

На правах рукописи

Хайруллина Вероника Радиевна

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПРИРОДНЫХ
ПОЛИФЕНОЛОВ**

02.00.04 – Физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Хай

Уфа – 2005

Работа выполнена в Башкирском государственном университете.

Научный руководитель: доктор химических наук,
профессор Герчиков А.Я.

Официальные оппоненты: доктор химических наук,
профессор Кантор Е.А.

доктор химических наук,
профессор Кабальнова Н.Н.

Ведущая организация: Институт проблем химической
физики РАН (г. Черноголовка)

Защита состоится «22» апреля 2005 года в 14⁰⁰ часов на заседании
диссертационного совета Д 002.004.01 в Институте органической химии
УНЦ РАН по адресу: 450054, Башкортостан, г.Уфа, проспект Октября, 71,
зал заседаний.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Уфимского
научного центра РАН

Автореферат разослан «22» апреля 2005 года

Учёный секретарь
диссертационного совета
доктор химических наук



Ф.А. Валеев

Общая характеристика работы

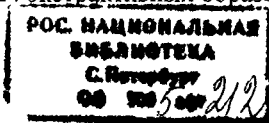
Актуальность темы. В последнее десятилетие внимание учёных различных специальностей – химиков, биологов, фармакологов – привлечено к антиокислительным свойствам веществ растительного происхождения. Интерес этот обусловлен, с одной стороны, перспективой использования этих веществ в качестве стабилизаторов продуктов питания, фармпрепаратов и др., а с другой – тем обстоятельством, что растительные антиоксиданты обладают биологической активностью. Однако до настоящего времени отсутствует единый критерий количественной оценки антиокислительных свойств природных соединений. Методы, используемые для оценки реакционной способности растительных и биогенных антиоксидантов (АО), носят полуколичественный характер, и не позволяют прогнозировать эффективность их антиокислительного действия при изменении условий окисления субстрата или при изменении содержания этих веществ в реакционной смеси. В то же время, абсолютно объективной характеристикой антиокислительной активности (АОА) потенциального антиоксиданта является константа скорости ингибирования, определение которой доступно известными методами химической кинетики. Эффективность антиокислительного действия тесно связана со строением антиоксидантов и обусловлена наличием в их структуре определённых функциональных групп. В связи с этим одной из важных задач теории антиоксидантов является определение природы активных центров, ответственных за проявление антиокислительных свойств. Эту задачу можно решить методами теории распознавания образов (ТРО). Результат решения этой задачи может быть использован для конструирования новых антиоксидантов.

Диссертация выполнена в соответствии с планом НИР Башкирского государственного университета по программе «Окислительные процессы в решении химико-экологических задач» (номер госрегистрации – 01 99 000 3103).

Цель работы. Экспериментальное и теоретическое исследование антирадикальной активности природных полифенолов, включая:

- количественную оценку антиокислительных свойств экстрактов различной этиологии и некоторых индивидуальных соединений растительного происхождения;
- установление связи между структурой и антиокислительной активностью отдельных соединений природного происхождения;
- конструирование потенциальных высокоэффективных антиоксидантов на базе природных и синтетических соединений с известным антиокислительным действием в рамках компьютерного метода ТРО SARD.

Научная новизна. С помощью методов химической кинетики получены количественные характеристики АОА для 8 индивидуальных веществ природного происхождения, 24 экстрактивных образцов различной



гии и двух бинарных композиций на основе ликуразида, кверцетина и аскорбиновой кислоты. Впервые осуществлено применение ТРО в форме компьютерной программы SARD (Structure Activity Relationship & Design) к конструированию новых соединений, обладающих антиокислительными свойствами на базе известных природных и синтетических антиоксидантов; осуществлена модификация отдельных структур антиоксидантов.

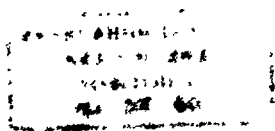
Практическая ценность. Найденные кинетические характеристики веществ природного происхождения позволяют:

- ранжировать эти вещества по эффективности антиокислительного действия;
- предсказывать эффективность антиокислительного действия в изменяющихся условиях;
- прогнозировать условия получения экстрактивных образцов, обладающих наибольшей АОА.
- с помощью методов ТРО возможно конструирование новых антиоксидантов на базе природных соединений, которые не только обладают заданными свойствами, но характеризуются также низким уровнем токсичности.

Апробация работы. Результаты исследований представлены на юбилейной научной конференции молодых учёных «Молодые учёные Волго - Уральского региона на рубеже веков» (Уфа, 2001), VI Международной конференции «Биоантиоксидант» (Москва, 2001), конференции молодых учёных, аспирантов и студентов (Уфа, 2002), научно - практической конференции «Химия и химическая технология» (Уфа, 2002), II Всероссийской научной конференции «Химия и химическая технология на рубеже тысячелетий» (Томск, 2002), II Всероссийской конференции «Химия и технология растительных веществ» (Казань, 2002), VI Международном Съезде «Актуальные проблемы создания лекарственных препаратов природного происхождения» (Санкт-Петербург, 2002), Региональной научно-практической конференции «Технология выращивания и использования лекарственных культур» (Уфа, 2003), IV Всероссийском научном семинаре «Химия и медицина» (Уфа, 2003), IV Всероссийской конференции молодых учёных «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии» (Саратов, 2003), V Международном симпозиуме «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования» (Пущино, 2003).

Публикации. По результатам работы опубликовано 5 статей и тезисы 12 докладов.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 180 страницах машинописного текста и включает введение, литературный обзор, результаты и их обсуждение выводы и список литературы. Диссертация содержит 47 рисунков и 38 таблиц.



Основное содержание работы

1. Антиокислительная активность некоторых индивидуальных соединений природного происхождения

На модельной реакции инициированного окисления пропан - 2 - ола изучены антиокислительные свойства аскорбиновой и глицирризиновой кислот, мальтола, флавоноидов: кверцетина, дигидрокверцетина, ликуразида, глабросида, алкалоида дитерпенового ряда лаппаконитина, его бромистоводородного производного аллапинина и комплекса на основе лаппаконитина и глицирризиновой кислоты при соотношении компонентов 1:4. Эффективность ингибирующего действия тестируемых веществ оценивали по степени снижения скорости поглощения кислорода воздуха при окислении модельного субстрата в их присутствии.

