

## ИЗСЛЕДВАНЕ НА РАДИКАЛ-УЛАВЯЩА СПОСОБНОСТ

<sup>1</sup>Станислав Станимиров, <sup>2</sup>Живко Велков

<sup>1</sup>Софийски университет „Св. Климент Охридски“

<sup>2</sup>Югозападен университет „Неофит Рилски“

**Резюме.** Радикал-улавящата активност на едно вещество определя в голяма степен неговата антиоксидантна активност, но между двете не бива да се поставя знак на равенство. Квантово-химичният подход е един широко използван подход за изучаване на тази активност. В тази статия са описани основните механизми на взаимодействие между радикали и радикал-уловители и свързаните с тях квантово-химични дескриптори. Очертани са също основните предимства и недостатъци на този подход, както и перспективите за използването му в бъдеще.

**Keywords:** radical-scavenging, antioxidant, quantum-chemistry, reaction mechanisms

### Увод

Дже в хода на нормалните окислителни процеси във висшите организми се получават високореактивностпособни кислород-съдържащи реагенти (reactive oxygen species), които участват в нежелани химични реакции в клетките. Най-често това са радикали (активни радикали) – съдържащи несдвоен електрон.

Казва се, че организъмът се намира в състояние на оксидативен стрес, когато концентрацията на тези активните радикали в организма е по-висока от нормалното и това състояние се свързва с процесите на стареенето, канцерогенезата, възникването на сърдечно-съдови заболявания, появата на проблеми със зрението, болестта на Алцхаймер и т. н. (Helmut, 1997; Pryor, 2000).

Извеждане от състояние на оксидативен стрес може стане със собствени за организма (ендогенни) средства или с помощта на храни, хранителни добавки или лекарства - (екзогенни) средства, които се наричат антиоксиданти.

Антиоксидантите са вещества, които успяват да понижат количеството на свободни радикали във висшите организми, като с това оказват благоприятен ефект върху тях. Това понижение може да се реализира чрез директно взаимодействие с активните радикали в клетката, регулиране активността на различни ензими и метални йони.

Тук ще разгледаме антиоксидантите от първата група, които заради способността им лесно да реагират с радикали се наричат още радикал-уловители (radical-scavengers).

Една често допускана грешка, даже в специализираната литература е, че и обратното се приема за вярно, а не всички радикал-уловители имат благоприятен ефект върху организма и следователно не могат да бъдат наречени антиоксиданти, въпреки способността им да реагират лесно с радикали. Освен това, както вече казахме, понижаване количеството на активните радикали в организмите може да бъде постигнато и по други начини, а и способността на антиоксидантите да проникват в клетките и да се разпространяват в тях е важна.

Радикал-уловители са и голяма част от стабилизаторите, които се използват за запазване на храни, лекарствени средства, полимерни материали, масла, горива и др. от окисление и загуба на експлоатационни свойства.

Наложено е схващането, че радикал-уловителите с природен произход са и безспорни антиоксиданти, докато за синтетичните обикновено се говори като за вредни вещества, които трябва да бъдат избягвани или направо забранени за използване, което е абсурдно. По-точно е да се каже, че безконтролното използване както на природните, така и на синтетични радикал-уловители, може да има неблагоприятно въздействие върху организма, но токсичността на синтетичните радикал-уловители обикновено е по-висока.

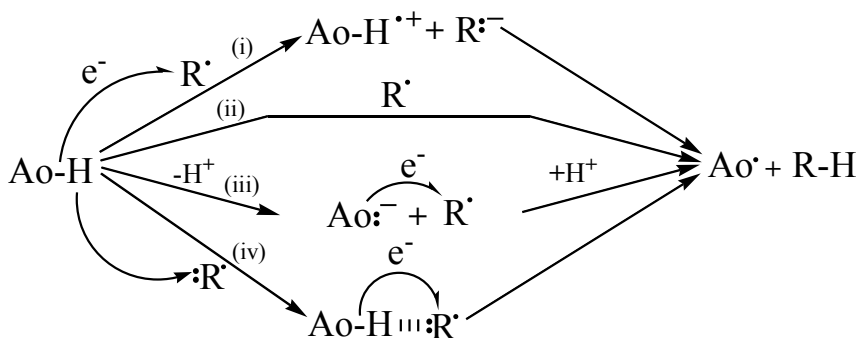
### **Механизми на реакцията**

Различни експериментални и теоретични методи се използват за оценка способността на едно вещество да влиза в реакция с радикали. Един от най-широко използваните теоретични методи за изследване на радикал-улавяща активност е квантово-химичният. Той придоби голяма популярност в изследването на радикал-улавяща активност след навлизането на хибридният Becke-Lee-Yang-Parr DFT (Density-Functional Theory) функционал (Parr & Yang, 1989). DFT методите отчитат електронната корелация, което е необходимо условие за изчисления на преходни състояния и здравини на връзки, а не изискват огромни изчислителни ресурси, както пертурбационните методи.

