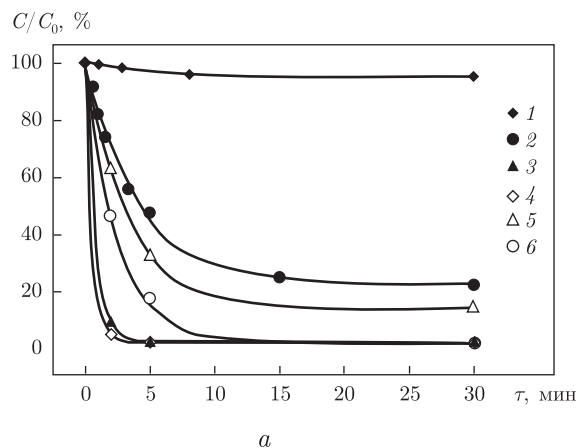


Рис. 1. Кинетические кривые гибели радикала ДФПГ• в реакции с антиоксидантами: ФЛ0 (1), ФЛ1 (2), ФЛ2 (3), ФЛ3 (4); рутином (5) и кверцетином (6). Мольное соотношение ФЛ : ДФПГ• = 1

ка, взаимодействие ДФПГ• с ФЛ0 протекает очень медленно (кривая 1). Антирадикальная активность соединения ФЛ1 заметно больше, чем у ФЛ0, но меньше, чем у таких эффективных антиоксидантов, как рутин и кверцетин (кривые 2 и 5, 6 соответственно). Соединения ФЛ2, ФЛ3 демонстрируют высокую скорость ингибирования радикалов, превышающую скорость реакции ДФПГ• с контрольными антиоксидантами (кривые 3, 4).

Следуя методике, описанной в научной публикации [5], нами проведено исследование кинетики взаимодействия антиоксидантов ФЛ1–ФЛ3 с радикалами ДФПГ• при различном мольном соотношении ФЛ : ДФПГ•. Примеры зависимостей относительной концентрации радикала C/C_0 от времени реакции приведены на рис. 2, а и б. Как видно из рисунка, при всех соотношениях компонентов через 1–2 мин (для соединений ФЛ2 и ФЛ3) или 15–30 мин (для соединения ФЛ1) реакция достигает стационарного состояния. Для систем ФЛ1–ДФПГ•, ФЛ2–ДФПГ•, ФЛ3–ДФПГ• рис. 2, в демонстрирует данные об остаточной концентрации радикалов в равновесном состоянии относительно мольного соотношения ФЛ : ДФПГ•. Из полученных зависимостей можно определить соотношение $(\text{ФЛ} : \text{ДФПГ}^\bullet)_{50}$, при котором достигается восстановление 50% исходного количества ДФПГ•. В соответствии с [5], удвоенная величина $(\text{ФЛ} : \text{ДФПГ}^\bullet)_{50}$ дает теоретическую эффективную концентрацию антиоксиданта, необходимую для восстановления 100% радикалов, а величина, обратная этой концентрации, определяет стехиометрию реакции. Для исследованных веществ ФЛ2, ФЛ3 величина $(\text{ФЛ} : \text{ДФПГ}^\bullet)_{50}$ составила около 0,25 (см. в на рис. 2). Следовательно, можно заключить, что одна молекула антиоксиданта восстанавливает две молекулы ДФПГ•. Для соединения ФЛ1 соотношение $(\text{ФЛ} : \text{ДФПГ}^\bullet)_{50}$ близко к 0,5 (см. в на рис. 2), так что стехиометрия реакции составляет около 1 : 1. Реакция ДФПГ• с ФЛ0 протекала очень медленно, поэтому достоверно определить значение $(\text{ФЛ} : \text{ДФПГ}^\bullet)_{50}$ оказалось невозможным. Согласно литературным данным, реакция ФЛ с ДФПГ• также имеет стехиометрию 1 : 1 [7].