Установлено, что индивидуальные соединения проявляют выраженное антиокислительное действие. При этом с увеличением концентрации ингибирующей добавки наблюдается закономерное снижение скорости поглощения кислорода. Зависимость скорости окисления модельного субстрата от концентрации некоторых соединений представлена на рис. 1.

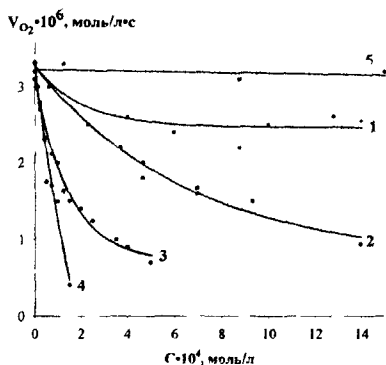


Рис. 1. Зависимость начальных скоростей окисления изопропилового спирта и параметра эффективности ингибирования от концентрации лаппаконитина (1), ликуразида (2), глабросида (3), аллапинина (4) и комплекса на основе лаппаконитина и глицирризиновой кислоты (5); $V_i = 1 \cdot 10^{-7}$ моль/л*с, $T = 348$ К.

В исследованной области концентраций ингибиторов между скоростью окисления пропан - 2 - ола и концентрацией добавки с достаточно высоким коэффициентом корреляции выполняются соотношения (1) и (2).

$$F = \frac{V_0^0}{V_0^0 - V_i} - \frac{V_0^0 - V_i}{V_0^0} = f k_m [\ln H] \sqrt{2 k_6 V_i} \quad (1)$$

$$F = \frac{V_0^0}{V_0^0 - V_i} - \frac{V_0^0 - V_i}{V_0^0} = \frac{f k_m (k_2 / \sqrt{2 k_6})^2 [RH] [\ln H]}{k_2 V_0^0} \quad (2)$$

где $[\ln H]$ – концентрация ингибитора, моль/л, V_0^0 и V_0 – начальные скорости

сти поглощения кислорода в отсутствие и в присутствии ингибитора соответственно, V_i – скорость инициирования окислительного процесса, f – ёмкость ингибитора, k_{in} и $2k_6$ – константы скорости обрыва цепи окисления на ингибиторе и квадратичного обрыва цепи на оксипероксильных радикалах пропан - 2 - ола соответственно.

На основе приведённых зависимостей с использованием соотношений (1) и (2) найдены эффективные константы ингибирования fk_{in} (табл.1). При расчете этой величины использовали известное по литературным данным значение $2k_6 = 2 \cdot 10^8$ л/моль·с для оксипероксильных радикалов пропан - 2 - ола. Вычисление ионольного эквивалента (ИЭ) проводили по формуле (3).

$$ИЭ = \frac{fk_{in}}{fk_{ионол}} \quad (3)$$

Таблица 1

Кинетические характеристики антиокислительной активности полифенольных соединений

Вещество	$fk_{in} \cdot 10^{-4}$, л/моль·с	ИЭ.
Кверцетин	$25 \pm 2^a / 36 \pm 4^b$	$2,44^a / 3,6^b$
Дигидрокверцетин	$110 \pm 10^a / 140 \pm 30^b$	$11^a / 14^b$
Мальтол	$0,14 \pm 0,04^a$	$0,014^a$
Ликуразид	$0,12 \pm 0,01^a$	$0,012^a$
Глаброзид	$4,80 \pm 0,30^a / 4,30 \pm 1,20^b$	$0,48^a / 0,43^b$
Глициризиновая кислота (ГК)	$0,40 \pm 0,04^a$	$0,04^a$
Лаппаконитин (ЛП)	$0,44 \pm 0,10^a$	$0,044^a$
Алапинин (Ал.)	$11 \pm 3^a / 11 \pm 2^b$	$11^a, b$
Комплекс (ЛП+ГК) (1.4)	-	-
Смесь (Кв+ликуразид)	$140 \pm 30^{a, b}$	$14^{a, b}$
Ионол	$10 \pm 2^{a, b}$	$1,0^{a, b}$

а – расчёт проведён по уравнениям (1 и 2), б-расчёт проведён по уравнению (4)

С целью проверки достоверности полученных количественных характеристик антиоксидантов экспериментальные результаты были обработаны в координатах уравнения (4):

$$[O_2]^{-1} = \frac{fk_7 \cdot [InH]_0}{[RH]} \cdot \frac{1}{V_i} [\Delta t]^{-1}, \quad (4)$$

где ΔO_2 – количество поглощённого кислорода, соответствующее на кинетической кривой моменту времени Δt (с), моль/л.

Найденные на основании этого уравнения эффективные константы ингибирования также представлены в табл. 1.

На основании значений эффективных констант ингибирования fk_{in} нами установлено, что кверцетин и дигидрокверцетин по эффективности

ингибирующего действия отличаются друг от друга в 5 раз, при этом АОА дигидрокверцетина на порядок превосходит таковую величину для эталонного ингибитора ионола. Флаванон глаброзид, у которого ОН-группа в положении 3' замещена на гликозидный фрагмент, по антиокислительному действию оказался в два раза слабее ионола. Возможно, что довольно низкая активность глаброзида по сравнению с кверцетином и дигидрокверцетином, обусловлена отсутствием электронодонорных ОН-групп в положениях 3 и 2' флавоноидного скелета. Известно, что эти фрагменты оказывают стабилизирующее влияние на структуру флавоноидов кверцетина и дигидрокверцетина и образующихся из них феноксильных радикалов, тем самым обеспечивая их высокую АОА.

Как следует из полученных результатов, значения эффективности исследуемых флавоноидов, найденные с использованием уравнений (1), (2) и (4) близки, что свидетельствует о надёжности количественной кинетической информации.

