

УДК 544.15:547.58

Экспериментальное и теоретическое исследование взаимосвязи «структура-активность» производных коричной кислоты

А.А. Машенцева*, Т.С. Сейтеббетов

Евразийский национальный университет им.Л.Н.Гумилева,
Казахстан 01008, Астана, ул. К.Мунайтыпасаева, 5¹

Received 4.06.2010, received in revised form 11.06.2010, accepted 18.06.2010

Для изучения взаимосвязи «структура-активность» исследован ряд производных коричной кислоты. С использованием современных методов проведен скрининг антирадикальной активности, для всех соединений рассчитаны эффективные коэффициенты ингибирования. Показано, что введение гидроксильного заместителя в молекулу коричной кислоты значительно повышает восстановительные свойства последней. Наличие заместителя в м-положении несколько снижает значение эффективного коэффициента ингибирования IC50. Наиболее эффективными антиоксидантами являются орто-дигидроксизамещенная кофейная и феруловая кислоты; так, по способности ингибировать DPPH-радикал кофейная кислота превосходит коричную в 3,2 раза, бутилированный гидроксанизол (ВНА) – в 1,6 раза. Методами квантовой химии произведен расчет некоторых физико-химических параметров, определяющих восстановительные свойства молекул – потенциал ионизации (IP), энергию сродства к электрону и энтальпию диссоциации ОН-связи. Коричная кислота, не имеющая в структуре молекулы гидроксильных групп, имеет самый высокий IP, м-положение ОН-группы в гидроксикоричной кислоте, немного понижает восстановительную способность по сравнению с о-замещением. Минимальное значение IP хлорогеновой и аскорбиновой кислот подтверждает их высокий антиоксидантный статус. Проведен корреляционный анализ экспериментальных и теоретических данных (коэффициентом достоверности $R^2=0,5265$).

Ключевые слова: оксикоричные кислоты, антирадикальная активность, энтальпия диссоциации ОН-связи, потенциал ионизации.

Введение

Фенилпропаноиды широко распространены в лекарственных растениях. Они обладают разнообразными биологическими свойствами, что даёт основание для создания на их основе эффективных тонизирующих, иммуностимулирующих, гепатопротекторных, антибластомных, антимикробных, противо-

воспалительных препаратов. Это послужило основанием для выделения их в самостоятельную группу биологически активных соединений и нашло отражение в химической классификации лекарственных растений [1].

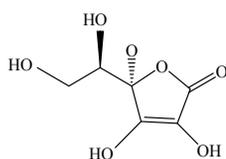
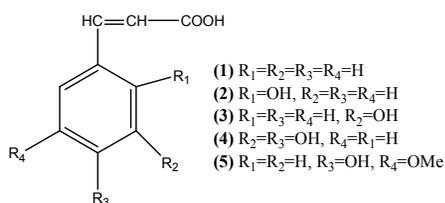
Для изучения механизма исследования взаимосвязи «молекулярная структура – активность» в ряду полифенольных соединений

* Corresponding author E-mail address: mashentseva.a@gmail.com

¹ © Siberian Federal University. All rights reserved

различных классов нами были рассмотрены в качестве модельных систем оксипроизводные коричневой кислоты.

В ряду коммерчески доступных оксикоричневых кислот нами были проведены *in vitro* исследования антирадикальной активности, а также выполнены квантово-химические расчеты некоторых физико-химических величин, наиболее достоверно характеризующих восстановительную активность изучаемых объектов.



(7)

Нами были рассмотрены следующие производные коричневой кислоты (1): *o*-кумаровая (2), *m*-кумаровая (3), кофейная (4), феруловая (5), а также наиболее распространенная в природе хлорогеновая кислота (6) (кофеил-3-хинная кислота). Причиной включения в данный ряд хлорогеновой кислоты стало исследование синергетического эффекта комбинирования в одной молекуле двух различных кислот – кофейной и хинной. Можно предположить, что данная особенность строения хлорогеновой кислоты обеспечит наиболее высокую АОА (антиоксидантная активность).

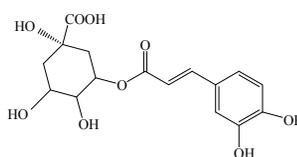
В качестве веществ сравнения были использованы:

Аскорбиновая кислота (7) – главный растворимый в воде антиоксидант.