Полученные данные о стехиометрии реакции ДФПГ• с антиоксидантами ФЛ2 и ФЛ3 указывают на то, что образующийся после отрыва водорода первичный радикал молекулы антиоксиданта ФЛ• или продукт его последующих превращений ингибирует еще одну молекулу ДФПГ•. Согласно данным публикации [5], во взаимодействии со вторым радикалом ДФПГ• может участвовать первичный радикал молекулы антиоксиданта ФЛ• или его

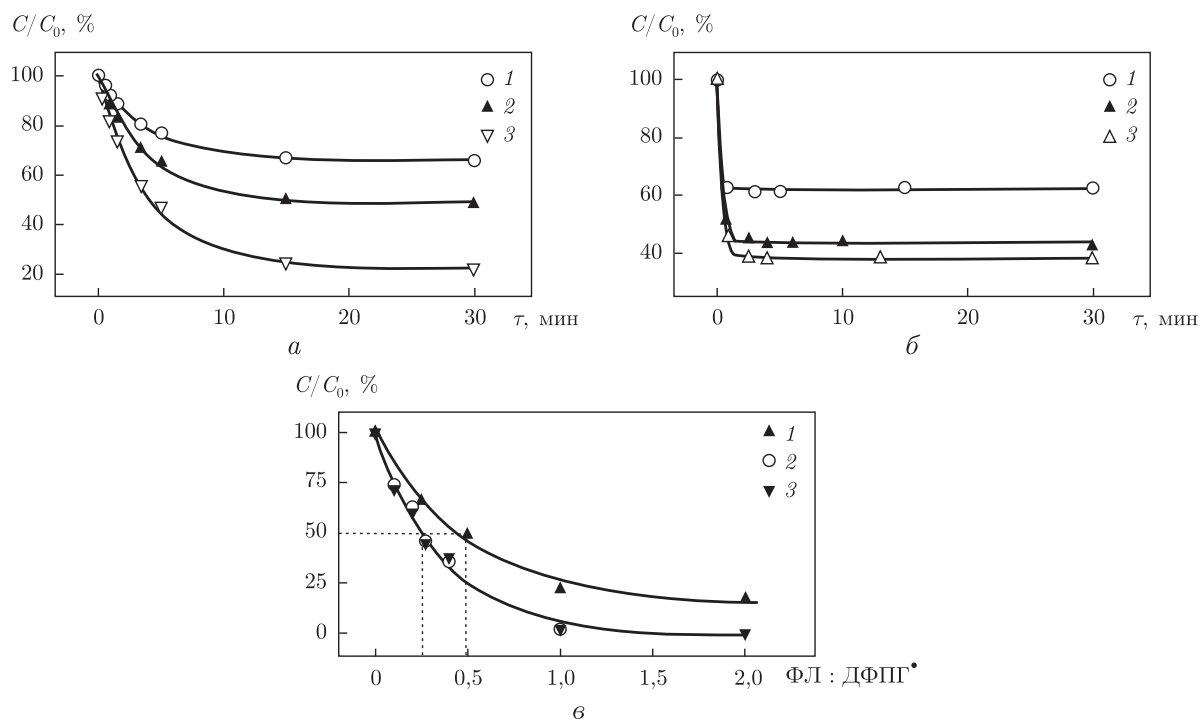


Рис. 2. Определение стехиометрии реакции ДФПГ• с ФЛ1–ФЛ3:

a — кинетические кривые взаимодействия ФЛ1 с ДФПГ• при мольном соотношении ФЛ1 : ДФПГ• = 0,25 (1), 0,5 (2), 1,0 (3);

б — кинетические кривые взаимодействия ФЛ2 с ДФПГ• при мольном соотношении ФЛ2 : ДФПГ• = 0,20 (1), 0,27 (2), 0,40 (3);

в — зависимость количества непрореагировавших радикалов от мольного соотношения ФЛ : ДФПГ• для соединений ФЛ1 (1), ФЛ2 (2), ФЛ3 (3)