При изучении реакционной способности аскорбиновой кислоты в качестве антиоксиданта установлено, что введение добавки АК в окисляющийся изопропиловый спирт весьма существенно влияет на скорость поглощения кислорода: на кинетических кривых появляется чёткий период индукции (τ), что характерно для сильных антиоксидантов. В интервале концентраций АК $(0,25 - 2,5) \cdot 10^{-4}$ моль/л период индукции линейно связан с концентрацией АК (рис. 2), что даёт возможность определить ёмкость ингибитора f по уравнению (5):

$$f = \frac{\tau \cdot V_1}{[AK]} \cong 1 \quad (5)$$

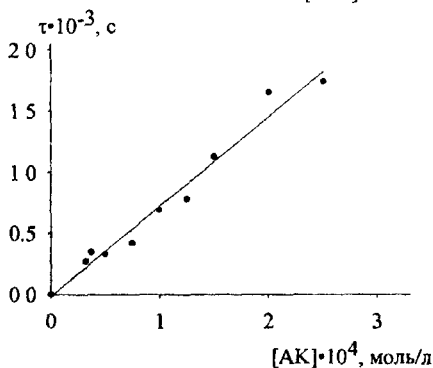


Рис. 2. Зависимость величины периода индукции, возникающего на кинетических кривых ингибированного окисления изопропилового спирта от концентрации АК; $V_1 = 1 \cdot 10^{-7}$ моль/л·с, $T = 348$ К.

2. Изучение антиокислительных свойств экстрактов растений семейства Geraniaceae, Rosaceae и корня солодки голой

В качестве объектов для изучения антиокислительных свойств вы-
браны экстракты следующих растений (табл.2).

Таблица 2

Источник экстрактивных образцов и их характеристики

Источник экстракта	Экстрагент	№ фракции	
Корень солодки голой <i>G. glabra</i>	метанол	I	
	ацетон	II	
	этилацетат	III	
	четырёххлористый углерод	IV*	
	дихлорэтан	V*	
	дихлорметан	VI*	
	хлороформ	VII*	
	экстракты, выделенные из образца III при распределении его в соответ- ствии с кислотно-основными свойст- вами		VIII
			IX
			X
			XI
			XII
Герань лесная <i>G. sylvaticum L.</i>	водно-спиртовой раствор (70% этилового спирта),	XIII	
Герань кроваво – красная <i>G. sanguineum L.</i>	водно-спиртовой раствор (70% этилового спирта).	XIV	
Герань луговая <i>G. pratense L.</i>	водно-спиртовой раствор (70% этилового спирта),	XV	
журавельник цикутый <i>E. cicutarium (L) L'Her</i>	водно-спиртовой раствор (70% этилового спирта).	XVI	
	вода		
лапчатка прямостоячая <i>R. Potentilla erecta L.</i>	водно-спиртовой раствор (70% этилового спирта),	XVII	
	вода		
малина лесная <i>R. idaeus L.</i>	водно-спиртовой раствор (70% этилового спирта),	XVIII	
	вода		
ежевика лесная <i>R. caesius L.</i>	водно-спиртовой раствор (70% этилового спирта),	XIX	
	вода		

*-экстрактивные вещества, полученные при последовательной обработке фракции III растворителями возрастающей полярности

При введении экстрактов в модельную систему наблюдается закономерное снижение скорости окисления пропан – 2 - ола (рис. 3). На основании этой зависимости с помощью уравнения (1) найдены эффективные

константы ингибирования экстрактов (табл. 3 и 4).

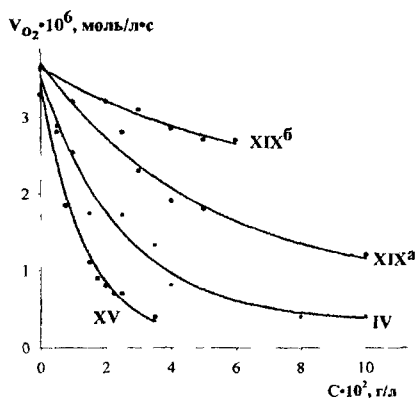


Рис. 3. Зависимость начальных скоростей окисления изопропилового спирта от концентрации введённых экстрактов $V_0 = 1 \cdot 10^{-7}$ моль/л·с, $T = 348$ К.

На основании проведённых исследований можно заключить, что экстракты проявляют выраженный ингибирующий эффект и по силе антиокислительного действия сопоставимы с известным синтетическим ингибитором ионолом, принятым за эталон сравнения.

В соответствии со значениями количественных характеристик АОА экстрактов корня солодки голой, для получения наиболее эффективных антиокислительных композиций при экстрагировании сырья корня солодки голой наиболее целесообразно использовать эгиллацетат, затем проводить последовательное фракционирование полученного экстракта такими растворителями, как четырёххлористый углерод, дихлорэтан и дихлорметан.

В сущности, полученные результаты соответствуют литературным данным о составе этих экстрактов: экстрактивные образцы (IV - VI) содержат достаточно узкий набор полифенольных соединений, включающий фенолкарбоновые и оксикоричные кислоты (IV, VI), флавоны (IV - VI), изофлавоны (V), кагехины (VI), флавононы и кумарины (IV - V).

Среди композиций, полученных при разделении экстракта III по кислотнo-основным свойствам, высокую АОА обнаружили «кислая» и «слабокислая» фракции (X, XI), а также композиция (VIII), содержащая значительное количество полярных компонентов ($\approx 40\%$). В соответствии с литературными данными эти субстанции содержат фенолкарбоновые и оксикоричные кислоты (XI), дигидрохалконы (X), флавоны (X, XI), изофлаван и изофлавоны (X), некоторые из индивидуальных соединений этих фракций также зарекомендовали себя в качестве эффективных антиоксидантов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в различных модельных системах. Так, в частности, в экстракте X установлено наличие индивидуальных соединений глабридина и ликохалконов А и С. Известно, что фракция XI со-

держит преимущественно фенолкарбоновые и оксикоричные кислоты. В то же время не исключено наличие в этой субстанции флавонов со свободной ОН-группой в в положении 7 в кольце А. Многочисленными исследованиями показано, что этот фрагмент играет немаловажную роль в проявлении антиокислительных свойств различных классов флавоноидов.