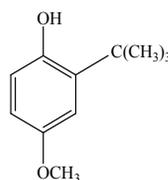
ВНА – бутилоксианизол (8), антиоксидант, используемый в пищевой отрасли промышленности для замедления окисления животных топленых жиров, солёного шпика, жевательной резинки.

Материалы и методы

коричневая кислота ($\geq 99\%$), феруловая кислота ($\geq 99\%$), *m*-кумаровая кислота ($\geq 98\%$), кофейная ($\geq 99\%$), (1,1-дифенил-2-пикрилгидразил), АВТС⁺ (2,2'-азинобис-(3-



(6)



(8)

этилтиазолин-6-сульфонат) катион-радикал ($\geq 99\%$) – Fluka (Belgium), *o*-кумаровая кислота ($\geq 97\%$), хлорогеновая кислота ($\geq 95\%$) были получены из Sigma Aldrich (Belgium). Все остальные реактивы были аналитического качества и использовались без предварительной очистки.

Спектрофотометрические исследования проводили с применением цифрового спектрофотометра РД -303 АРЕL, Япония.

Взаимодействие с АВТС⁺ катион радикалом

Для генерирования радикала 5 мл 14 мМ раствора АВТС (0,0385 г АВТС в 5 мл деионизированной воды) смешивали с 5 мл персульфата калия (0,0066 г в 5 мл деионизированной

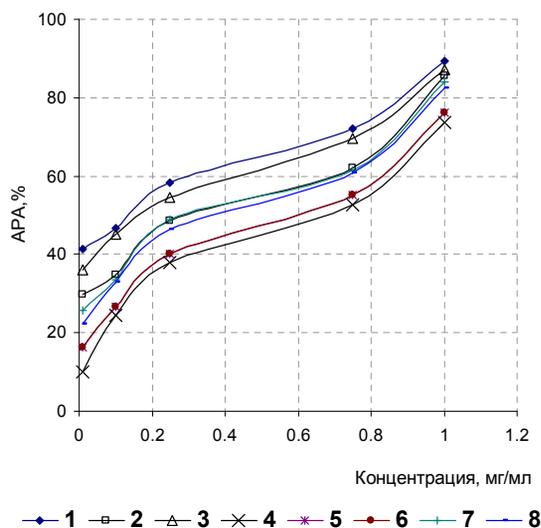


Рис. 1. Динамика изменения антирадикальной активности исследуемых соединений по отношению к DPPH радикалу

воды). Полученную смесь оставляли на 16 ч в темном месте. Для определения антирадикальной активности 10 мкл образца, в диапазоне концентраций 0,01-1 мг/мл, добавляли к 990 мкл рабочего раствора радикала (предварительно разбавленного этанолом до значения оптической плотности $0,700 \pm 0,020$ при 734 нм). Была исследована динамика ингибирования $ABTS^{+}$ катион-радикала во времени. Анализ проводился для концентрации 0,5 мг/мл в интервале 0-15 мин.

Значения антирадикальной активности (АРА) определяли по формуле

$$APA(\%) = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \cdot 100, \quad (1)$$

где A_0 – оптическая плотность при $t=0$ мин и A_t – оптическая плотность, измеренная после 1 мин.

*Ингибирование DPPH
(1,1-дифенил-2-пикрилгидразил)
радикала*

Аликвоту исследуемого образца в диапазоне концентраций 0,01-1 мг/мл (0,1 мл) добавляли к 3 мл 6×10^{-5} М этанольного рас-

творителя радикала. После интенсивного перемешивания растворы оставляли в темноте на 30 мин. Изменение оптической плотности регистрировали при 520 нм. АРА определяли по формуле

$$APA(\%) = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \cdot 100, \quad (2)$$

где A_0 – оптическая плотность исследуемого образца; A_t – оптическая плотность контрольной пробы (в отсутствие антиоксиданта).

Результаты и обсуждение

Антирадикальная активность исследуемых кислот была изучена по отношению к DPPH (1,1-дифенил-2-пикрилгидразил) радикалу и $ABTS^{+}$ (2,2'-азинобис-(3-этилтиазолин-6-сульфонат) катион радикалу.

