



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО ОРГАНИЧНА ХИМИЯ С ЦЕНТЪР ПО ФИТОХИМИЯ

АНТИОКСИДАНТИ

д-р Адриана Славова Казакова
асистент в лаборатория "Химия на липидите"

участие в конкурс за главен асистент по професионално направление 4.2 Химически науки,
научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни
вещества”, шифър 01.05.10

АНТИОКСИДАНТИ И СИНЕРГИСТИ

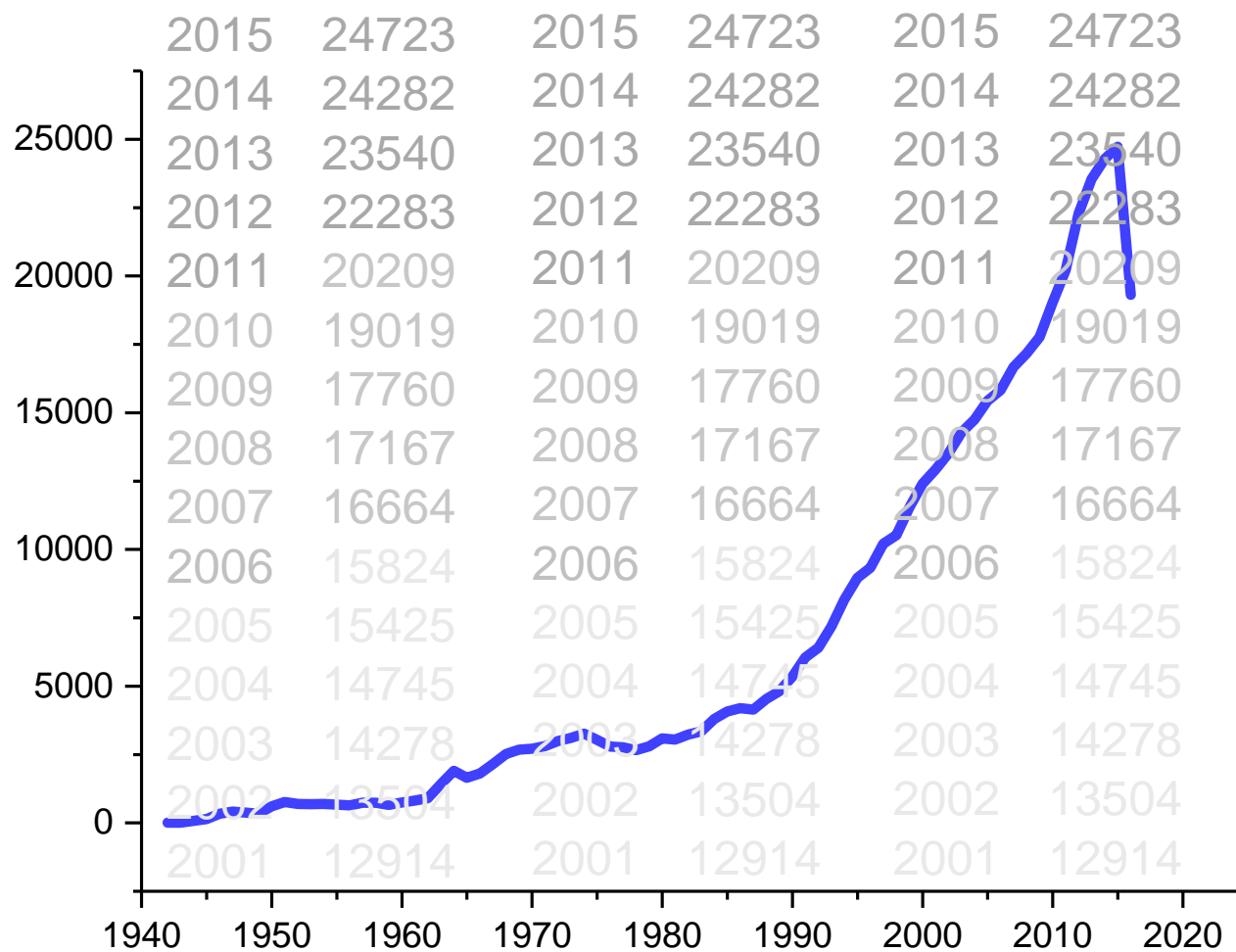
“Всички идеи в науката са се родили в драматичния конфликт между действителността и опитите ни да я разберем.”

Айнщайн

➤Общоприета е дефиницията, предложена от *Halliwel & Gutteridge* , съгласно която терминът „антиоксидант“ означава субстрат, който „присъствайки в много ниски концентрации, в сравнение с тези на окислявания субстрат, значително забавя, или предотвратява окислението на последния“.

➤Синергистите са вещества, които индивидуално не проявяват антиоксидантна активност, но в смеси с антиоксиданти (АОН) - засилват инхибиращата им способност. В литературата често се споменава термина "ко-антиоксидант", което е синоним на синергист.

АНТИОКСИДАНТИ И СИНЕРГИСТИ.



КЛАСИФИКАЦИЯ И ОСНОВНИ ПРЕДСТАВИТЕЛИ.

По произход

ПРИРОДНИ

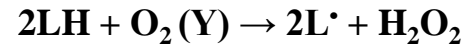
СИНТЕТИЧНИ

По разтворимост

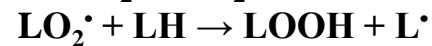
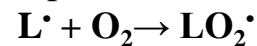
ВОДНОРАЗТВОРИМИ

ЛИПОРАЗТВОРИМИ

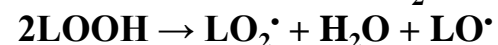
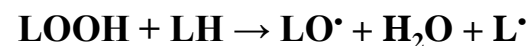
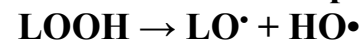
ЛИПИДНО АВТООКСИЛЕНИЕ



Продължение на веригата

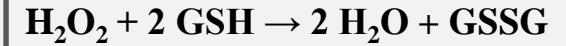


Разклонение на веригата

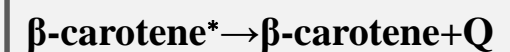
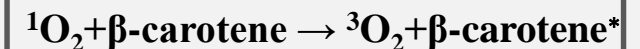
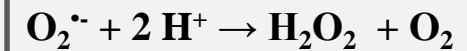


По механизъм на действие

Хидропероксидни разложители:

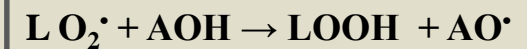


Уловители на реактивни
кислородсъдържащи частици:



Метални хелатори

Инхибитори :



В зависимост от ролята, която изпълняват в организма

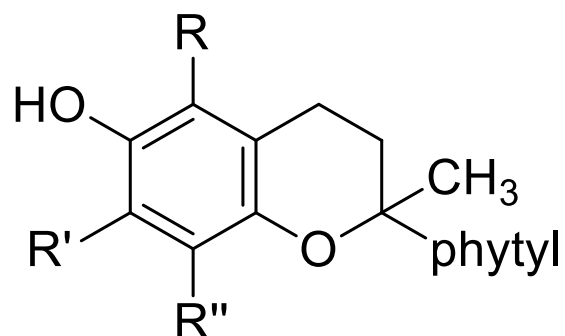
ЕНЗИМНИ

НЕЕНЗИМНИ

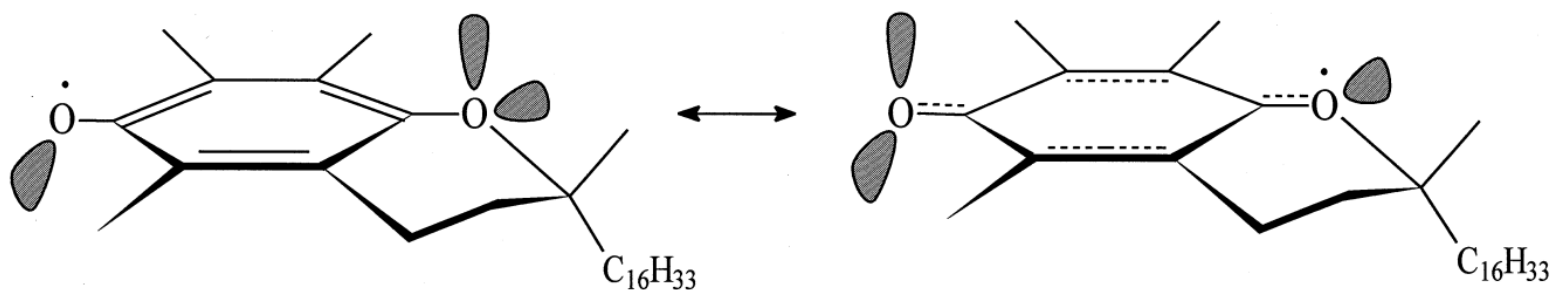
ЗАВИСИМОСТ СТРУКТУРА – АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ

- Наличието на антирадикалова активност е необходимо но не и достатъчно условие за проява на антиоксидантна активност за дадено съединение
- Активността на антиоксидантите зависи освен от тяхната структура, също и от концентрацията, в която присъстват, от свойствата на окисляения субстрат, от условията на окисление, в т.ч. средата и температурата и др. .
- Възможно е едно съединение да прояви еднаква активност като уловител на свободни радикали и като инхибитор на липидното окисление, но доста често най-силните радикалоуловители се проявяват като слаби инхибитори (антиоксиданти) и обратното.