Таблица 3

Кинетические характеристики экстрактивных образцов

Шифр экстракта	Экстрагент	$f_{k_{In}}$, л/г·с	ИЭ.
I	CH ₃ OH	13 ± 2	0,03
II	CH ₃ COCH ₃	700 ± 170	1,6
III	CH ₃ COOC ₂ H ₅	870 ± 190	2,0
IV	CCl ₄	520 ± 60	1,2
V	C ₂ H ₄ Cl ₂	900 ± 140	2,0
VI	CH ₂ Cl ₂	500 ± 40	1,1
VII	CHCl ₃	280 ± 60	0,6
VIII	-	780 ± 130	1,74
IX	-	50 ± 19	0,10
X	-	580 ± 80	1,27
XI	-	830 ± 100	1,84
XII	-	130 ± 20	0,3
Ионол	-	450 ± 90	1,0

Для экстрактов солодки голой VIII, X, IX наблюдается симбатная зависимость между содержанием полярных компонентов и антиокислительной активностью. Значительное влияние на антиоксидантную активность экстрактов оказывают структурные особенности их индивидуальных компонентов. Так, низкая АОА фракции (IX) обусловлена высоким содержанием в нём высокопренилированных и содержащих метокси- и этокси- группы флавоноидов (7,4'-ди-О-метилдайдзеин, 5,7-дигидрокси-6,8-дипренилфлаванон и т.д.). Этими же причинами объясняется также низкая ингибирующая эффективность метанольного экстракта корня солодки голой (I), состоящего преимущественно из гликозилированных форм различных классов флавоноидов. Таким образом, по антиокислительной активности изученные экстракты корня солодки голой в соответствии с их ИЭ (табл.3.) можно расположить в следующий ряд: V ≈ III ≈ XI > VIII ≈ II > X ≈ IV ≈ VI ≈ ионол > VII > XII > IX > I.

Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными. Сравнительное изучение антиокислительной активности метанольного и этилацетатного экстрактов корня солодки голой на модельной реакции перекисного окисления липидов печени крыс показало, что накопление

продуктов ПОЛ в гомогенатах печени (определение по малоновому диальдегиду) происходило в меньшей степени у животных, получавших этилацетатный экстракт.

АОА изученных нами экстрактов является одним из компонентов их биологической активности. Так, исследования, проведённые в Уфимском научном центре РАН, свидетельствуют о высокой противовоспалительной, противовоспалительной, репаративной и гепатопротекторной активности экстрактов корня солодки голой. Вместе с тем эти вещества являются эффективными антирадикальными агентами по отношению к оксипероксильному радикалу пропан - 2 -ола, что служит дополнительной характеристикой в изучении направленности и эффективности их терапевтического действия.

Согласно литературным данным, растения семейства гераниевых содержат такие эффективные антиоксиданты, как галлотаннины, кверцетин и рутин. Следует ожидать, что экстракты, полученные из этих растений, будут обладать антиокислительными свойствами. В частности, нами установлено, что экстракты, полученные из герани лесной (XIII), герани кровяно-красной (XIV), герани луговой (XV) обладают значительным антиокислительным действием, превосходящим антиокислительную эффективность ионола. Об этом свидетельствуют результаты кинетических исследований, приведённые в табл. 4.

Таблица 4

Кинетические характеристики экстрактивных образцов растений сем. Geraniaceae, Rosaceae и лиственницы сибирской

Шифр экстракта	fk_{1n} , л/г·с	ИЭ
XIII	1100 ± 200^a	2,44
XIV	760 ± 90^a	1,70
XV	1350 ± 180^a	3,00
XVI ^a	400 ± 60^a	0,90
XVI ^b	210 ± 70^b	0,47
XVII ^a	530 ± 70^a	1,20
XVII ^b	280 ± 70^b	0,62
XVIII ^a	500 ± 70^a	1,11
XVIII ^b	370 ± 80^b	0,82
XIX ^a	230 ± 20^a	0,51
XIX ^b	80 ± 15^b	0,18
XX ^b	1420 ± 360^b	3,15
Ионол	450 ± 90	1,0

^a экстрагент-водно-спиртовой раствор (70% этилового спирта), ^b экстрагент – вода;

^b – антиоксидантный экстракт лиственницы сибирской

Экстрактивные образцы лапчатки прямостоячей, журавельника ци-

кутового, а также малины лесной и ежевики лесной обогащены моно- и дигликозидными формами кверцетина, мальвидина и кемпферола, что и обуславливает их более низкую АОА по сравнению с экстрактами разных видов гераней.

Определение кинетических характеристик ингибирования экстрактов растений сем. Geraniaceae и Rosaceae (табл. 4) свидетельствует о том, что значительное влияние на АОА оказывает природа растворителя – экстрагента. Наибольшей эффективностью в качестве ингибиторов обладают композиции, полученные с использованием водно-спиртовой смеси (содержание спирта 70%). Причину наблюдаемого явления можно объяснить тем, что при экстрагировании БАВ с применением воды в качестве экстрагента из растений извлекаются полярные соединения, представленные гликозидными формами разных классов флавоноидов. С использованием менее полярного экстрагента - водно-спиртовой смеси - из растений будут извлекаться преимущественно агликаны флавоноидов, которые отличаются большей эффективностью в качестве ингибиторов.

Среди индивидуальных соединений нами изучены кверцетин и ликуразид. Известно, что оба эти соединения входят в состав фитопрепарата “Флакарбина”, обладающего противовоспалительным, противоязвенным и спазмолитическим действием. В связи с этим представляло интерес изучить антиокислительное действие этих флавоноидов при их совместном присутствии. В ходе кинетических исследований установлено, что при совместном присутствии кверцетина и ликуразида в модельной системе при постоянной концентрации ликуразида наблюдается взаимное усиление их ингибирующих свойств. Добавление слабого ингибитора в систему, содержащую кверцетин, приводит к усилению его антиокислительного действия в 5 раз (табл. 1). Следует отметить, что в составе лекарственного средства “Флакарбина” более дорогостоящий кверцетин по своему содержанию в 2 раза превышает ликуразид.