На рис. 1 приведены графические зависимости изменения антирадикальной активности в диапазоне концентраций (0,01-1,0 мг/мл).

Как видно из представленных данных, изменение АРА носит концентрационный характер для всех изучаемых соединений и равномерно увеличивается при увеличении

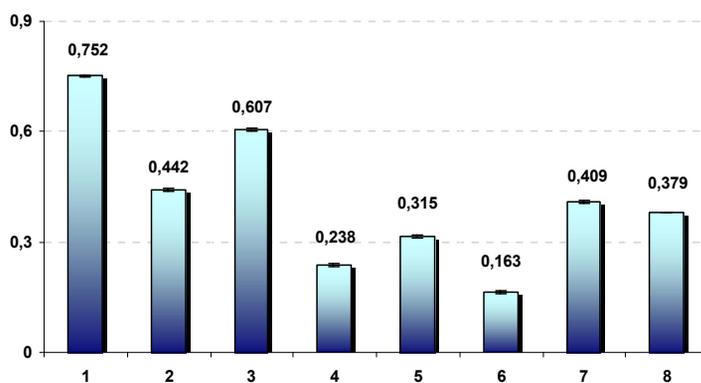


Рис. 2. Эффективный коэффициент ингибирования DPPH-радикала

концентрации вводимого восстановителя. Однако для вещества стандарта – аскорбиновой кислоты – максимальное значение АРА наблюдается при концентрации 0,25 мг/мл, дальнейшее увеличение количества аскорбиновой кислоты приводит к понижению показателя АРА. Это вполне хорошо согласуется с данными о возможном проявлении прооксидантных свойств витамина С при избыточном количестве [2].

На основании полученных данных нами был произведен расчет эффективного коэффициента ингибирования IC_{50} , указывающего минимальное количество антиоксиданта, необходимого для ингибирования 50 % радикала в реакционной среде. Данные IC_{50} представлены на рис. 2.

Наименьшее значение данного параметра указывает на более высокую антиоксидантную активность.

Аналогичные исследования концентрационной зависимости были проведены с $ABTS^+$ катион-радикалом. Полученные данные отражены на рис. 3.

Наименьшее значение АРА для коричной кислоты, несомненно, обусловлено отсутствием гидроксильных групп в структуре молекулы. При сравнении АРА *o*- и *m*-кумаровой кислот с аналогичным показателем коричной можно предположить, что введение гидрок-

сильного заместителя в состав кислоты повышает восстановительные свойства, так как подвижный протон О-Н группы является первичным центром ингибирования радикала.

Наиболее наглядно о влиянии молекулярной структуры можно судить по анализу данных эффективного коэффициента ингибирования.

Расчитанные значения IC_{50} представлены на рис. 4. Расчет проводили построением корреляционной прямой типа $y=kx+b$, при этом значение коэффициента достоверности проведенной корреляции R^2 находилось в интервале 0,8-0,95, что свидетельствует о высокой достоверности проведенной аппроксимации.

Так, наличие двух гидроксильных групп в *m*- и *n*-положениях кофейной кислоты (**4**) значительно понижает IC_{50} по сравнению с кумаровыми кислотами, имеющими всего одну гидроксогруппу. Хотелось бы отметить, что наличие метоксильной группировки в феруловой кислоте (**5**) оказывает благоприятное влияние на АРА. Наименьшее значение IC_{50} (даже по сравнению с данными стандартных веществ) наблюдается для хлорогеновой кислоты (**6**), имеющей в своем составе четыре подвижных водорода гидроксильных групп.