Нашият собствен опит в тази област показва, че получените по този начин резултати са достатъчно надеждни и водят до извеждането на важни закономерности (Velkov et al., 2007a; 2007b; Velkov & Tadjer, 2007; Velkov et al., 2008; Velkov et al., 2009; Velkov, 2009; Georgiev et al., 2011; Stoianova & Velkov, 2013; Todorova et al., 2013).

Намерени са доказателства (Evans et al., 1992; Nagaoka et al., 1992; Mukai et al., 1992; Van Acker et al., 1996) за четири различни механизми на реакцията между радикали и радикали-уловители (Fig. 1):

- (i) Трансфер на електрон от антиоксиданта към радикала, в резултата на което той се превръща в катион-радикал, а активния радикал в анион. След това се пренася протон от катион-радикала към аниона.
- (ii) Директен трансфер на водороден атом от антиоксиданта към радикала.
- (iii) Депротониране на антиоксиданта, последвано от електронен трансфер от получения анион към активния радикал и улавяне на протона.
- (iv) Някои автори (Mayer et al., 2002; DiLabio & Johnson, 2007; Tischenko et al., 2008) отделят четвърти механизъм при фенолните антиоксиданти: протон-свързан електронен трансфер. В него радикалът ( $R^\bullet$ ) има една или повече несподелени електронни двойки при същия атом, при който се намира и несдвоен електрон. Несподелената електронна двойка на радикала формира водородна връзка с водородния атом от фенолната хидроксилна връзка. Тази водородна връзка улеснява преноса на протона към радикала и заедно с него се пренася електрон от несподелената електронна двойка на аниона към орбиталата на радикала, носеща единичния електрон.



**Фиг. 1.** Механизми на реакцията между радикал-уловители и активни радикали

Така формулираните механизми на реакцията между радикал-уловител и радикал дават възможност да бъде оценена радикал-улавящата активност на едно съединение.

При това оценката може да бъде направена както според квантово-химични, така и според чисто експериментални резултати: енталпията на дисоциация на връзката О-Н (BDE), която се дисоциира хомолитично по време на реакцията, енергията на най-високата заета орбитала ( $E_{\text{НОМО}}$ ), спинова плътност и др.

Дескрипторите на радикал-улавящата активност могат да бъдат групирани така:

1) Индекси, описващи здравината на О-Н връзката – енталпия на дисоциация на връзката (BDE), дължина на връзката, разпределение на заряди и др. (Korzekwa et al., 1990).

2) Параметри, представящи електронодонорните свойства на молекулата или аниона  $\dot{\text{Y}}$  - йонизационен потенциал (IP) или неговия квантов-химичен аналог - енергията на НОМО (Koormans, 1934). Към тази група трябва да се добавят параметрите определящи способността на молекулата на антиоксиданта или нейния катион-радикал да се депротонира.

3) Индекси, показващи стабилността на получаващите се радикали или катион-радикали ( $\text{Ar-O}\dot{\text{X}}$ ), независимо от механизма, по който те са получени – разпределение на спиновата плътност, дължина на връзката С-О в радикала и др. (Cheng et al., 2003).

Първата група дескриптори се свързват с бимолекулния, едноетапен механизъм (ii). Втората група дескриптори, описващи електроно-донорните (и протоно-донорните) свойства на антиоксиданта насочват към възможността да се реализират механизмите (i), (iii) и (iv). Третата група дескриптори не носят информация за механизма на протичане на реакцията, а за степента ѝ на протичане.

Съпоставянето на дескрипторите от горните три типа по правило дава добра корелация само с данни за радикал-улавяща, но не и с антиоксидантна активност (Zhang et al., 2000)..

Това най-напред се дължи на факта, че както вече казахме, антиоксидантната активност и радикал-улавяща активност не са едно и също. Освен от способността за встъпване в химична реакция с радикалите, антиоксидантната активност зависи още от способността на веществото да проникне в клетката, от способността му да координира метални йони и от ред други фактори.