ЗАВИСИМОСТ СТРУКТУРА – АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ

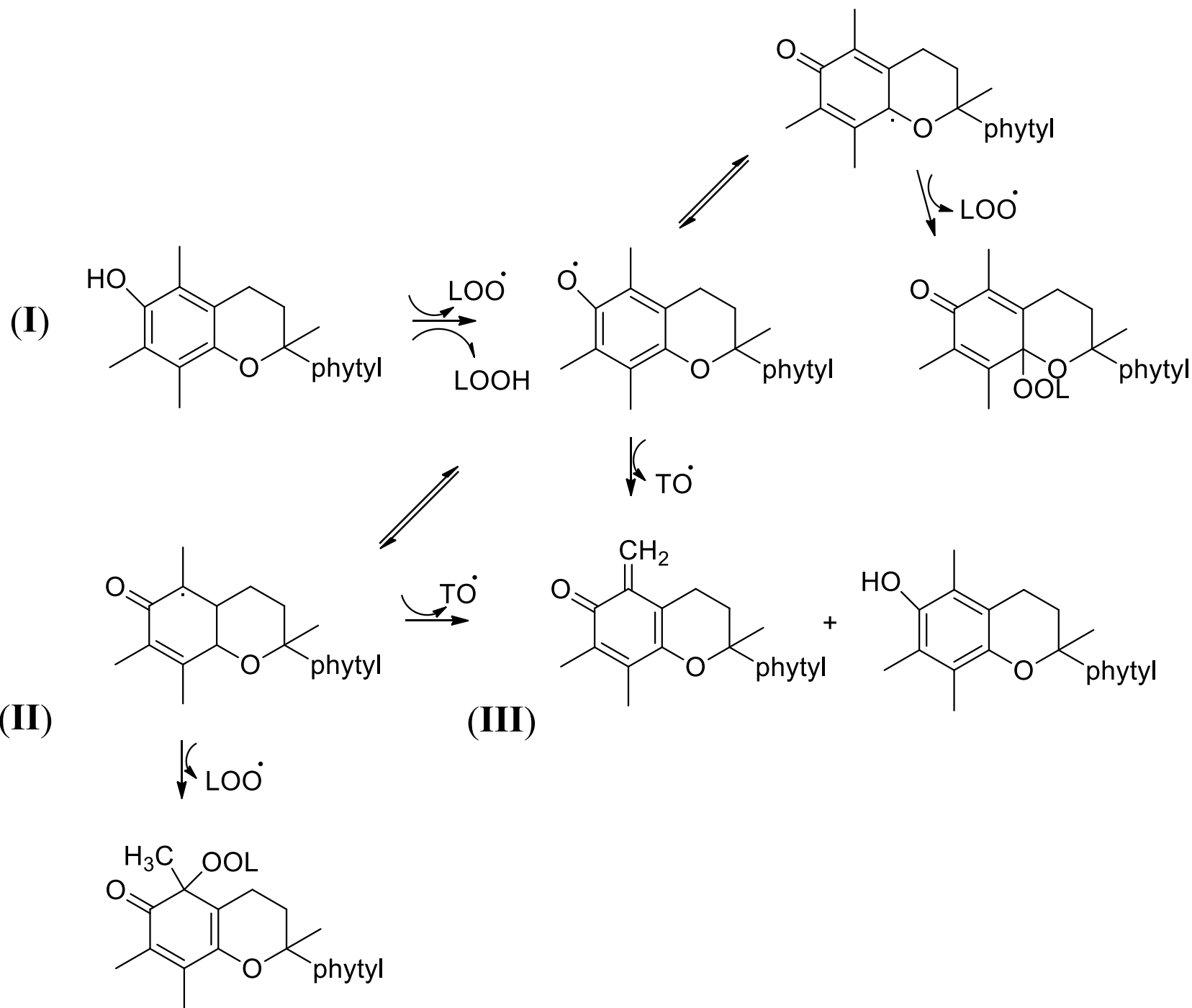


Наименование	Заместители	Енталпия на дисоциация на О-Н-връзка (<i>Denisov & Denisova, 2009</i>)
α -токоферол	$R = R' = R'' = \text{CH}_3$	330.0 KJ/mol (78.87 kcal/mol)
β -токоферол	$R = R'' = \text{CH}_3; R' = \text{H}$	335.5 KJ/mol (80.18 kcal/mol)
γ -токоферол	$R = \text{H}; R' = R'' = \text{CH}_3$	335.0 KJ/mol (80.07 kcal/mol)
δ -токоферол	$R = R' = \text{H}; R'' = \text{CH}_3$	341.5 KJ/mol (81.62 kcal/mol)



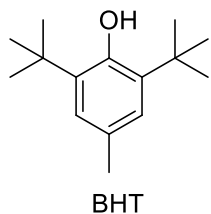
Резонансни форми на токоферилния радикал *Azzi & Stocker* (Progress in Lipid Research, 2000).

ЗАВИСИМОСТ СТРУКТУРА – АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ ПРИ МОНОФЕНОЛИ

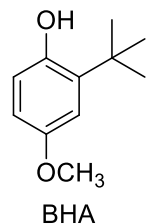


ЗАВИСИМОСТ СТРУКТУРА – АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ

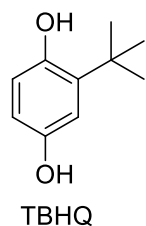
Ефект на обемистите заместители в орто-позиция спрямо фенолнатаОН-група



[BHT]/ [DPPH]	10 min	20 min
0.13	4.3 ±0.4	5.1 ±0.4
0.25	5.7 ±0.5	8.0 ±0.4
0.5	6.5 ±0.4	9.9 ±0.3