Представлялось также интересным изучение динамики ингибирования $ABTS^+$

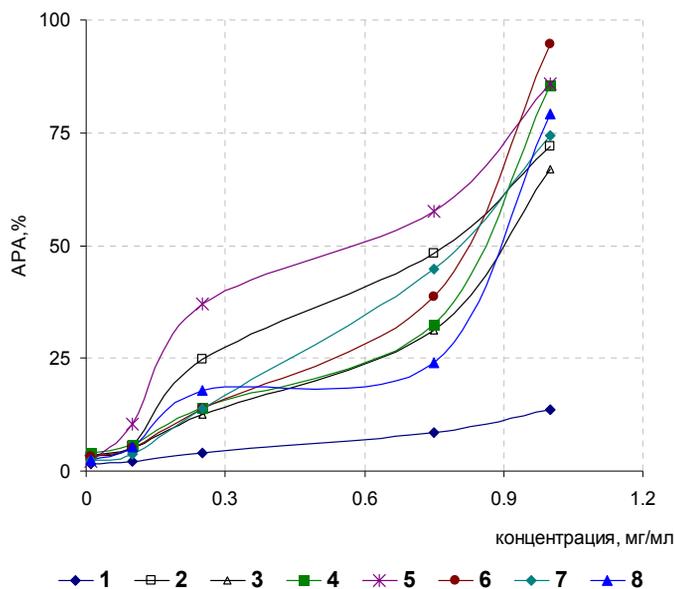


Рис. 3. Динамика изменения антирадикальной активности оксикоричных кислот по отношению к ABTS⁺ радикалу.

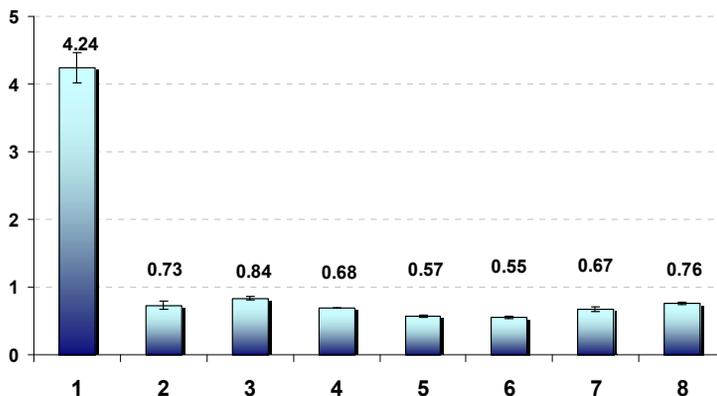


Рис. 4. Эффективный коэффициент ингибирования ABTS⁺ катион-радикала

катион-радикала во времени. Анализ проводился для концентрации 0,5 мг/мл в интервале 0-15 мин (рис. 5).

Согласно используемой методике [3] исходный раствор радикала имеет поглощение $0,70 \pm 0,02$, что отчетливо регистрируется на рис. 5. Введение в реакционную среду 10 мкл антиоксиданта снижает количество радикала и понижает оптическую плотность раствора. Сильные антиоксиданты уже в начальный момент времени значительно ингибируют свободные радикалы, как это видно в случае

аскорбиновой кислоты (7). По истечении 3-4 мин все исследуемые соединения понижают оптическую плотность реакционной смеси почти в два раза, и окончательное обесцвечивание раствора происходит в интервале 12-15 мин. Дальнейшие исследования показывают стабильность значений поглощения растворов, что свидетельствует о полном ингибировании имеющегося радикала.

Все изучаемые оксикоричные кислоты демонстрируют высокую антирадикальную активность, при этом значения эффективного

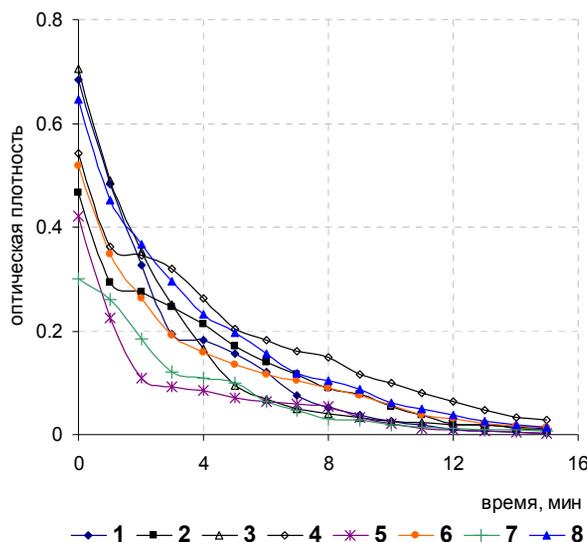


Рис. 5. Динамика ингибирования $ABTS^{\bullet+}$ катион-радикала во времени

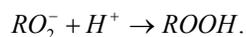
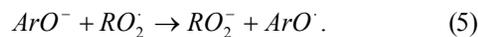
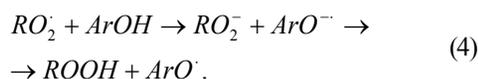
коэффициента ингибирования для феруловой и хлорогеновой кислот значительно больше данного показателя стандартных веществ — ВНТ и аскорбиновой кислоты.