Намерено е освен това, че теоретично и експериментално намерени резултати за енталпията на дисоциация на връзката О-Н дават добри корелации с радикал-улавящата активност на монофенолите, но не и за *орто*-дифенолите (Zhang, 2003). Обяснението е просто. Наличието на водородна връзка с кислородния атом от дисоциращата се хидроксилна група облекчава значително процеса на дисоциация. Този ефект обаче може да бъде оценен добре, ако провеждането на експериментите за радикал-улавяща активност е направено в неполярни апротни разтворители. В този случай теоретично пресметнатите енталпии на дисоциация коректно ще отчитат приноса на Н-връзката със съседната хидроксилна група. Ако обаче експериментът за определяне на радикал-улавяща активност е проведен в разтворител, който образува Н-връзки с молекулата антиоксидант, това не може да бъде оценено от теоретично пресметнати енталпии на дисоциация на монофенолите. Освен това, наличието на две хидроксилни групи в *орто*-позиция прави възможно получаването на стабилни, диамагнитни хинони, което не се разглежда в горната схема.

### Какво предстои

Много автори са убедени, че премахването на оксидативния стрес понижава драстично канцерогенезата, възникването и развитието на възпалителните и други патогенни процеси. Ако обаче намирането на корелации между дескрипторите на радикал-улавяща активност и антиоксидантна активност на същите съединени е трудна задача, то намирането на връзка между тези дескриптори и някоя от съпътстващите антиоксидантната активност биологични активности или лекарствени действия е почти нерешима задача.

Една от причините за това е, че дескрипторите на радикал-улавяща активност не оценяват следващите трансформации на получаващите се на първия етап радикали от антиоксидантите.

Съществуват данни, че радикалите, които се получават от антиоксидантите в хода на реакцията, макар и по-ниско реактивоспособни, претърпяват трансформации, в резултат на които се превръщат в молекули, които имат своя радикал-улавяща активност и собствена биологична активности, а и токсичност (Ronxuan, 1999).

Изучаването на тези вещества чрез експериментални методи е трудна задача. Те не могат да бъдат лесно разделени и изучени.

За тази цел биха могли да се използват отново квантово-химичните методи. Те могат да дадат достатъчно данни как могат да се трансформират антиоксидантите след реакцията им с активните радикали, каква е структурата на получаващите се съединения, до каква степен тези производни могат да реагират като радикал-уловители и дали те биха показали и други биологични свойства.

Обобщената оценка за активността на изходните антиоксиданти и на техните производни трябва да даде по-ясна връзка между структура и действие, която ще бъде наша цел и в бъдеще.

**Благодарност:** Авторите благодарят на проф. Борян Радоев, доц. Петко Манджуков и проф. Иван Петков за ползотворните дискусии.

### ЛИТЕРАТУРА

- Cheng, Z., Ren, J., Li, Y., Chang, W. & Chen, Z. (2003). Establishment of a quantitative structure–activity relationship model for evaluating and predicting the protective potentials of phenolic antioxidants on lipid peroxidation. *J. Pharm. Sci.*, 92, 475–484.
- DiLabio, G.A. & Johnson, E.R. (2007). Lone pair– $\pi$  and  $\pi$ – $\pi$  interactions play an important role in proton-coupled electron transfer reactions. *J. Amer. Chem. Soc.*, 129 6199–6203.
- Evans, C., Scaiano, J.C. & Ingold, K.U. (1992). Absolute kinetics of hydrogen abstraction from alpha-tocopherol by several reactive species including an alkyl radical. *J. Amer. Chem. Soc.*, 114, 4589–4593.