Известно, что антиокислительные свойства находятся в тесной взаимосвязи со строением химических соединений. Наличие в них определённых фрагментов обуславливает стабилизирующее влияние как на исходную структуру соединения, так и на образующийся из неё радикал. Например, в молекулах флавоноидов такими фрагментами являются 2,3-двойная связь в кольце С и примыкающая к ней ОН-группа в положении С3. Иными словами, АОА органических соединений тесно связана со строением молекул. Проблема связи “структура- АОА” решается методами ТРО. Применение методов этой теории позволяет не только выявить фрагменты структуры, ответственные за реализацию заданного свойства, но и даёт возможность конструировать новые соединения с требуемыми характеристиками. В связи с этим, в настоящей работе для выявления природы активных центров природных антиоксидантов впервые применена программа SARD, реали-

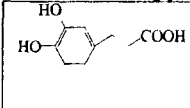
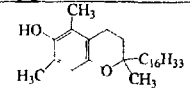
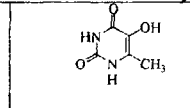
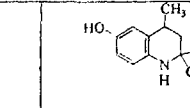
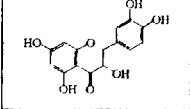
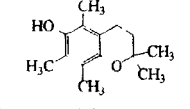
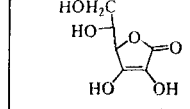
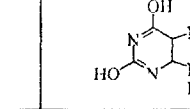
зующая основные принципы ТРО на персональных компьютерах.

3. Разработка математической модели распознавания антиоксидантной активности природных веществ и использование её для конструирования новых потенциально эффективных антиоксидантов

Анализ связи «структура-АОА» выполнен с помощью компьютерной системы прогноза и дизайна структур с заданными свойствами SARD-21, любезно предоставленной профессором Л.А. Тюриной. Типичные структуры активных соединений обучающего массива приведены в табл. 5.

Таблица 5

Типичные структуры активных соединений обучающего массива

В рамках соответствующих процедур используемой программы сформирован решающий набор признаков (РНП). Он получен на базе фрагментарных признаков и их логических сочетаний (конъюнкций и строгих дизъюнкций) в виде уравнения логического типа $AOA = F(S)$ и представлен в табл. 6.

Таблица 6

Признаки решающего набора для антиоксидантной активности

Признак	Содержание признака	Информативность
1	$\{(-OH) - (>C=C<)\}^1 \{(-NH-) - (>C=C<)\}^1 \{(>CH-) - (-NH-)\}$	0 822
2	$(R-H) \# (\text{перзам тетрагидропиран}) \# (-CH_2)_2-$	0 732
3	$(-OH) \# (\text{перзам тетрагидропиран}) \#$	0 732
4	$(1, 2, 4, 6\text{-тетразам бензол})^1 (-NH-)^1 (1,4\text{-дизам бензол})$	0 639
5	$(>C<) \# (N\text{-зам. пиперидин}) \# (-CH_3)$	-0 487
6	$(-CH_2)_4, 10-) \# (>C<) \# (-CH_3)$	-0 470
7	$\{(-OH) - (\text{перзам тетрагидропиран})\} \# \{(-CH_3) - (>C=O)\} \# \{(R-CH_2) - (>N-)\}$	-0 455
8	$(\text{перзам тетрагидропиран})^1 (>N-) (1\text{-зам бензол})^1$	-0 443
9	$(1,4\text{-дизам бензол}) \# (>C<) \# (-CH_3)$	-0 434
10	$(>N-) \# (1\text{-зам. бензол}) \# (-CH_2)_4, 10-)$	-0 382
11	$(-CH_3) \# (-O) \# (1, 2, 4\text{-тризам бензол})$	-0 345
12	$(N\text{-зам пиперидин}) \# (-CH_3) \# (-O-)$	-0.304

- знак конъюнкции; ! - знак строгой дизъюнкции








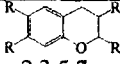
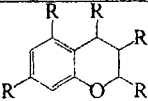
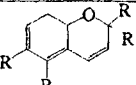
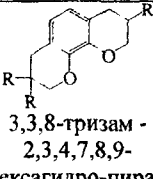
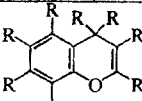
Проведена апробация полученного РНП на экзаменационной выборке, состоящей из 11 соединений с известным антиокислительным действием. Тестирование РНП показало высокий уровень распознавания – 10 структур. Таким образом, сформированная нами модель позволяет с высокой степенью надёжности прогнозировать антиокислительную эффективность природных и синтетических соединений на базе бензола, пиперидина, диоксолана, хромена, пурина и пирана и различных классов флавоноидов. Она адекватно проводит распознавание как простых структурных признаков (монад), так и их более сложных сочетаний - диад и триад, характерных для соединений с высоким уровнем антиокислительного действия.

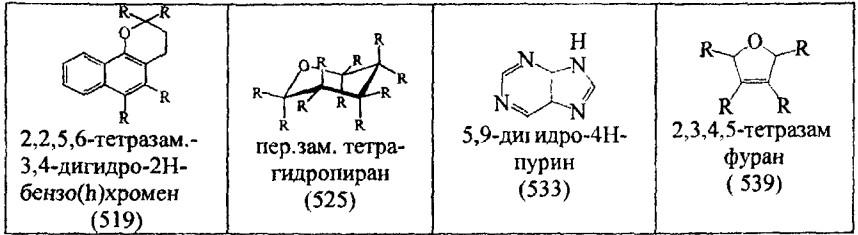
Однако любая математическая модель имеет ряд ограничений. Обучающий массив содержит в основном соединения фенольной природы. В результате, по алгоритму голосования происходит занижение до четвёртого ранга активности соединений, которые значительно отличаются по структурным признакам от бензольной системы, но при этом характеризуются высокой степенью антиокислительного действия.

В результате анализа признакового пространства сформированной модели выделены структурные фрагменты (дескрипторы), характерные для высокоэффективных антиоксидантов. Так, например, среди циклических фрагментов для эффективных АО наиболее характерны бензольная, ксантиновая и хромоновая системы; численное значение коэффициента Юла для них $r > 0,1$ (табл. 7).

Таблица 7

Циклические фрагменты, характерные для эффективных антиоксидантов

 1-зам бензол 121	 1,4-дизам бензол (143)	 1,2,4,6-тетразам бензол (238)	 1,2,4-тризам. Бензол (290)
 N- зам пиперидин (160)	 2,2,4-тризам. диоксолан (353)	 2,4-дизам пиперидин (380)	 2,3,5,7-тетразам. - хромен (503)
 2,3,4,5,7- пентазам -хроман 504	 2,2,5,6-тетразам. -2Н-хромен 507	 3,3,8-тризам - 2,3,4,7,8,9-гексагидро-пиран [3.2-h] хромен 508	 2,5,6-тризам - 4Н-хромен (512)



- - коды циклов при расчёте

Следует заметить, что степень и характер влияния индивидуальных признаков на проявление активности изменяются в зависимости от природы соседних групп (рис. 4 и 5).