Представлялся интересным также анализ корреляции между данными экспериментальных исследований и теоретических расчетов.

Нами были проведены *ab-initio* расчеты рассмотренных выше оксикоричных кислот с использованием программного пакета Gaussian 2003 [4].

Предполагается [5], что существуют три возможных механизма реализации антиоксидантной активности флавоноидов ($ArOH$) и их производных. Первый механизм обусловлен прямым переносом атома водорода от молекулы антиоксиданта на молекулу радикала (ROO^{\bullet}) (1). Второй механизм включает непосредственный перенос электрона от антиоксиданта к радикалу, приводящий к дальнейшему отделению протона (2) и образованию более стабильного флавоксильного радикала (ФР). Третий механизм, именуемый последовательным протонно-электронным переносом (3), может быть реализован лишь при образовании аниона (ArO^{-}). Все вышеперечисленные механизмы могут протекать одновременно, но с различными скоростями.

численные механизмы могут протекать одновременно, но с различными скоростями.



Механизм (3) характеризуется энтальпией диссоциации O-H-связи флавоноидов, в то время как (4) непосредственно связан со значением потенциала ионизации молекулы и реакционной активностью формирующегося катион-радикала ($ArO^{\bullet+}$). В последнем механизме антиоксидантная активность обусловлена энтальпией гетеролитического разрыва O-H-связи и потенциалом ионизации аниона (ArO^{-}) как определяющего параметра.

Нами были проведены расчеты таких показателей, как потенциал ионизации (IP), энергия сродства к электрону (EA) и энтальпия диссоциации O-H-связи (BDE).

Таблица 1. Физико-химические параметры исследуемых реакционных систем

№	Положение О-Н-связи	IP, В	EA, эВ	BDE, кКал/моль
1	COO-H	0.361	0.223	87.835
2	о-положение	0.332	0.216	61.362
	COO-H			159.827
3	м-положение	0.335	0.216	61.638
	COO-H			91.832
4	C3 O-H	0.312	0.209	60.848
	C4 O-H			65.019
	COO-H			90.664
5	C5 O-H	0.311	0.208	61.305
	COO-H			136.814
6	C29 O-H	0.246	0.209	187.471
	C33 O-H			182.598
	C1 O-H			84.253
	C6 O-H			118.288
	C4 O-H			126.658
	COO-H			138.752
7	C6 O-H	0.289	0.213	73.076
	C7 O-H			73.691
	C11 O-H			79.583
	C13O-H			82.152
8	O-H	0.306	0.179	61.538

Потенциал ионизации (IP) и сродство к электрону (EA) по теореме Купманса могут быть найдены из энергий граничащих молекулярных орбиталей ВЗМО и НСМО соответственно.

Расчет энергий ВЗМО и НСМО проводили неэмпирическим методом в RHF-приближении (ограниченном Хартри-Фока) и в полноэлектронном валентно-расщепленном базисном наборе 6-311G(d), так как известно, что ВЗLYP-приближение, независимо от базисного набора, занижает значения потенциалов ионизации приблизительно на 2 эВ для различных структур, в то время как HF-приближение, как считают авторы [6], дает хорошее согласие с экспериментальными данными.

В соответствии с определением энтальпию диссоциации связи (BDE) рассчиты-

вали с использованием UHF 6-31G(d,p) по формуле

$$BDE = H_r + H_h - H_p, \quad (6)$$

где H_r – энтальпия радикала, образованного вследствие отрыва атома водорода, H_h – энтальпия атома водорода (-0,498 а.у.), H_p – энтальпия нейтральной исходной молекулы.