- Georgiev, L., Kolev, M., Ivanova, G. & Velkov, Z. (2011). Radical scavenging activity modeling of hydroxycinnamic acid derivatives. *Top. Chem. Mater Sci.*, 5, 37-42.
- Helmut, S. (1997). *Antioxidants in diseases mechanisms and therapy*. San Diego: Academic Press.
- Koopmans, T. (1934). Über die Zuordnung von Wellenfunktionen und Eigenwerten zu den Einzelnen Elektronen Eines Atoms. *Physica*, 1, 104–113.
- Korzekwa, K.R., Jones, J.P. & Gillette, J.R. (1990). Theoretical studies on cytochrome P-450 mediated hydroxylation: a predictive model for hydrogen atom abstractions. *J. Amer. Chem. Soc.*, 112, 7042-7046.
- Mayer, J.M., Hrovat, D.A., Thomas, J.L. & Borden, W.T. (2002). Proton-coupled electron transfer versus hydrogen atom transfer in benzyl/toluene, methoxyl/methanol, and phenoxyl/phenol self-exchange reactions. *J. Amer. Chem. Soc.*, 124, 11142–11147.
- Mukai, K., Uemoto, Y., Fukuhara, M., Nagoaka, S.-i. & Ishizu, K. (1992). ENDOR study of cation radicals of vitamin E derivatives. Relation between antioxidant activity and molecular structure. *Bull. Chem. Soc. Japan*, 65, 2016-2020.
- Nagaoka, S., Kuranaka, A., Tsuboi, H., Nagashima, U. & Mukai, K. (1992). Mechanism of antioxidant reaction of vitamin E: charge transfer and tunneling effect in proton-transfer reaction. *J. Phys. Chem.*, 96, 2754-2761.
- Parr, R.G. & Yang, W. (1989). *Density-functional theory of atoms and molecules*. Oxford: Oxford University Press.
- Pryor, W.A. (2000). Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Radicals Biol. Med.*, 28, 141-164.
- Rongxuan, C. (1999). *Color and structural changes of sinapine and sinapic acid: PhD thesis*. Manitoba: Food & Nutritional Sciences University of Manitoba.
- Stoianova, T. & Velkov, Z. (2013). Structural Investigation of synthetic polyphenolic compounds. *Ann. Konstantin Preslavski University of Shumen, Natural Sciences, Chemistry*, 22, 62-71.
- Tishchenko, O., Truhlar, D.G., Ceulemans, A. & Nguyen M. T. (2008). A unified perspective on the hydrogen atom transfer and proton-coupled electron transfer mechanisms in terms of topographic features of the ground and excited potential energy surfaces as exemplified by the reaction between phenol and radicals. *J. Amer. Chem. Soc.*, 130, 7000–7010.
- Todorova, T.Z., Traykov, M.G., Tadjer, A.V. & Velkov, Z.A. (2013) Structure of flavones and flavonols. Part I: role of substituents on the planarity of the system. *Comput. Theor. Chem.* (in press).
- Van Acker, S.A.B.E., de Groot, M.J., van den Berg, D.-J., Tromp, M.N.J.L., den Kelder, G.D.-O., van der Vijgh, W.J.F. & Bast, A. (1996). A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.*, 9, 1305-1312.
- Velkov, Z. (2009). Quantum-chemical approach to antioxidant activity modeling (theoretical descriptors of antioxidants). *Scient. Res. J. SWU*, 2 51-55.
- Velkov, Z. & Tadjer, A. (2007). Quantum-chemical approach to silybin a and silybin b antioxidant activity investigation. *Ann. Konstantin Preslavsky University, Shumen, Faculty Natural Sciences*, 28B2, 178-187.

- Velkov, Z., Balabanova, E. & Tadjer, A. (2007a). Radical scavenging activity prediction of *o*-coumaric acid thioamide. *J Mol Struct: THEOCHEM*, 821, 133–138.
- Velkov, Z., Kolev, M. & Tadjer, A. (2007b). Modeling and statistical analysis of DPPH scavenging activity of phenolic acids. *Collect. Czech Chem. C*, 72, 1461–1471.
- Velkov, Z.A., Kolev, M.K. & Tadjer, A.V. (2008). Molecular modelling and statistical analysis of scavenging/antioxidant activity of phenolic compounds. *Proceedings of the Fourteenth National Conference on Application of Mathematics in Biology and Medicine, Leszno Warsaw, 17-20 September*, p. 127.
- Velkov, Z.A., Velkov, Y.Z., Galunska, B.T., Paskalev, D.N. & Tadjer, A.V. (2009). Melatonin: quantum-chemical and biochemical investigation of antioxidant activity. *Eur. J. Med. Chem.*, 44, 2834–2839.
- Zhang, H.-Y. (2003). On the O–H bond dissociation enthalpy of catechol. *New J. Chem.*, 27, 453–454.
- Zhang, H.-Y., Sun, Y.-M., Zhang, G.-Q. & Chen, De-Z. (2000). Why static molecular parameters cannot characterize the free radical scavenging activity of phenolic antioxidants. *Quant. Struct.–Act. Relat.*, 19, 375–379.

## STUDY OF RADICAL-SCAVENGING ACTIVITY

**Abstract.** The radical-scavenging ability of a substance largely determines its antioxidant activity, but the two terms are not equivalent. The quantum-chemical approach is a possible technique of exploring this action. The article addresses the main mechanisms of the reaction between radicals and radical-scavengers and the ways for their quantification by means of appropriate quantum-chemical descriptors. The most significant advantages and disadvantages of this approach are outlined.

✉ **Dr. Stanislav Stefanov Stanimirov**,  
Department of Organic Chemistry,  
University of Sofia,  
1 James Bourchier Blvd.,  
1164 Sofia, Bulgaria  
E-mail: ohsss@chem.uni-sofia.bg

✉ **Dr. Zhivko Asenov Velkov**,  
Department of Chemistry,  
South-West University at Blagoevgrad,  
66, Ivan Michailov Str.,  
2700 Blagoevgrad, Bulgaria  
E-mail: jivko\_av@swu.bg