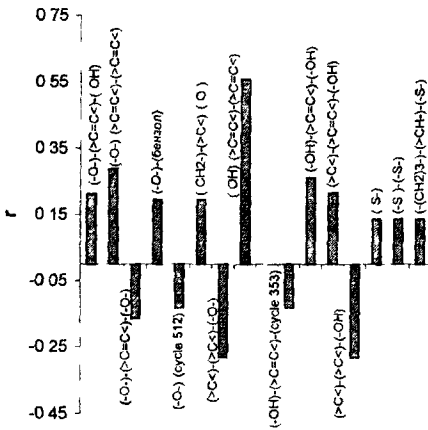


Рис. 4. Фрагменты, характерные для групп кислород- и серосодержащих соединений, альтернативных (активных и неактивных) по антиокислительной активности.

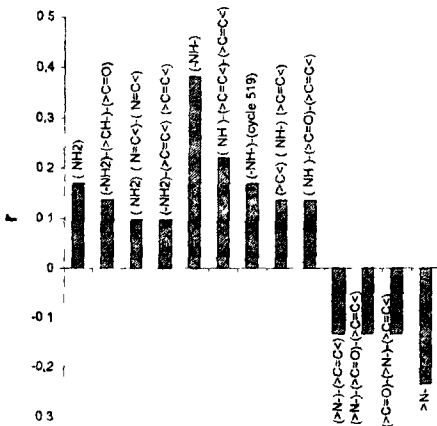


Рис. 5. Фрагменты, характерные для групп азотсодержащих соединений, альтернативных (активных и неактивных) по антиокислительной активности.

4. Конструирование новых потенциально эффективных антиоксидантов на базе ионола, 5-гидрокси 6-метилурацила и аскорбиновой кислоты

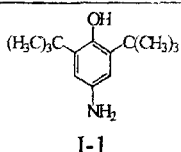
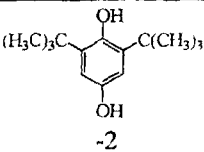
На основании наиболее информативных фрагментов, выделенных при анализе признакового пространства, проведён дизайн молекул ионола, 5-гидрокси-6-метилурацила (ОМУ) и аскорбиновой кислоты (АК), входящих в класс активных соединений. Выбор объектов обусловлен широким практическим применением этих веществ в медицинской практике и производственной сфере (ионол). Так, синтетический АО ионол (2,6-дитрет-бутил-4-метилфенол) активно используется для стабилизации продуктов нефтехимического синтеза и в качестве противораковых лекарственных препаратов. Оксиметилурацил является высокоэффективным иммуномодулирующим лекарственным средством.

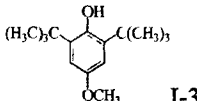
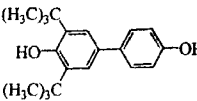
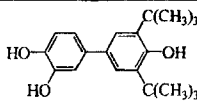
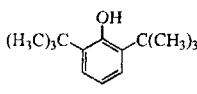
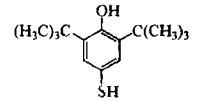
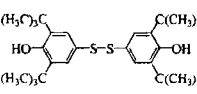
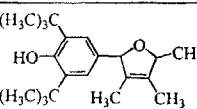
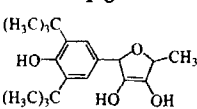
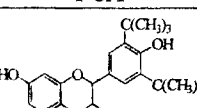
Структурные преобразования проводили по нескольким направлениям:
 - изменения в гетероциклических фрагментах базовых структур (ОМУ, АК);
 - варьирование боковых фрагментов.

В результате молекулярного дизайна ионола нами сконструировано 26 потенциально эффективных антиоксидантов, некоторые из них представлены в табл. 8. 7 структур с известным антиокислительным действием (I-2, I-3, I-6, I-11, I-14, I-15, III), среди них 4 соединения по силе АОА превышают ионол (I-2, I-3, I-11, I-9).

Таблица 8

Результаты прогноза АОА потенциально активных структур, полученных при модификации ионола

Предлагаемый фрагмент	г	Результат модификации	Расстояние до эталона активных (ЭА) и неактивных соединений (ЭВ)	Ранг сгенерированных структур/ группа активности
-NH ₂	0.17	 I-1	0.457/ 2.310	2/A
-OH	0,571	 I-2	0.457/ 2.310	2/A

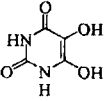
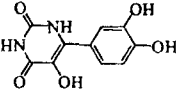
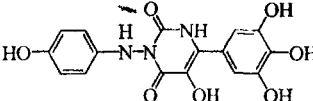
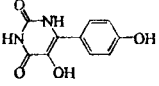
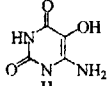
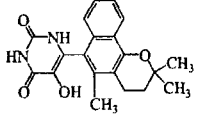
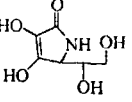
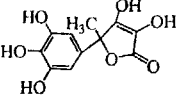
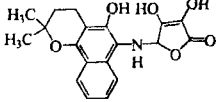
(CH ₃)-(-O-)	0.115	 I-3	0.989/ 2.414	1 / A
(-OH)-cycle 143	0.196	 I-4	0.457/ 2.310	2 / A
(-OH)-cycle290	0.104	 I-5	0.457/ 2.310	2/A
-H	0.100	 I-6	1.099/ 2.310	3/A
(-S-)	0.137	 I-7	0.457/ 2.310	2/A
		 I-7A	0.457/ 2.310	2/A
Cycle 539	0.137	 I-8	0.989/ 2.414	1/A
		 I-8A	0.989/ 2.414	1/A
(-OH)-cycle 503	0.137	 I-9	0.989/ 2.414	1/A

(-OH)-cycle 512	0.137	<p>I-10</p>	0.989 / 2.414	1 / A
(OH)-cycle 238	0.385	<p>I-11</p>	0.457/ 2.310	2 / A
(-NH-)-cycle 519	0.169	<p>I-12</p>	0.989 / 2.414	1 / A
(-NH-)-cycle 143	0.169	<p>I-13</p>	0.457 / 2.310	2 / A
>C<	0.125	<p>I-14</p>	0.457/ 2.310	2 / A
(CH ₃ -)(>C<)- (-O-)	0.246	<p>I-15</p>	0.989/ 2.414	1 / A
(-OH)	0.571	<p>II-1</p>	0.457 / 2.310	2 / A
(>C<)-cycle 380-(-OH)	0.301	<p>II-2</p>	1.657/ 2.083	4/A
Получена в результате слияния II-2 с I-9		<p>III</p>	0.457/ 2.310	2/A

На основании «геометрического подхода» и «голосования» установлено, что все сконструированные структуры наиболее приближены к эталону активных соединений по сравнению с базовой структурой. Таким образом, вероятность генерации данных структур подтверждает корректность предложенных зависимостей «структура - АОО» и возможность их использования при молекулярном дизайне новых потенциально эффективных антиоксидантов.