В табл. 1 представлены рассчитанные физико-химические параметры исследуемых оксикоричных кислот и веществ- стандартов – аскорбиновой кислоты и ВНА.

Приведенные в таблице значения хорошо согласуются с полученными данными IC₅₀ для ABTS⁺ катион-радикала.

Потенциал ионизации определяет восстановительную активность соединения – его способность легко отдавать электрон. Корич-

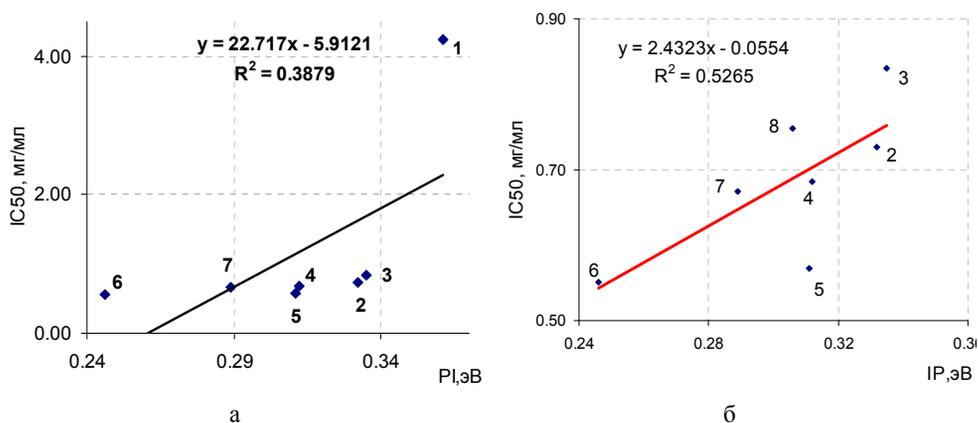


Рис. 6. График корреляции теоретических и экспериментальных данных изучения оксикоричных кислот: а – для соединений 1-7; б- для соединений 2-8

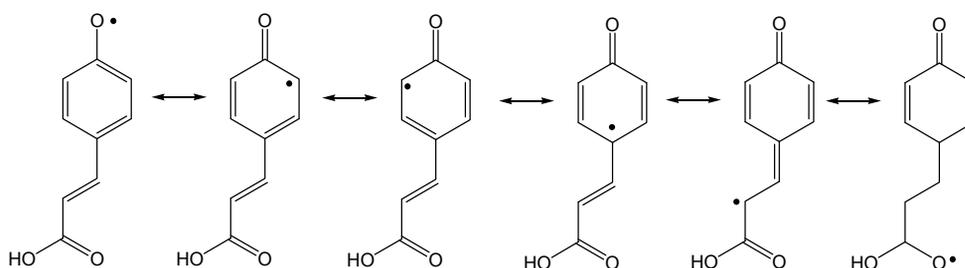


Рис. 7. Схема стабилизации радикала п-оксикоричной кислоты

ная кислота, не имеющая в структуре молекулы гидроксильных групп, обладает самым высоким IP, *m*-положением OH-группы в гидроксикоричной кислоте, немного понижает восстановительную способность по сравнению с *o*-замещением. Минимальное значение IP хлорогеновой и аскорбиновой кислот подтверждает их высокий антиоксидантный статус.

Для выявления взаимосвязи «структура-активность» с использованием возможностей Excel 2003 проведен сравнительный анализ экспериментальных данных IC₅₀ для ABTS⁺ катион-радикала и значениями потенциала ионизации, результаты которого представлены на рис. 6а.

Построение подобного графика позволяет определить, для какого из изучаемых соединений в большей степени соблюдается

соотношение «структура-активность». Как видно, наиболее удалена точка, соответствующая коричной кислоте, идеальное соответствие корреляции подобранных параметров наблюдается для вещества-стандарта – аскорбиновой кислоты. Также достаточно близко к прямой расположены точки (4) и (5) кофейной и феруловой кислот соответственно. Коричная кислота (1), обладающая самой низкой антирадикальной активностью, находится на самом большом расстоянии от прямой аппроксимации; в связи с этим нами дополнительно был построен аналогичный график, но без учета данных коричной кислоты (рис. 6б). Исключение коричной кислоты позволяет провести прямую с коэффициентом корреляции R²=0,5265. Все точки исследуемых кислот и веществ стандартов лежат в непосредственной близости от построенной прямой, что

указывает на правильность выбора используемых нами параметров для определения корреляции «структура-активность».