димер; ингибирование второй молекулы ДФПГ• может осуществляться за счет переноса от антиоксиданта еще одного радикала водорода или путем рекомбинации радикалов ФЛ• и ДФПГ• с образованием соединения ФЛ2•ДФПГ•. Подтверждением того, что реакция может протекать, в частности, за счет рекомбинации радикалов, в нашем случае являются результаты исследования реакционной смеси методом ЛДИ масс-спектрометрии. Как видно из рис. 3, в масс-спектрах системы ФЛ2–ДФПГ• присутствуют пики с m/z 342, m/z 394 и m/z 735, отвечающие протонированной форме $[\text{ФЛ2}+\text{H}]^+$ молекулы ФЛ2 ($M = 341$), ион-радикалу $[\text{ДФПГ}^{\bullet}-e]^+$ дифенилшикрилгидразида ($M = 394$) и соединению ФЛ2•ДФПГ• ($M = 734$) с присоединенным протоном $[\text{ФЛ2}^{\bullet}-\text{ДФПГ}^{\bullet} + \text{H}]^+$ соответственно.

Различия в стехиометрии реакции, наблюдаемые для соединений ФЛ0, ФЛ1, с одной стороны, и ФЛ2, ФЛ3 — с другой, могут быть обусловлены различной реакционной способностью этих антиоксидантов и продуктов их превращений по отношению к радикалу ДФПГ•. Из литературных данных известно, например, что количество пероксидных радикалов ROO^{\bullet} , восстанавливаемых одной молекулой α -токоферола, зависит от активности антиоксиданта в конкретной реакции [8]. В том случае, если взаимодействие пероксидного радикала с образовавшимся из α -токоферола первичным ароил-радикалом протекает быстро, то ароил-радикал успевает восстановить еще одну молекулу ROO^{\bullet} , если нет — происходит автоокисление антиоксиданта. Можно предположить, что присутствие в соеди-