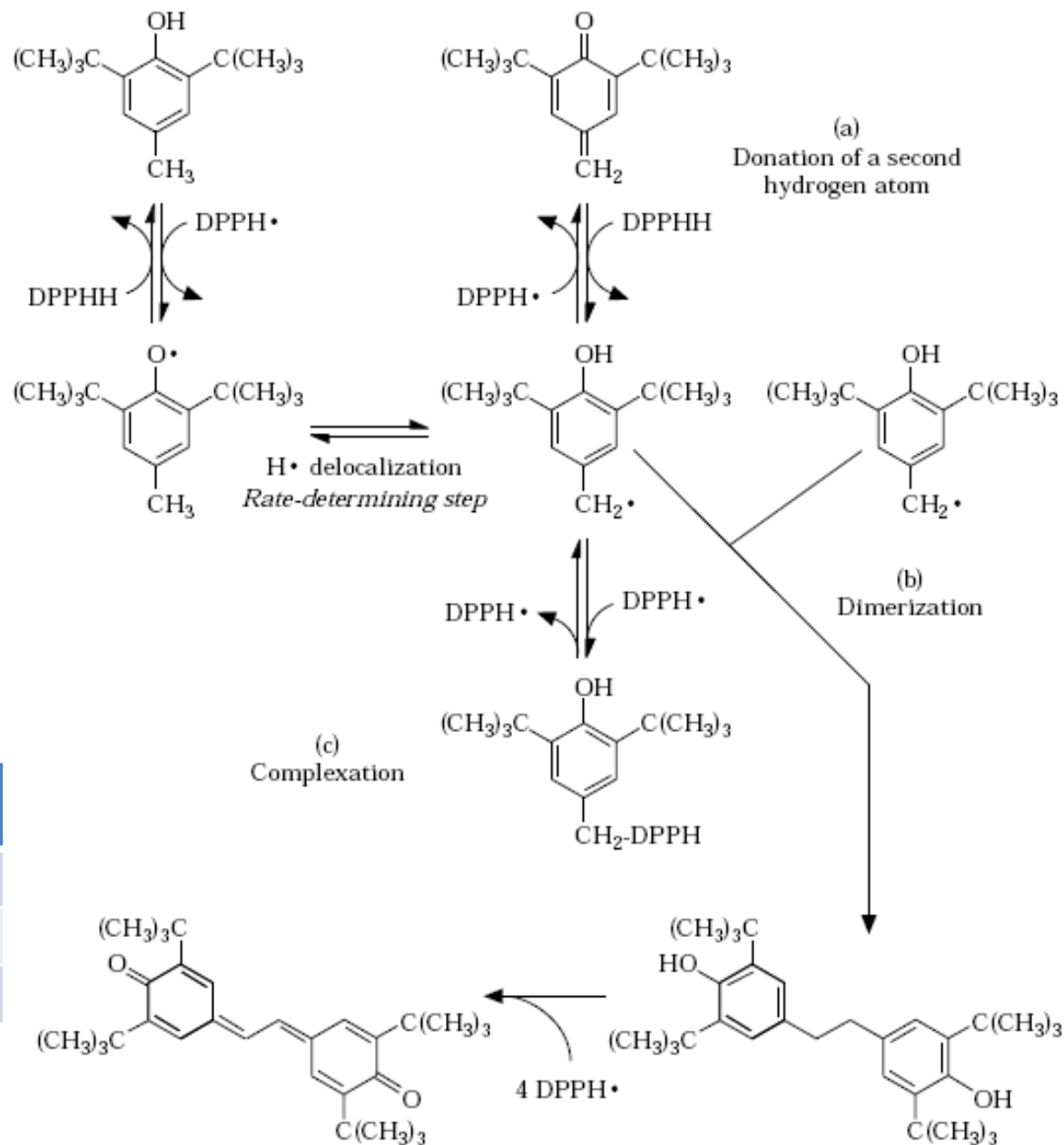


[BHA]/ [DPPH]	10 min	20 min
0.13	14.3 ±0.5	21.5 ±0.6
0.25	16.1 ±0.3	22.3 ±0.6
0.5	39.9 ±0.8	47.6 ±0.8

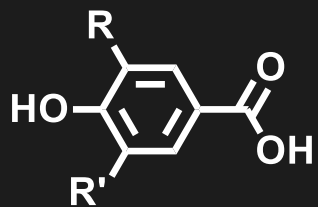


[TBHQ]/ [DPPH]	10 min	20 min
0.13	28.2 ±0.7	31.7 ±0.8
0.25	52.3 ±0.7	58.7 ±0.8
0.5	60.6 ±1.1	69.6 ±1.2

Nenadis & Tsimidou, 2002 JAOCS



Механизъм на взаимодействие между BHT и DPPH (*V. Bondet, W. Brand-Williams and C. Berset*)

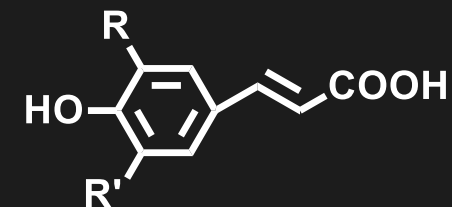


Бензоени киселини

СТРУКТУРА – АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ

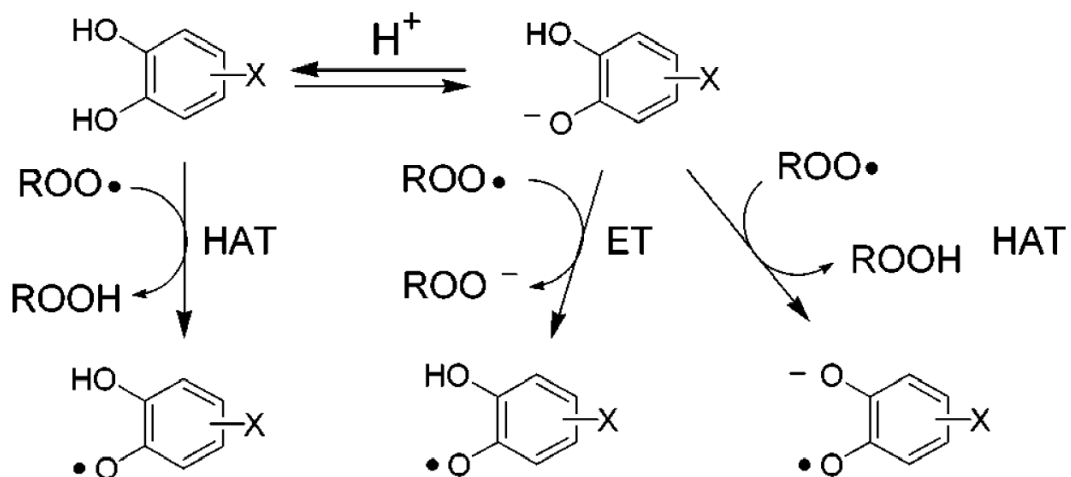
Ефект на електронодонорните и електроноакцепторните заместители в *орто*- и *пара*-позиция спрямо фенолната група

R

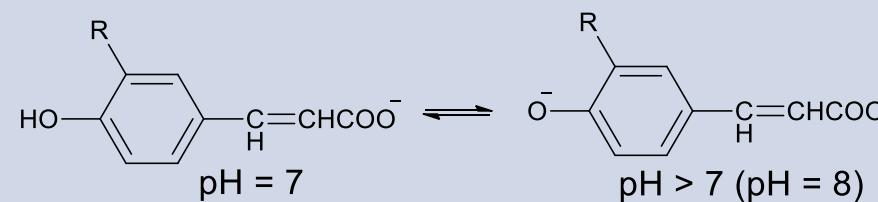


Канелени киселини

%RSA (10min)	[LOOH] nmol/mg LDL				[LOOH] nmol/mg LDL	%RSA (10min)
[AOH] 0.3 mmol	[AOH] 5 μmol				[AOH] 5 μmol	[AOH] 0.3 mmol
1.6 ±0.09	320 ±78	Бензоена	R = R' = H	<i>пара</i> -кумарова	283 ±88	-
2.4 ±0.15	324 ±83	ванилова	R = OCH₃; R' = H	ферулова	344 ±85	15.7 ±0.62
-	735 ±166	сирингова	R = R' = OCH₃;	Синапова	97 ±54	33.2 ±0.58
-	179 ±87	протокатехоева	R = OH; R' = H	кафеена	22 ±19	30.5 ±0.31