Руководствуясь теми же принципами сконструированы 32 структур на базе АК и на основе ОМУ. Согласно данным алгоритма голосования и геометрического подхода среди структур, полученных при модификации АК, 20 соединений являются потенциально более активными по сравнению с исходным соединением. В результате молекулярного дизайна молекулы ОМУ сконструировано 13 соединений, превосходящих по эффективности АО действия ОМУ. Наиболее эффективные с точки зрения ТРО структуры, полученные при модификации ОМУ и АК приведены в табл. 9.

Таблица 9
Высокоэффективные низкотоксичные и умереннотоксичные антиоксиданты на базе 5-гидрокси-6-метилурацила и аскорбиновой кислоты

 <p>IV-1 600 – 5000 мг/кг</p>	 <p>IV-3 600 – 5000 мг/кг</p>	 <p>IV-5 600 - 5000 мг/кг</p>
 <p>IV-2 3000 – 5000</p>	 <p>IV-4 600 – 5000 мг/кг</p>	 <p>IV-6 1500 – 5000 мг/кг</p>
 <p>V-1 600 – 1000 мг/кг</p>	 <p>V - 2 1500 – 5000 мг/кг</p>	 <p>V - 3 1500 – 5000 мг/кг</p>

Целый ряд антиоксидантов имеют ограничения при их использовании в качестве стабилизирующих добавок вследствие своей токсичности. Поиск эффективных стабилизирующих добавок с низким уровнем токсического действия, базируются на экспериментальных методах, отличается

трудоёмкостью, значительными временными и материальными затратами. В связи с этим рациональным подходом в этом направлении является экспрессный прогноз антиоксидантной активности и токсичности на основе теоретических исследований связи между строением и активностью в рамках методов ТРО.

Для ионола, ОМУ и потенциально наиболее эффективных соединений, сконструированных на их основе, в рамках комплексов моделей прогноза токсичности, предоставленных д.х.н., профессором Тюриной Л.А. и к.х.н Кирлан С.А., проведена теоретическая оценка уровней токсичности. Потенциально высокоэффективные антиоксиданты на базе ОМУ и аскорбиновой кислоты, характеризующиеся низким или умеренным уровнем токсического воздействия а также интервальные значения ЛД₅₀ для этих соединений, оценённые в рамках теоретического прогноза токсичности, представлены в табл. 9.

Эти результаты хорошо согласуются с литературными данными. В частности, при исследовании острой токсичности ОМУ и его ближайших аналогов – литиевой соли ОМУ и метилурацила установлена незначительная токсичность для всех исследованных веществ. Для ОМУ, согласно этим данным, значение параметра ЛД₅₀ при приёме его внутрь составляет > 6000 мг/кг. Согласно данным модели прогноза токсичности амидов, токсичность ОМУ составляет величину >5000 мг/кг. Инол отнесён к классу умеренно-токсичных соединений (ЛД₅₀ находится на уровне 600 –1000 мг/кг), что также хорошо согласуется с литературными данными

Выводы

1. Получены кинетические характеристики антиокислительной эффективности в виде эффективных констант ингибирования для 24 экстрактивных образцов корня солодки голой, растений семейства гераниевых и розовцветных различной этиологии.
2. Определены эффективные константы скорости ингибирования радикально-цепного окисления изопропилового спирта при 75°C для 8 индивидуальных соединений, которые равны: $fk_{in} \cdot 10^{-4}$ (л/моль·с) = 0.12, 0.14, 0.4, 0.44, 4.8, 11.0, 25.0, 110.0 для ликуразида, мальтола, глицирризиновой кислоты, лаппаконитина, глабросида, аллапинина, кверцетина и дигидрокверцетина соответственно.
3. Антиокислительная активность кверцетина возрастает ≈ 5 раз в присутствии добавок слабого антиоксиданта ликуразида, что объясняется наличием синергического эффекта.
4. Установлено, что методы ТРО в рамках программы SARD применимы при конструировании антиоксидантов на базе природных соединений. При этом в ряду производных фенола, ксантина, аминов и имидов достигается высокий уровень распознавания (86,6÷94,6%).
5. В результате молекулярного дизайна молекул ионола, аскорбиновой кислоты и 5-гидрокси-6-метилурацила, выполненного в рамках компьютерного метода теории распознавания образов SARD, сконструировано 57 потенциально высокоэффективных антиоксидантов.
6. Установлено, что с помощью методов ТРО удаётся с высокой точностью предсказывать токсичность не только известных структур антиоксидантов, но и сконструированных с помощью программы SARD.

Результаты диссертационной работы представлены в следующих публикациях.

1. Гарифуллина Г.Г., Денисова С.Б., Хайруллина В.Р., Герчиков А.Я. Выделение фенольных соединений корня солодки голой и оценка их антиоксидантной активности // Изв. вузов. Химия и химическая технология. – 2003. – Т.46, вып. 7. – С.102 - 106.
2. Хайруллина В.Р., Гарифуллина Г.Г., Денисова С.Б., Герчиков А.Я., Хайруллина Р.Р., Тавлыкаева З.С. Количественное изучение антиоксидантной эффективности кверцетина, ликуразида и дигидрокверцетина на модельной реакции жидкофазного окисления изопропилового спирта. // Вестник Башкирского университета. – 2004. – № 1. – С.19-21.
3. Хайруллина В.Р. Кирлан С.А., Бетелина И.Б., Тюрина Л.А., Гарифуллина Г.Г., Герчиков А.Я. Молекулярный дизайн ионола и компьютерный

прогноз антиоксидантной активности полученных продуктов // Вестник Башкирского университета. – 2004. – №4. – С.23 - 27.