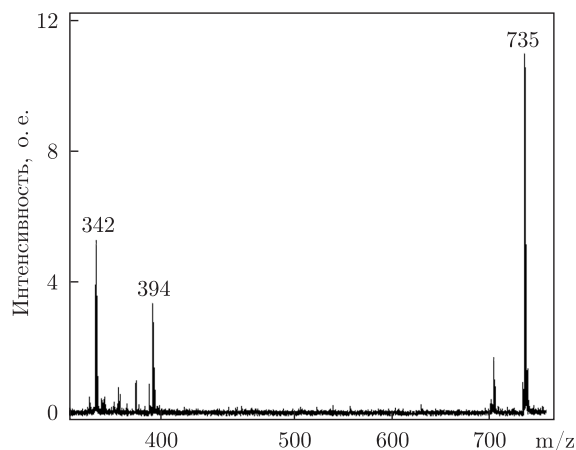


Рис. 3. ЛДИ масс-спектр положительных ионов, образующихся в системе ФЛ2–ДФПГ*

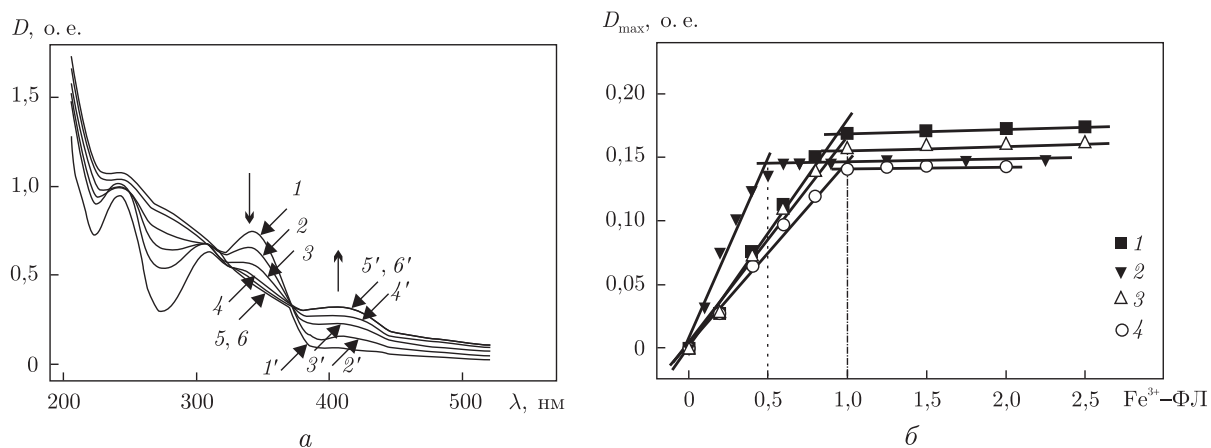


Рис. 4. Спектрометрическое титрование растворов антиоксидантов раствором хлорида железа:
a — УФ-спектры системы Fe^{3+} –ФЛ0 при соотношении $\text{Fe}^{3+} : \text{ФЛ0} = 0$ (1, 1'), 0,4 (2, 2'), 0,6 (3, 3'), 0,8 (4, 4'), 1,0 (5, 5'), 1,5 (6, 6');
б — концентрация комплексов Fe^{3+} –ФЛ в зависимости от соотношения $\text{Fe}^{3+} : \text{ФЛ}$ для соединений ФЛ0 (1), ФЛ1 (2), ФЛ2 (3), ФЛ3 (4)

нениях ФЛ2 и ФЛ3 сильного донора электронов — диалкиламиногруппы бокового ядра — повышает восстановительный потенциал как самой молекулы, так и образующегося из нее радикала, вследствие чего последний также приобретает способность к взаимодействию с ДФПГ*.

Результаты эксперимента по спектрофотометрическому титрованию растворов флавонолов раствором Fe^{3+} , демонстрирующие способность исследуемых соединений хелатировать металл-прооксидант, представлены на рис. 4. Как видно из рисунка, добавление железа к раствору флавонола приводит к появлению в спектрах новой полосы, свидетельствующей об образовании комплекса Fe^{3+} –ФЛ (см. *a*). При увеличении соотношения $\text{Fe}^{3+} : \text{ФЛ}$ наблюдается сначала увеличение, а затем стабилизация концентрации комплекса. Анализ зависимости концентрации комплекса от соотношения $\text{Fe}^{3+} : \text{ФЛ}$ (см. *б*) показывает, что в системах Fe^{3+} –ФЛ0, Fe^{3+} –ФЛ2, Fe^{3+} –ФЛ3 образуются преимущественно комплексы со структурой 1 : 1. Исключение составляет система Fe^{3+} –ФЛ1. Образование комплексов со

структурой Fe^{3+} : ФЛ1 = 1 : 2 в этом случае может быть связано с присутствием в молекуле ФЛ1 дополнительных центров связывания металла — карбоксильных групп боковых заместителей В-кольца. Карбоксильные группы, как известно, имеют более низкие значения констант ионизации ($\text{pK} \sim 4$) по сравнению с 3-гидроксигруппами флавонолов ($\text{pK} \sim 9\text{--}10$ [9]), поэтому можно ожидать, что указанное соединение будет связывать ионы железа в более широком диапазоне рН.

Учитывая найденные стехиометрические соотношения Fe^{3+} : ФЛ и данные о концентрации компонентов в системе в равновесных условиях, можно оценить кажущиеся константы $K_{\text{к}}$ образования комплексов флавонолов с железом: ФЛ0 — $\sim 2 \cdot 10^4$ л/моль; ФЛ1 — $\sim 1 \cdot 10^9$ л²/моль²; ФЛ2 — $\sim 5 \cdot 10^4$ л/моль; ФЛ3 — $\sim 3 \cdot 10^4$ л/моль.

Выполненные расчеты показывают, что значения $K_{\text{к}}$ для изученных соединений выше, чем для ФЛ0 (для реакции ФЛ1 и Fe^{3+} , имеющей второй порядок по реагенту ФЛ1, величину константы присоединения первого лиганда можно оценить как $\sqrt{K_{\text{к}}} = \sqrt{1 \cdot 10^9 \text{ л}^2/\text{моль}^2} \approx 3 \cdot 10^4$ л/моль). Следовательно, отметим, что производные ФЛ1—ФЛ3 обладают повышенной (по сравнению с исходным веществом) способностью к хелатированию ионов Fe^{3+} .