Производные оксикоричной кислоты, в которых карбоксильная группа отделена от ароматического кольца виниленовым мостиком, характеризуются более высокой антиоксидантной активностью, чем соответствующие производные бензойной кислоты [7].

Данный факт хорошо согласуется с дополнительной стабилизацией феноксилов, образованных оксикоричными кислотами, за счет делокализации неспаренного электрона на виниленовый фрагмент (рис. 7).

Заключение

Результаты проведенных *in vitro* исследований антирадикальной активности, а также квантово-химических расчетов некоторых

физико-химических параметров производных коричной кислоты указывают, что введение гидроксильного заместителя в молекулу коричной кислоты значительно повышает восстановительные свойства последней. Наличие заместителя в *m*-положении несколько снижает значение эффективного коэффициента ингибирования IC₅₀. Однако наиболее эффективным антиоксидантом является *орто*-дигидроксизамещенная кофейная кислота; так, по способности ингибировать DPPH-радикал кофейная кислота превосходит коричную в 3,2 раза, ВНА – в 1,6 раза. Высокая противокислительная активность производных коричной кислоты обусловлена наличием в структуре молекулы виниленового компонента, который является реакционным центром и испытывает влияние заместителей бензольного кольца.

Список литературы

1. Блажей А., Шутый Л. Фенольные соединения растительного происхождения. – М.: Мир, 1977. – С. 15-25.
2. Зайцев В.Г., Островский О.В., Закревский В.И. Связь между химическим строением и мишенью действия как основа классификации антиоксидантов прямого действия // Эксперим. клин. фармакол.- 2003.- Т.66, № 4.- С.66-70.
3. Re R.; Pellegrini N.; Proteggente A.; Pannala A.; Yang M.; Rice-Evans C Free Radical Biology and Medicine. 1999. – Vol. 26 (9). – P. 1231.
4. Frisch, M. J.; Trucks G. W.; Schlegel et al. Gaussian 03, Rev B.01, Gaussian, Inc., Pittsburgh, 2003.
5. Reis M., Lobato B, Lameira J., Santos AS., Alves CN. A theoretical study of phenolic compounds with antioxidant properties // European Journal of Medicinal Chemistry. 2007. V.42. P.440-446.
6. Функ А.А., Коренек В.В. Индексы электрофильности монолигнолов – модельных соединений лигнина//Химия растительного сырья. 2008. №3. С. 39–44.
7. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. – М., 2006. – 418 с.

The Study of the “Structure-Activity” Relationship For a Cinnamic Acid Derivatives

Anastassiya A. Mashentseva and Talgat S. Seitembetov

*The L.N.Gumilev Eurasian National University
5 Munaitpasov, Astana, 010008 Republic Kazakhstan;*

The “structure-radical scavenging activity” relationship for some cinnamic acid derivatives was investigated. The radical scavenging activity (RSA) using modern assays were studied and the effective coefficients for all compounds were calculated. It was founded that hydroxyl group presence is increasing the reduction properties of the cinnamic acid, and the m- substitute presence is decreasing the IC50 value. The most effective antioxidants are o-dihydroxy substituted caffeic and ferulic acids; it could exceed the DPPH RSA of the cinnamic acid in 3.2times, BHA – in 1.6 times.

Using quantum-chemistry program some physic-chemical properties like as ionization potential (IP), electron affinity energy and O-H bond dissociation enthalpy, which can be used as an antioxidant activity descriptors were calculated. The not having any O-H group in structure cinnamic acid has the highest value of IP, m-substitution of O-H group in hydroxyl cinnamic acid is decreasing the reduction ability as compared to o-substitution. The highest antioxidant potential of the chlorogenic and ascorbic acids is confirmed by the least IP values.

The correlation analysis for the experimental and theoretical data was searched with the confidence factor value $R^2=0.5265$

Keywords: hydroxy cinnamic acids; radical scavenging activity; bond dissociation enthalpy; ionization potential