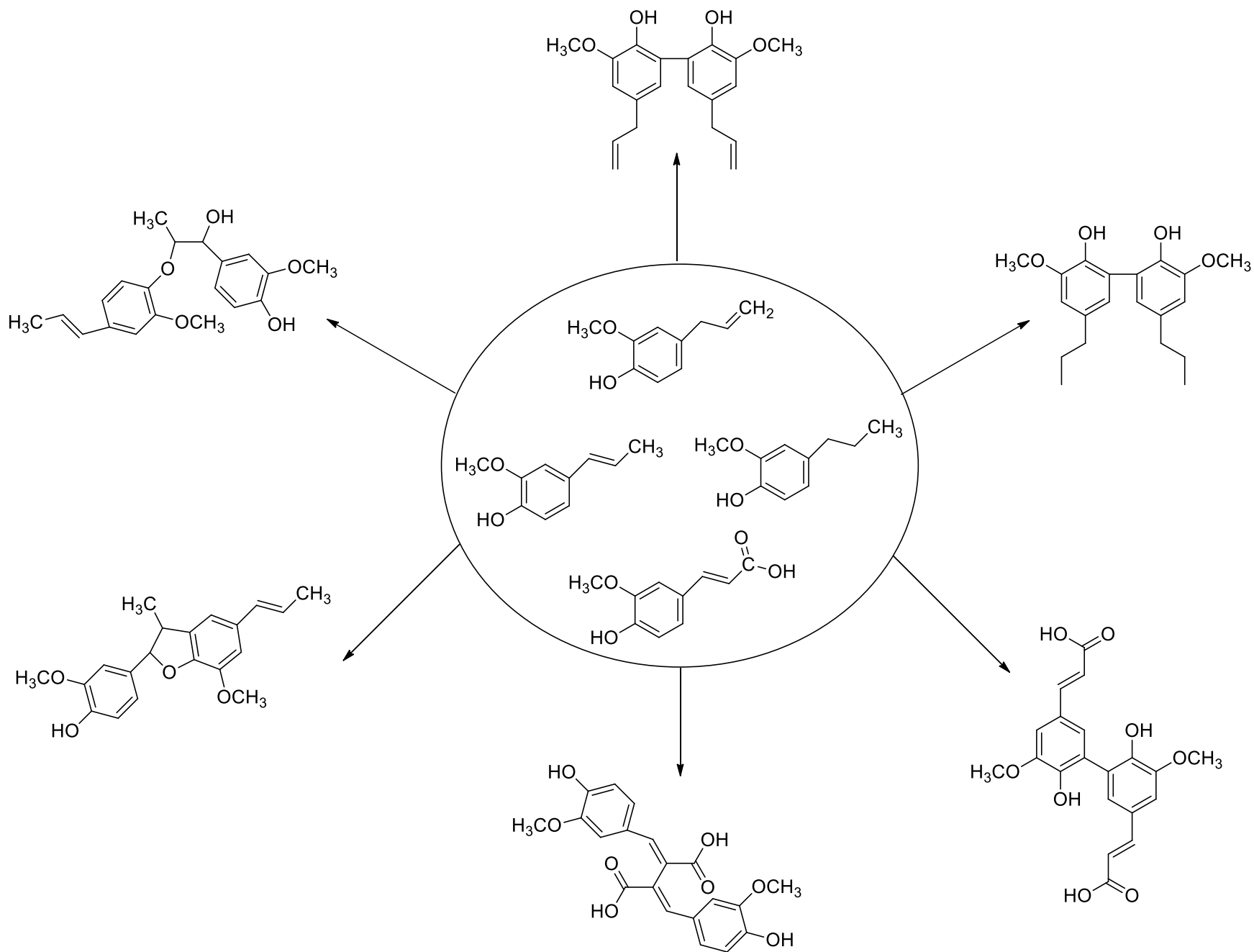


Amorati et al., 2006 J. Agric. Food Chem.

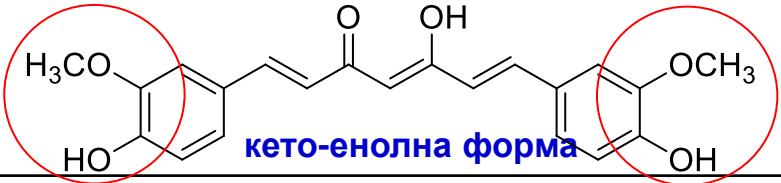

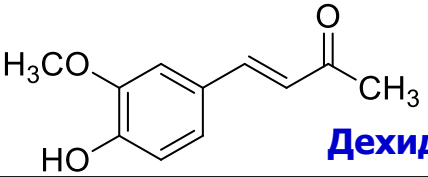
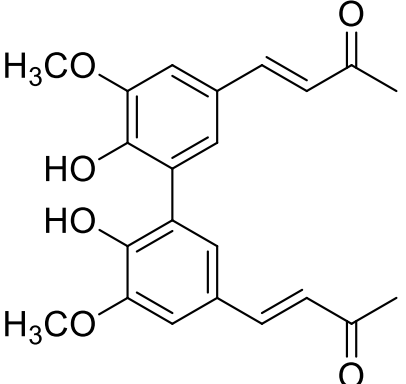
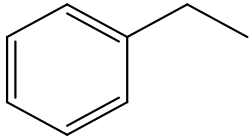
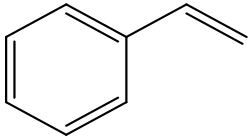


ЗАВИСИМОСТ СТРУКТУРА – АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ ФЕНИЛПРОПАНОИДИ И ТЕХНИТЕ ДИМЕРИ

Фенилпропаноиди и хидроксилирани бифенили



ЗАВИСИМОСТ СТРУКТУРА – АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ

		BDE_{O-H} Kcal/mol	BDE_{C-H} Kcal/mol
 <p>куркумин кето-енолна форма</p>		80,19	116,07
 <p>дикето-форма</p>		82,39	87,36
 <p>Дехидроцингерон</p>		83.49	-
		You-Min Sun, Hong-Yu Zhang et al. (<i>Organic Letters</i>, 2002)	
	BDE_{O-H} Kcal/mol	k_{Inh} (M.s) ⁻¹ Окисляем убстрат:  етилбензен	k_{Inh} (M.s) ⁻¹ Окисляем субстрат:  стирен
Димер на дехидроцингерон	79.53	1.7 10⁴	17 10⁴
Куркумин (кето-енолна форма)	-	-	34 10⁴
Дехидроцингерон	78.94	4.2 10⁴	-
Kazakova et al. (2015)			Barclay et al. (2000)

ЗАВИСИМОСТ СТРУКТУРА – АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ

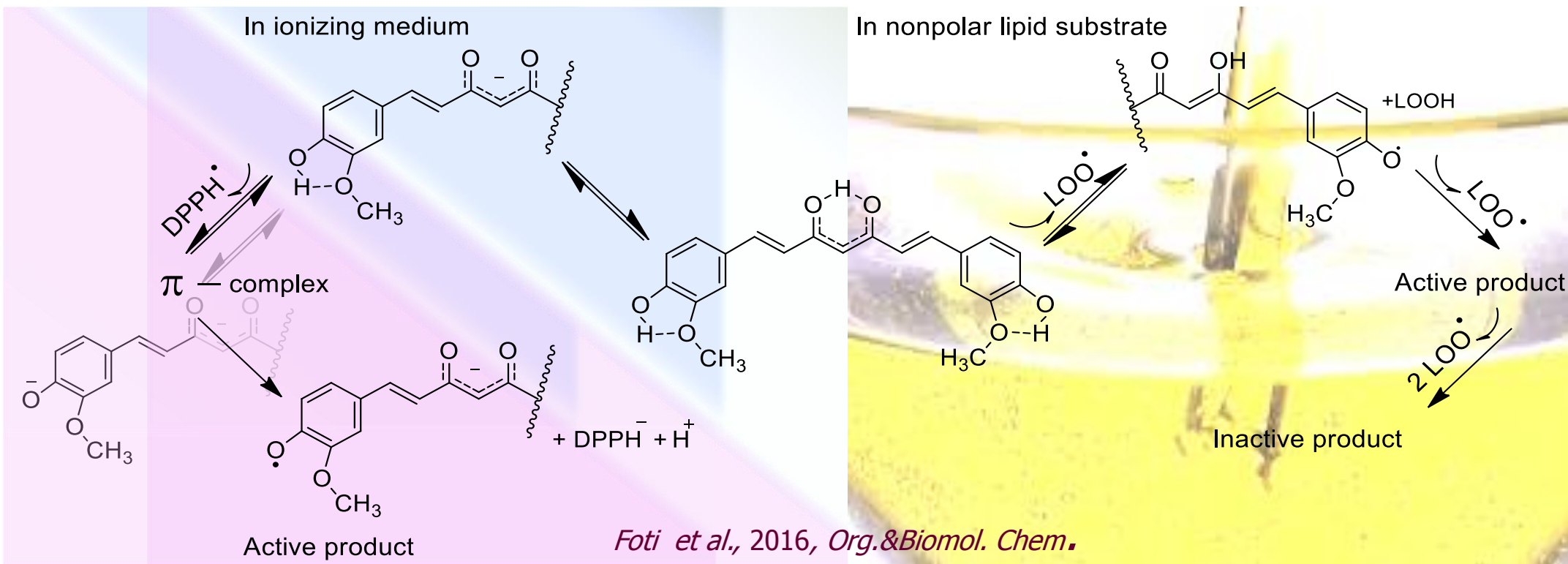
Роля на средата, която е определяща

за механизма



Фенолните групи от молекулата на куркумина са отговорни за антиоксидантната активност по класическия механизъм, включващ реакции на водороден трансфер (Barclay et al., 2000, *Organic Letters*)

Litwinienko & Ingolc (2004, *JOC*) въвеждат концепцията за SPLET- механизма и стигат до заключението, че в йонизираща среда, електронният трансфер се осъществява от кето-енолната част от молекулата на куркумина.



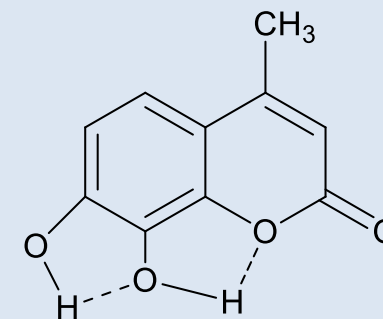
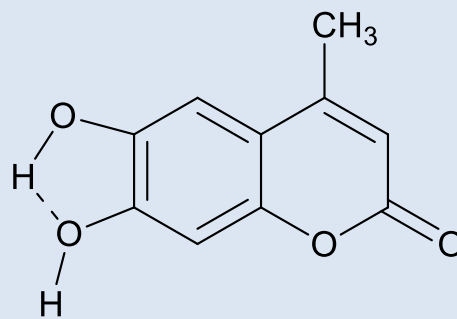
ЗАВИСИМОСТ СТРУКТУРА – АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ ПРИ КУМАРИНИ

➤ Антирадикаловата и антиоксидантната активност при кумарините зависи от присъствието на ОН-групи в бензеновия пръстен **A**, докато приносът на α -пироновия пръстен **B** е от значение за биологичните им свойства.