Таким образом, в тестовых реакциях со стабильным свободным радикалом дифенилпикрилгидразилом и с ионами Fe^{3+} показано, что синтезированные соединения 3',4'-ди(гидроксикарбонилметокси)флавонол, 4'-[N,N-ди(2-гидроксиэтиламино)]флавонол и 4'-(N,N-диметиламино)флавонол отличаются от исходного флавонола более высокой антирадикальной активностью и повышенной способностью к хелатированию металла-прооксиданта. Полученные результаты указывают на перспективность синтетических производных флавонола как антиоксидантов первого и второго типа для технического или биологического применения.

1. *Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives* / Ed. by D. L. Madhavi, S. S. Deshpande, D. K. Salunhe. — New York: CRC Press, 1996. — 512 p.
2. *Bekker E. M., Nissen L. R., Skibsted L. H. Antioxidant evaluation protocols: food quality or health effects* // Eur. Food Res. Technol. — 2004. — **219**. — P. 561–571.
3. *Baye G. M., Martyloga O. V., Duportail G., Pivovarenko V. G. 3-Hydroxy-4-[di-(2-hydroxyethyl)amino]flavone as a new step in search of an ideal membrane ratiometric fluorescent probe* // Photochem. and Photobiol. A: Chem. — 2006. — **184**. — P. 113–124.
4. *Alonso A. M., Domínguez C., Guilleán D., Barroso C. G. Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content* // J. Agric. Food Chem. — 2002. — **50**. — P. 3112–3115.
5. *Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity* // Lebensm. — Wiss. u.-Technol. — 1995. — **28**. — P. 25–30.
6. *Guo M., Peres C., Wei Y. et al. Iron-binding properties of plant phenolics and cransberry' s bioeffects* // Dalton Trans. — 2007. — **43**. — P. 4951–4961.
7. *Butković V., Klasinc L., Bors W. Kinetic study of flavonoid reactions with stable radicals* // J. Agric. Food Chem. — 2004. — **52**. — P. 2816–2820.
8. *Свободные радикалы в биологии: В 2 т. Т. 1* / Под ред. Н. М. Эммануэля; Пер. с англ. — Москва: Мир, 1979. — 318 с.
9. *Roshal A. D., Grigorovich A. V., Doroshenko A. O. Flavonols as metal-ions chelators: complex formation with Mg^{2+} and Ba^{2+} cations in the excited state* // Photochem. Photobiol. A: Chem. — 1999. — **127**. — P. 89–100.

*Институт химии поверхности
им. А. А. Чуйко НАН Украины, Киев
Киевский национальный университет
им. Тараса Шевченко*

Поступило в редакцию 23.12.2011

І. В. Лагута, О. М. Ставинська, Т. В. Фесенко, В. Г. Пивоваренко

Антирадикальні та комплексоутворювальні властивості синтетичних похідних флавонолу

З використанням ДФПГ-тесту і методу спектрофотометричного титрування вивчено антирадикальні та комплексоутворювальні властивості трьох синтетичних похідних флавонолу: 3',4'-ди(гідроксикарбонільметокси)флавонол, 4'-[N,N-ди(2-гідроксіетиламіно)]флавонол та 4'-(N,N-диметиламіно)флавонол. Визначено стехіометрію комплексів флавонолів з іоном Fe(III), а також розраховано уявні константи утворення цих комплексів. Показано, що синтезовані сполуки характеризуються більш високою антирадикальною активністю та підвищеною здатністю до хелатування металу-прооксиданту порівняно з вихідним флавонолом.

I. V. Laguta, O. N. Stavinskaya, T. V. Fesenko, V. G. Pivovarenko

Antiradical and complex-forming properties of synthetic derivatives of flavonol

Antiradical and complex-forming properties of three synthetic derivatives of flavonol (3',4'-di(hydroxycarbonylmethoxy)flavonol, 4'-[N,N-di(2-hydroxyethylamino)]flavonol) and 4'-(N,N-dimethylamino)flavonol are investigated by using the DPPH test and the UV/Vis titration method. The stoichiometric ratio between flavonols and metal ion Fe(III) for their complexation is determined. The apparent binding constants for the formation of metal-flavonol complexes are calculated. All the synthesized compounds are found to possess the higher antiradical activity and the better ability to chelate iron ions as compared with non-modified flavonol.