4. Хайруллина В.Р., Кирлан С.А., Гарифуллина Г.Г., Бетелина И.Б., Герчиков А.Я., Тюрина Л.А. Компьютерный поиск новых антиоксидантов среди различных классов природных соединений // Изв. вузов. Химия и химическая технология. – 2005. – Т.48, вып. 1. – С. 83 - 88.

5. Хайруллина В.Р., Гарифуллина Г.Г., Герчиков А.Я. Изучение ингибирующей эффективности экстрактов растений сем. Geraniaceae, Rosaceae на примере модельной реакции окисления изопропилового спирта // Химико-фармацевтический журнал. – 2005. – Т.39, №3. – С. 103 - 105.

6. Хайруллина В.Р. Изучение ингибирующих свойств экстрактов солодки голой // Тез. докл. конференции молодых ученых, аспирантов и студентов Уфа, 2002. – С. 40 - 43.

7. Герчиков А.Я., Гарифуллина Г.Г., Никитина В.С., Хайруллина В.Р. Изучение ингибирующей эффективности экстрактов растений Geraniaceae, Rosaceae // Материалы научно-практической конференции “Химия и химическая технология”. – Уфа, 2002. – С. 77 - 79.

8. Герчиков А.Я., Гарифуллина Г.Г., Денисова С.Б., Хайруллина В.Р. Выделение и оценка антиоксидантной активности фенольных соединений корня солодки голой // Материалы II Всероссийской научной конференции «Химия и химическая технология на рубеже тысячелетий». – Томск, 2002.- Т.2. – С. 54 - 56.

9. Никитина В.С., Герчиков А.Я., Гарифуллина Г.Г., Оразов О.Э., Шендель Г.В., Хайруллина В.Р. Растения Южного Урала – продуценты фенольных соединений с антиоксидантными свойствами // Материалы II Всероссийской конференции «Химия и технология растительных веществ». – Казань, 2002. – С. 70 - 71.

10. Никитина В.С., Герчиков А.Я., Гарифуллина Г.Г., Оразов О.Э., Шендель Г.В., Хайруллина В.Р. Сравнительное исследование антиоксидантных свойств полифенолов представителей сем. Geraniaceae и Rosaceae // Материалы VI Международного Съезда «Актуальные проблемы создания лекарственных препаратов природного происхождения». – Санкт-Петербург, 2002.- С. 262 - 265.

11. Хайруллина В.Р., Гарифуллина Г.Г., Денисова С.Б., Герчиков А.Я. Солодка голая как потенциальный источник антиоксидантных присадок // Материалы Региональной научно-практической конференции “Технология выращивания и использования лекарственных культур”. – Уфа: БГАУ, 2003. – С. 104 - 107.

12. Хайруллина В.Р., Хайруллина Р.Р. Гарифуллина Г.Г., Денисова С.Б., Герчиков А.Я. Антиоксидантная эффективность флавоноидов корня солодки голой и их композиции // Материалы Региональной научно-

практической конференции “Технология выращивания и использования лекарственных культур”. – Уфа: БГАУ, 2003. –С.107 - 110.

13. Денисова С.Б., Хайруллина В.Р., Гарифуллина Г.Г., Герчиков А.Я. Выделение полифенольных соединений корня солодки голой и изучение их антиоксидантной активности // Материалы V Международного симпозиума “ Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования”. – Пушино, 2003. – С. 178 - 180.

14. Султанаева И.В., Хайруллина В.Р. Антиокислительная эффективность экстрактов солодки голой // Материалы юбилейной научной конференции молодых учёных «Молодые учёные Волго-Уральского региона на рубеже веков». – Уфа, 2001. – С. 128 - 129.

15. Гарифуллина Г.Г., Герчиков А.Я., Денисова С.Б., Хайруллина В.Р. Антиокислительная эффективность экстрактов корня солодки голой // Тез. докл. VI Международной конференции «Биоантиоксидант». –М., 2001 – С 100 - 101.

16. Хайруллина В.Р., Гарифуллина Г.Г., Денисова С.Б., Герчиков А.Я., Тавлыкаева З.С. Природные гликозиды и их антиокислительные свойства // Тез. докл. сборника трудов IV Всероссийского научного семинара «Химия и медицина» «Проблемы создания новых лекарственных средств». –Уфа: Гилем, 2003. – С. 49 - 50.

17. Хайруллина В.Р., Гарифуллина Г.Г., Герчиков А.Я., Хайруллина Р.Р. Ингибирование радикально-цепного окисления изопропилового спирта добавками аскорбиновой кислоты // Тез. докл. IV Всероссийской конференции молодых учёных «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии». Саратов: Юл, 2003. – С. 121.

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю – д.х.н., профессору Герчикову А.Я. за руководство работой, д.х.н., профессору Тюриной Л.А., к.х.н., доценту БашГУ Гарифуллиной Г.Г., к.х.н., инженеру кафедры физики УГНТУ Кирлан С.А. за участие в постановке проблемы и консультации, д.х.н., профессору Янборисову В.М. за ценные советы, а также академику Юнусову М.С., д.х.н., профессору Муринову Ю.И., к.х.н. Денисовой С.Б., к.х.н. Цырлиной Е.М. и к.х.н. Никитиной В.С. за предоставленные образцы экстрактов и индивидуальных соединений.

Р-5277

РНБ Русский фонд

2006-4
3973

Хайруллина Вероника Радиевна

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПРИРОДНЫХ
ПОЛИФЕНОЛОВ**

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Подписано в печать 15.03.2005 г. Бумага офсетная Формат 60x84/16.
Гарнитура Times. Отпечатано на ризографе.
Усл.печ.л. 1,39. Уч.-изд.л. 1,59. Тираж 100 экз. Заказ 152

*Редакционно-издательский отдел
Башкирского государственного университета
450074, РБ, г Уфа, ул. Фрунзе, 32.*

*Отпечатано на множительном участке
Башкирского государственного университета
450074, РБ, г Уфа, ул. Фрунзе, 32.*