ОБЩА СТРУКТУРА	Съкратено наименование	Заместители	Наименование
	HC1	$R_4=OH; R_3=R_5=R_6=R_7=R_8=H$	4-хидрокси-кумарин
	MC1	$R_4=CH_3; R_3=R_5=R_6=R_8=H; R_7=OH$	7-хидрокси-4-метил-кумарин
	MC2	$R_4=CH_3; R_3=R_6=R_8=H; R_5=R_7=OH$	5,7-дихидрокси-4-метил-кумарин
	MC3	$R_4=CH_3; R_3=R_5=R_8=H; R_6=R_7=OH$	6,7-дихидрокси-4-метил-кумарин
	MC4	$R_4=CH_3; R_3=R_5=R_6=H; R_7=R_8=OH$	7,8-дихидрокси-4-метил-кумарин

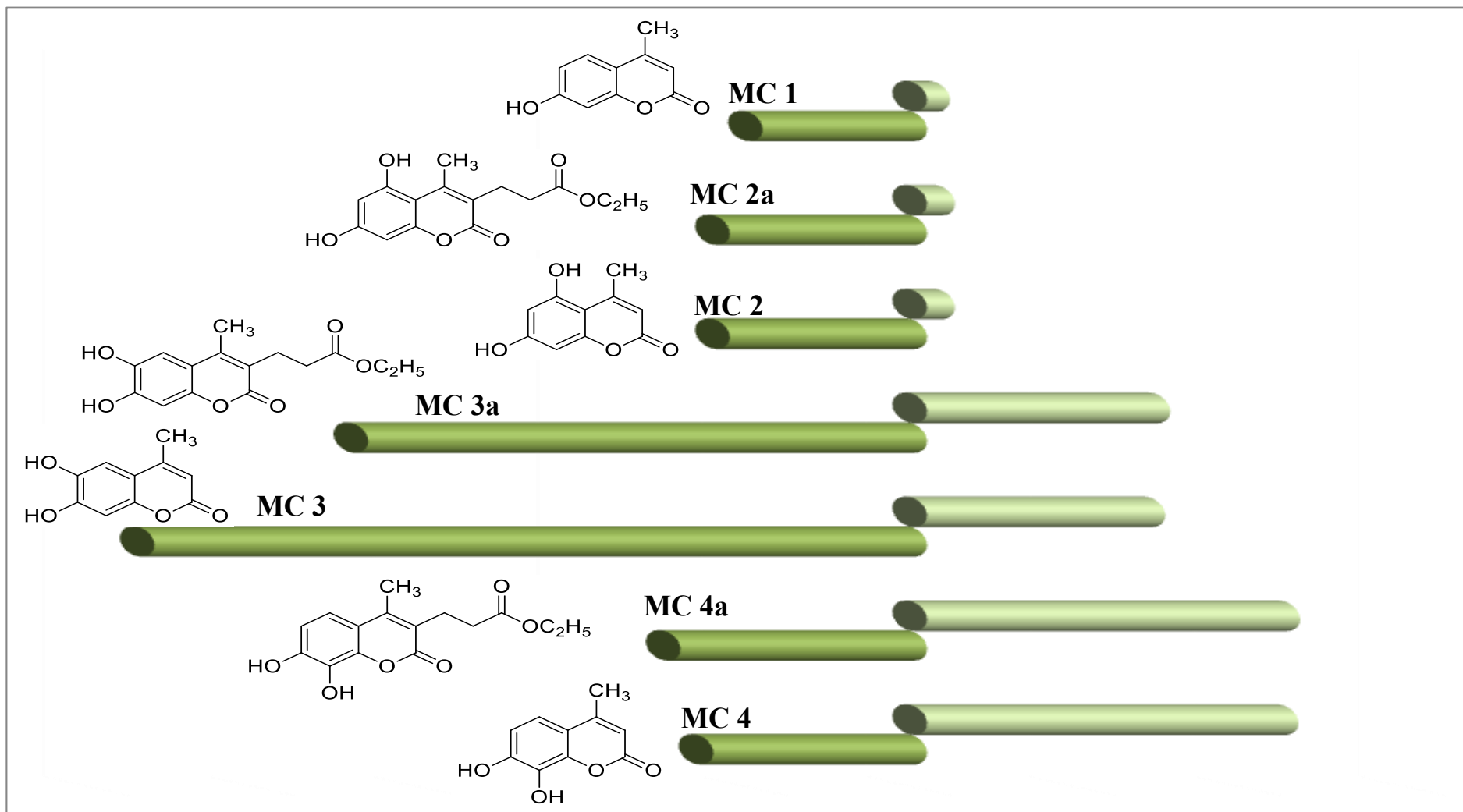
➤ **Ефект на заместителя в пръстен A** – ключова роля играе не броят на фенолните групи, а взаимното им разположение. Кумарините с катехолова структура проявяват значително по-висока антиоксидантна активност от останалите производни като промяната от *орто*- в *мета*- положение на двете фенолни групи води до драстично понижаване в активността.

➤ **Ефект на разположението на катехоловия фрагмент спрямо кислородния O-атом от пионовия пръстен A.**



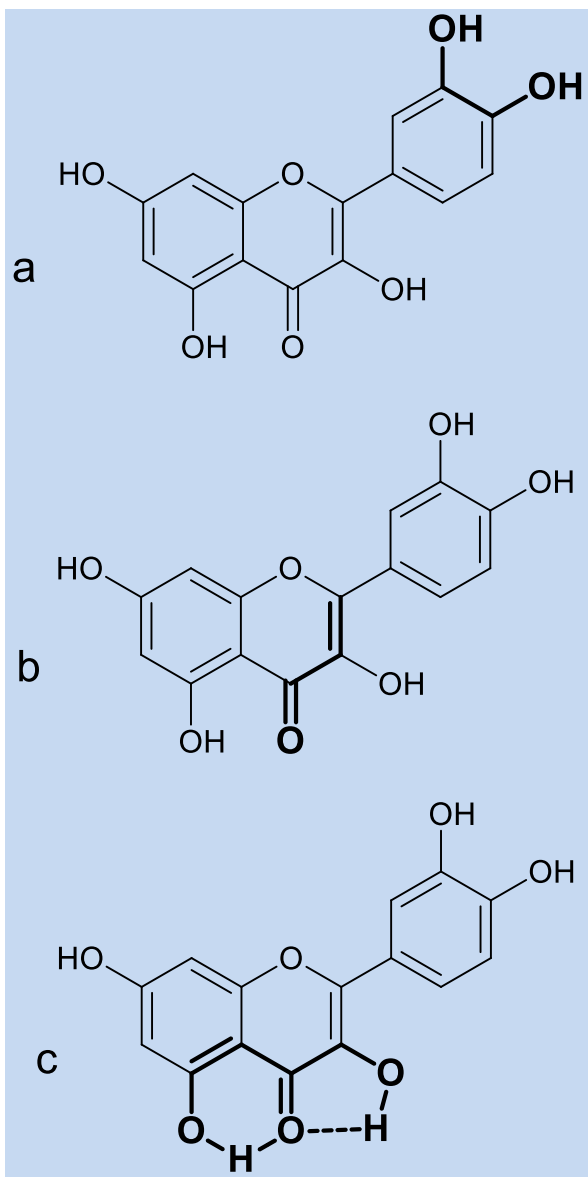
ЗАВИСИМОСТ СТРУКТУРА – АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ

Ефект на заместителите в пръстен В



Схематично представяне на антиоксидантната ефективност на кумарините в концентрация 0.1 mM, изразена като фактор на стабилизиране **PF** (IP_{AOH}/IP_C) на липидния субстрат (със зелените барграфи от ляво) и антирадикаловата активност, изразена със скоростната константа ($k_{RSA} \cdot 10^{-2}$, $M^{-1}s^{-1}$) на реакцията на хидроксикумарините спрямо DPPH• (с барграфите от дясно).

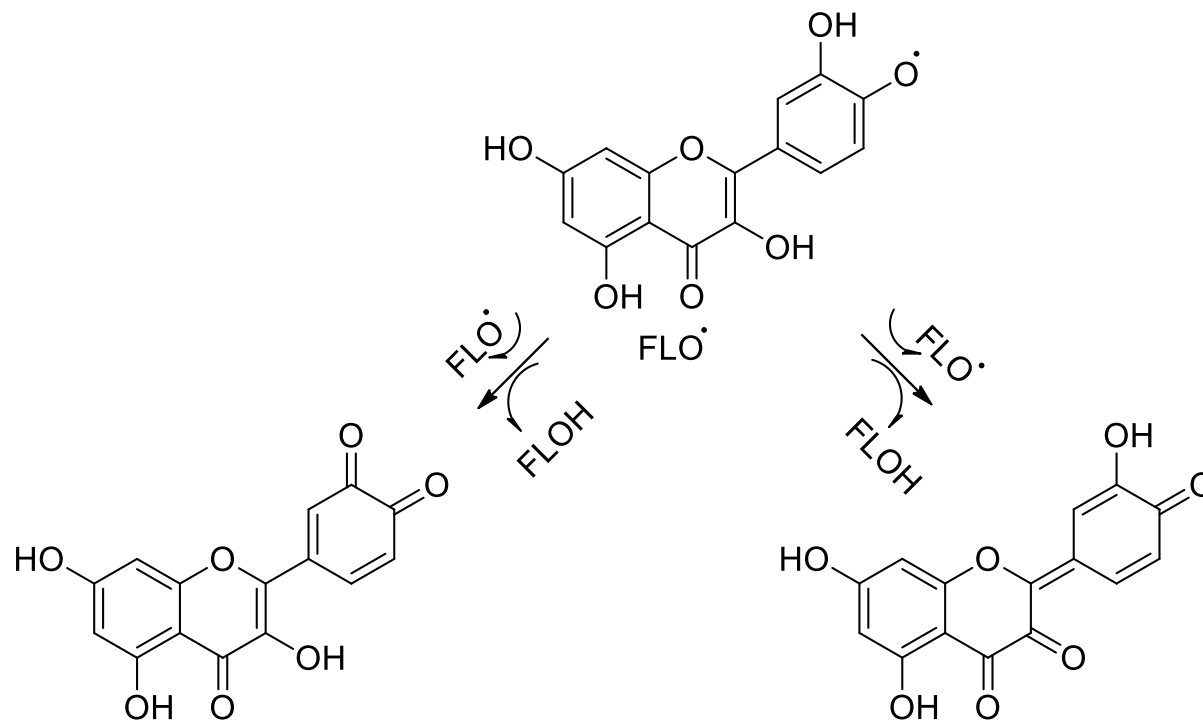
ЗАВИСИМОСТ СТРУКТУРА – АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ ПРИ ПОЛИФЕНОЛИ



W. Bors et al. *Methods Enzymol.*, 1990

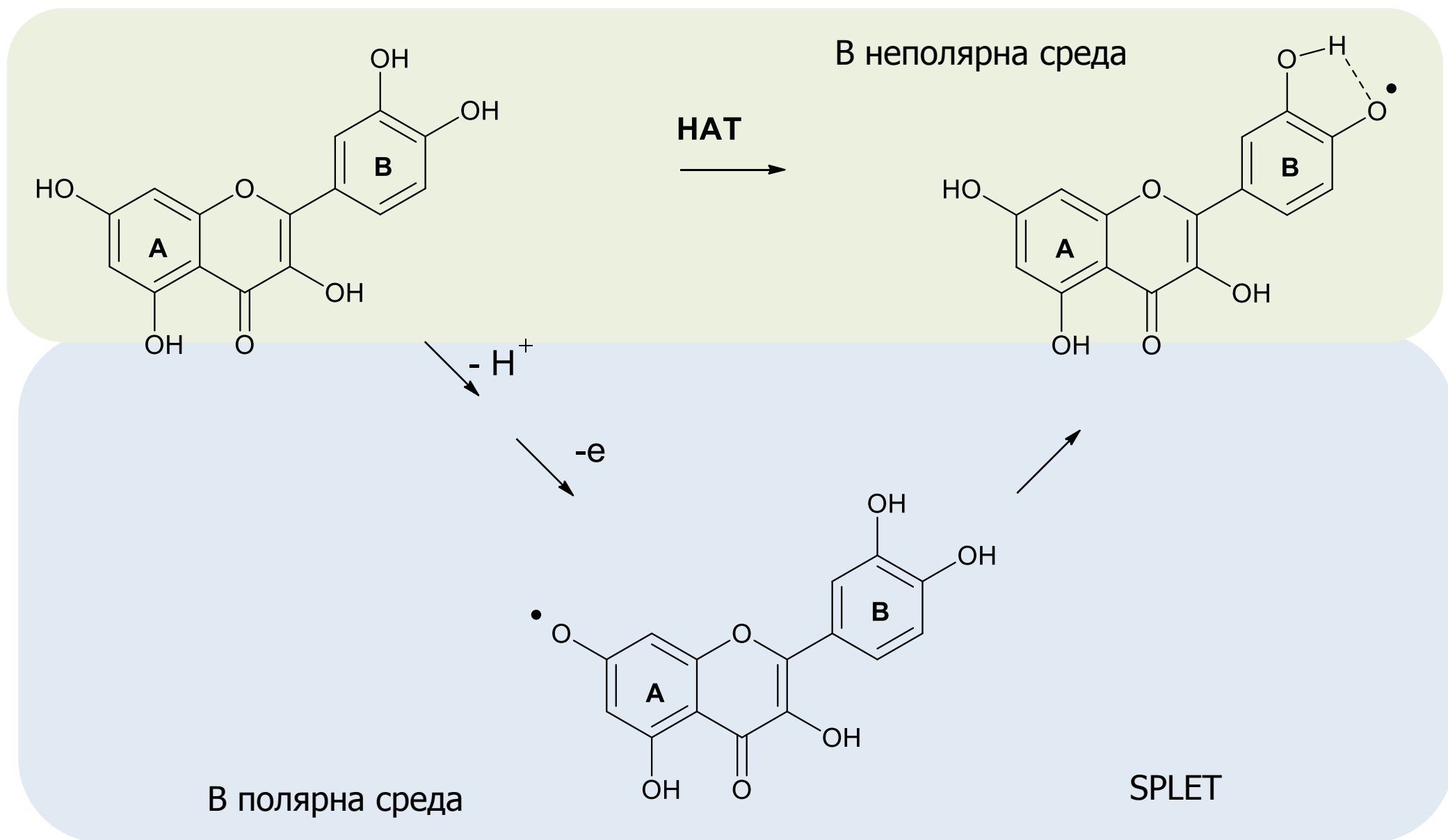
Кверцетинът проявява най-висока антирадикалова и антиоксидантна активност, която се обяснява с наличието на следните структурни фрагменти, съгласно критериите на *Bors et al.* :

- • Наличие на катехолова структура в пръстен **B**;
- • Наличие на ОН-група на пръстен **C**;
- • Наличие на двойна връзка и кето-група в *алфа-положение* спрямо ОН-групата в 3-ТА позиция на пръстен **C**.



V. Kancheva et al. *Rivista Italiana Sostanze Grasse.*, 2007

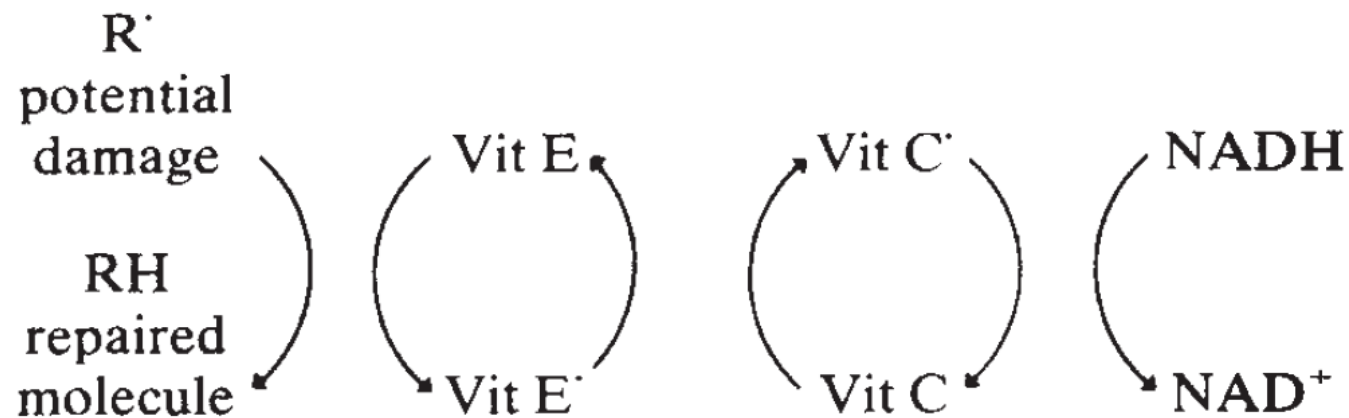
ЗАВИСИМОСТ СТРУКТУРА – АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ ПРИ ПОЛИФЕНОЛИ



ЕФЕКТИ, НАБЛЮДАВАНИ В АНТИОКСИДАНТНИ КОМПОЗИЦИИ, ВКЛЮЧВАЩИ ДВА КОМПОНЕНТА

ИСТОРИЧЕСКИ ПРЕГЛЕД

- Още през 1941г. е доказано от *Golumbic & Mattill*, че в присъствие на аскорбинова киселина се повишава в значителна степен инхибиращата способност на алфа-токоферола и се удължава неговият индукционен период.
- *Tappel* (1968) предлага хипотезата за синергичност между двата компонента като описва предполагаем механизъм: витамин Е е основният антиоксидант в системата и образуваният токоферилен радикал (от реакцията между токоферола и свободните радикали) се регенерира от изходната молекула на витамин С (аскорбиновата киселина).
- Десет години по-късно тази хипотеза е потвърдена и доказана от *Packer et.al* с прилагане на импулсна радиолиза.



Packer, J.E., Slater, T.F., Willson, R.L., Nature 1979

Механизъм на регенериране на токферол в двойни смеси с аскорбинова киселина, или аскорбилпалмитат



$$k_{\text{TOH}} = 5.1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$



$$k_{\text{AscAH}} = 7.5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$



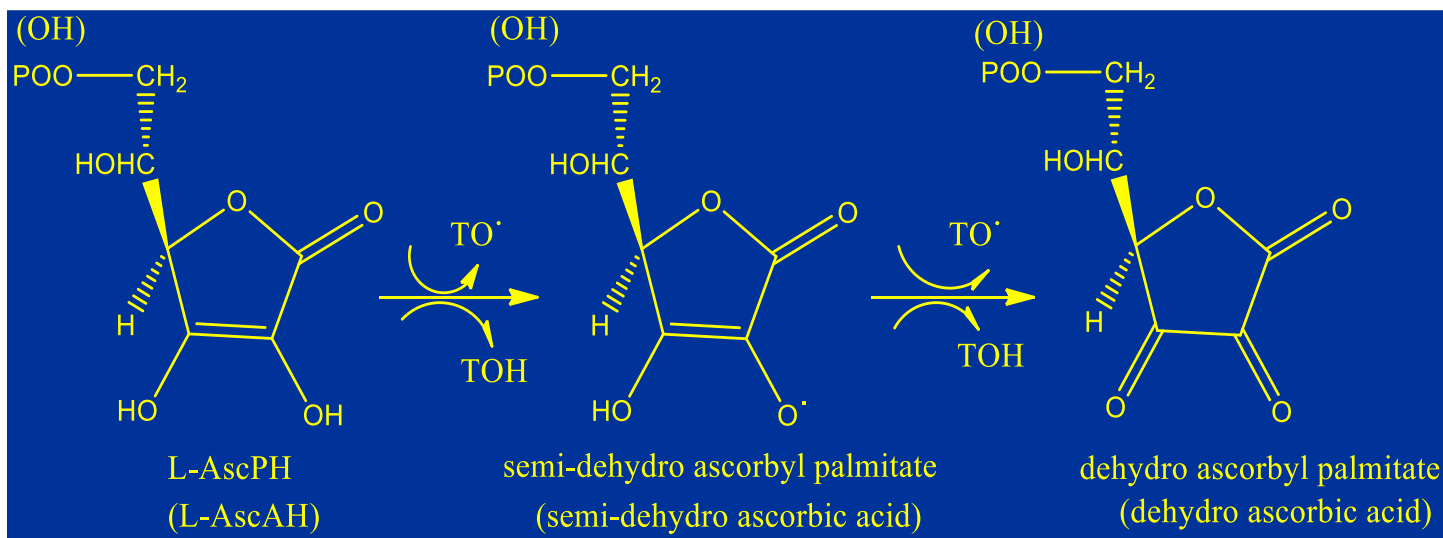
$$k_{\text{TOH+AscAH}} = 4.0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

E.Niki, T.Saito, A.Kawakami, Y.Kamiya, J.Biol.Chem., 259 (1984), 4177-82



$$k_{\text{AscAH}} = 1.56 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

J.E. Packer, T.F.Slatee, R.L. Willson, *Nature*, 278 (1979) 737-738



ЕФЕКТИ, НАБЛЮДАВАНИ В АНТИОКСИДАНТНИ КОМПОЗИЦИИ, ВКЛЮЧВАЩИ ДВА И ПОВЕЧЕ КОМПОНЕНТА

Синергизъм, Адитивизъм и/или Антагонизъм на двойни смеси

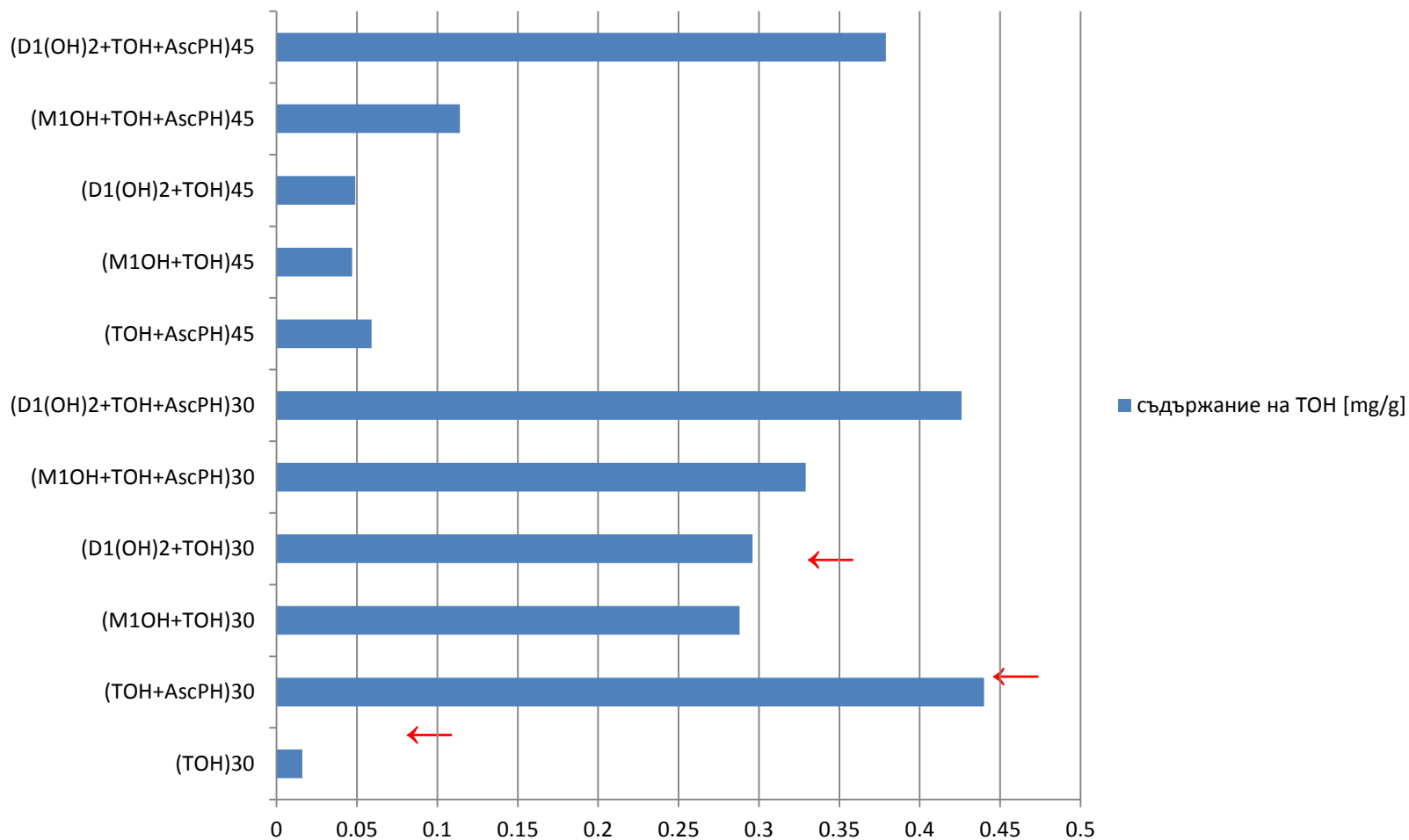
- Синергизъм : $IP_{1+2} > IP_1 + IP_2$
- Адитивизъм : $IP_{1+2} = IP_1 + IP_2$
- Антагонизъм: $IP_{1+2} < IP_1 + IP_2$

E.T. Denisov, T.G. Denisova, Handbook of Antioxidants. Bond Dissociation Energies, Rate Constants, Activation Energies and Enthalpies of Reactions, second ed. ed., CRC Press, New York, 2001.

$$\% \text{Synergism} = 100 [IP_{1+2} - (IP_1 + IP_2) / (IP_1 + IP_2)]$$

Edwin N. Frankel, Lipid Oxidation, The Oily Press Dundee, Scotland, 1998

съдържание на ТОН [mg/g]



Ефект I

$$IP_{\Sigma} > (IP_{AOH} + IP_{TOH} + IP_{AscPH})$$

Ефект II

$$IP_{\Sigma} > (IP_{AscPH} + TOH + IP_{AOH})$$

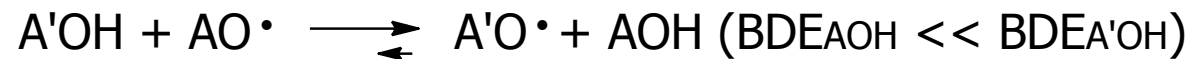
Ефект III

$$IP_{\Sigma} > (IP_{AOH} + TOH + IP_{AscPH})$$

ЕФЕКТИ, НАБЛЮДАВАНИ В АНТИОКСИДАНТНИ КОМПОЗИЦИИ, ВКЛЮЧВАЩИ ДВА И ПОВЕЧЕ КОМПОНЕНТА

Въз основа на систематични изследвания върху синергизма на токоферола, наблюдаван в различни моделни системи, *Amorati et al.* разграничават следните три възможни предпоставки, с които да се обясни или предскаже синергизъм между два компонента

➤ В първия случай реакцията на Н-трансфер от изходната молекула на единия от компонентите в двойната смес - към другия компонент (антиоксидант) се разглежда като необратима. С други думи, когато равновесието е изтеглено почти изцяло в посока на регенриране на единия от двата компонента и обратната реакция може да се пренебрегне:

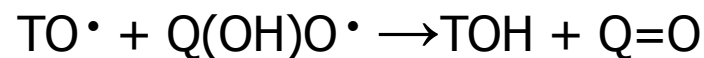


Наблюдава се толкова по-силен ефект (синергизъм), колкото са по-високи скоростта на реакцията и разликата между стойностите за енталпия на дисоциация (ΔBDE) на O-H - връзката, получена за двете съединения.

➤ Във втория случай, когато процесът се разглежда като равновесен, обикновено двете фенолни съединения имат близки стойности за BDE [kcal/mol].



➤ В третия случай синергизмът може да се дължи не на реакциите на Н-трансфер, а на кръстосано диспропорциониране между семихиноновия радикал на катехола и токоферилния радикал (необратим процес):



ПРИЛОЖЕНИЯ НА АНТИОКСИДАНТНИТЕ КОМПОЗИЦИИ



В полимерните материали



В хранителните продукти

В хранителните добавки



За стабилизиране на горива



В медицината

БЪДЕЩИ ПЕРСПЕКТИВИ В ИЗСЛЕДВАНИЯТА

Проекти на лаборатория "Химия на липидите":

ДФНП 126/25.05.2016

"Нови ефективни антиоксидантни композиции на база двойни и тройни смеси"

Българска Академия на Науките, програма за подпомагане на младите учени в БАН
Участници: ас. Д-р Адриана Славова-Казакова и доц. д-р Весела Кънчева

"Изследвания върху антиоксидантната активност на смеси от природни феноли и техни аналози за разработване на фитохимични терапии"

Проект с Националния съвет за научни изследвания, Институт по биомолекулярна химия, Сассари, Сардиния, Италия.

Ръководител от Италия: проф. д-р Джована Делогу

Ръководител от България: доц. д-р Весела Кънчева

Участници: проф. д-р Светлана Симова, гл. ас. д-р Силвия Ангелова, ас. д-р Адриана Славова-Казакова и Лидия Колева.

"Антирадикалова и антиоксидантна активност на традиционни български храни от растителен произход преди и след гама-облъчване"

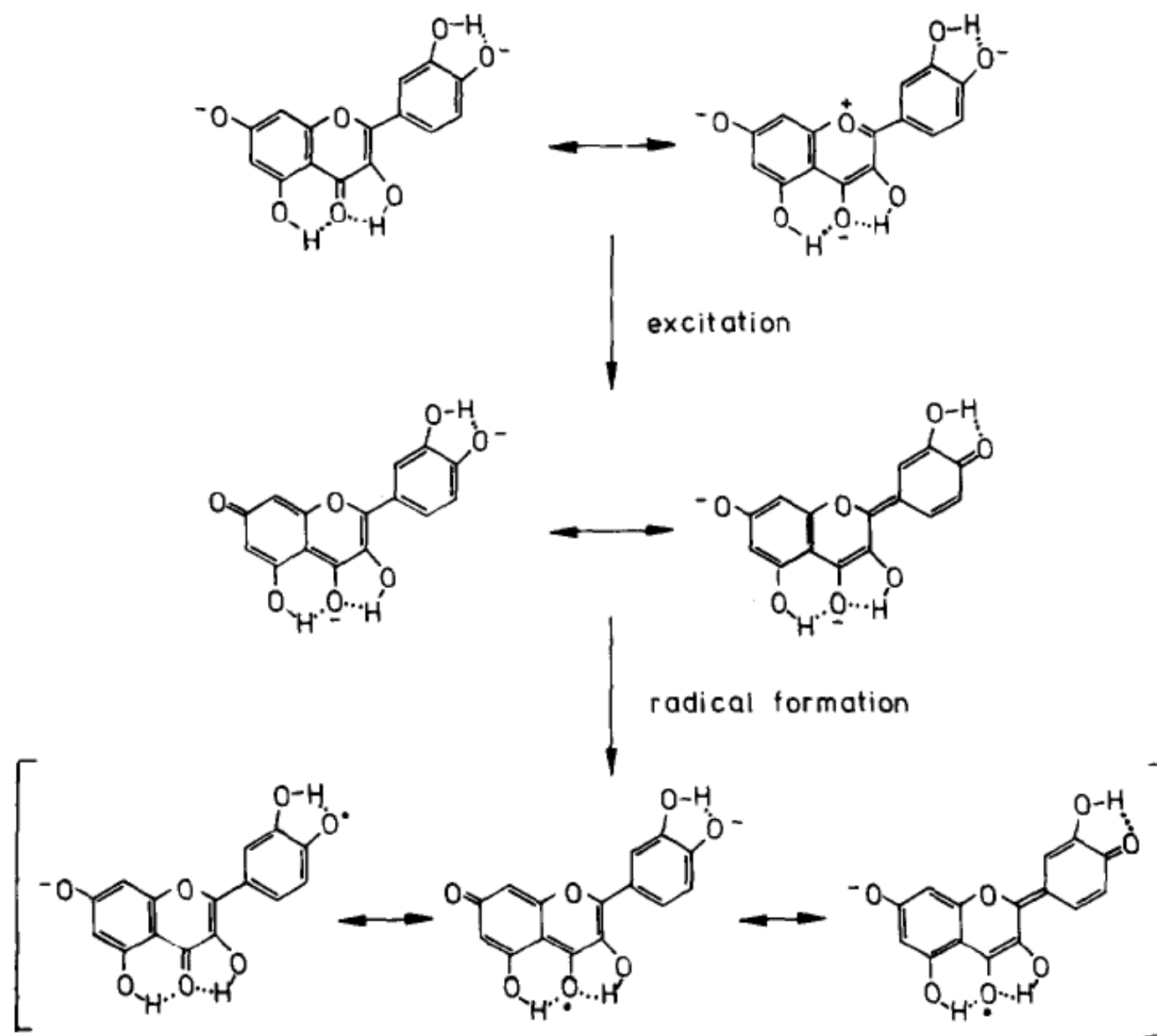
Проект с Институт за репродуктивност на животни и анализ на храни, гр. Олщин към Полската академия на науките.

Ръководител от Полша: проф. д-р Ришард Амарович

Ръководител от България: доц. д-р Весела Кънчева

Участници: доц. д-р Светлана Момчилова, ас. д-р Адриана Славова-Казакова, Лидия Колева и Събина Танева.

**БЛАГОДАРЯ ЗА
ВНИМАНИЕТО**



SCHEME IV. Reactions of quercetin showing principal radical structures involving three ring systems.