

СИНЕРГИЗМ АНТИРАДИКАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРИРОДНЫХ ФЕНОЛОВ В СМЕСЯХ С МОНО- И ОЛИГОСАХАРИДАМИ

Н.И. Белая, А.В. Белый, Е.А. Будникова

Наталья Ивановна Белая (ORCID 0000-0003-3359-3239)*, Александр Владимирович Белый (ORCID 0000-0001-6837-9211), Екатерина Андреевна Будникова (ORCID 0000-0001-8587-6359)

Кафедра физической химии, Донецкий национальный университет, ул. Университетская, 24, Донецк, Донецкая Народная Республика, Российская Федерация, 283001

E-mail: nbelaya@donnu.ru*, belyj@donnu.ru, bbkatyy@mail.ru

Установлено, что в кислой среде с $pH = 2$ скорость дезактивации радикала 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразила в реакции с природными фенольными соединениями значительно возрастает в присутствии моно- и олигосахаридов по сравнению с аддитивным действием смеси. Максимальный антирадикальный синергический эффект (65% и выше) проявили бинарные композиции кофейная кислота–мальтоотриоза и дигидрокверцетин–мальтоотриоза в соотношении 80:20% и 70:30% соответственно. Менее активными оказались смеси сахаридов с протокатеховой и пирокатеховой кислотами. Для всех групп фенолов синергическая активность возрастает при переходе от моно- к ди- и трисахариду. Рост pH среды от 2 до 9 приводит фактически к полному нивелированию антирадикального синергизма (до 10%) во всех исследованных фенольно-сахаридных смесях, а также к появлению эффектов антагонизма при высоком содержании углевода в композиции. Методом ЯМР-спектроскопии установлено, что механизм синергизма заключается в образовании между реагентами реакции водородного комплекса фенол–сахарид донорного типа, более эффективно взаимодействующего с радикалом, чем соответствующие мономеры. Увеличение доли сахара в смеси, а также рост pH среды приводит к повышению содержания H -комплексов акцепторного типа, когда фенол выступает в роли протоноакцептора, а значит, и восстановительные свойства комплексов, и синергический эффект композиций в реакции с гидразильным радикалом будут снижаться. В качестве структурного параметра, связанного с синергическим действием композиции, использован потенциал ионизации фенольного компонента смеси, рассчитанный методом DFT. Установленная линейная зависимость между максимальным синергическим эффектом фенольно-сахаридной смеси и потенциалом ионизации фенолов в дальнейшем может использоваться для формирования полуэмпирических моделей прогнозирования эффективности антирадикального действия синергических композиций природный фенол–углевод. Комплексное исследование фенольно-сахаридных смесей позволит расширить ассортимент природных синергических систем с выраженной антирадикальной активностью для практического применения в фармацевтике, парфюмерии и пищевой промышленности.

Ключевые слова: синергический эффект, антирадикальная активность, природные фенолы, моно- и полисахариды

THE SYNERGY OF THE ANTIRADICAL ACTION OF NATURAL PHENOLS IN MIXTURES WITH MONO- AND OLIGOSACCHARIDES

N.I. Belaya, A.V. Belyi, E.A. Budnikova

Natalia I. Belaya (ORCID 0000-0003-3359-3239)*, Aleksandr V. Belyi (ORCID 0000-0001-6837-9211), Ekaterina A. Budnikova (ORCID 0000-0001-8587-6359)

Chair of Physical Chemistry, Donetsk National University, Universitetskaya st., 24, Donetsk, Donetsk People Republic, 283001, Russia

E-mail: nbelaya@donnu.ru*, belyj@donnu.ru, bbkatyy@mail.ru

It has been established that in an acidic medium with pH = 2, the rate of deactivation of the 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical in the reaction with natural phenolic compounds significantly increases in the presence of mono- and oligosaccharides compared to the additive action of the mixture. The maximum antiradical synergistic effect (65% and more) was shown by the binary compositions caffeic acid–maltotriose and dihydroquercetin–maltotriose in the ratio of 80:20% and 70:30%, respectively. Mixtures of saccharides with protocatechuic and pyrocatechuic acids turned out to be less active. For all groups of phenols, the synergistic activity increases with the transition from mono- to di- and trisaccharides. An increase in the medium pH from 2 to 9 actually leads to a complete leveling of antiradical synergism (up to 10%) in all studied phenol-saccharide mixtures, as well as to the appearance of antagonism effects at a high carbohydrate content in the composition. Using NMR spectroscopy, it has been established that the mechanism of synergism consists in the formation of a phenol–saccharide donor-type hydrogen complex between the reactants, which interacts with the radical more effectively than the corresponding monomers. An increase in sugar percentage in the mixture, as well as an increase in the medium pH, leads to the growth of the content of H-complexes of the acceptor-type when phenol acts as a proton acceptor, thus the reducing properties of the complexes and the synergistic effect of the compositions in the reaction with hydrazyl radical will decrease. As a structural parameter associated with the synergistic effect of the composition, the ionization potential of the phenolic component of the mixture, calculated by the DFT method, was used. The established linear relationship between the maximum synergistic effect of the phenol-saccharide mixture and the ionization potential of phenols can later be used to form semi-empirical models for predicting the effectiveness of the antiradical action of natural phenol-carbohydrate synergistic compositions. A comprehensive study of phenol-saccharide mixtures will expand the range of natural synergistic systems with expressed antiradical activity for practical use in pharmacy, perfumery, and the food industry.

Key words: synergistic effect, antiradical activity, natural phenols, mono- and polysaccharides

Для цитирования:

Белая Н.И., Бельи А.В., Будникова Е.А. Синергизм антирадикального действия природных фенолов в смесях с моно- и олигосахаридами. *Изв. вузов. Химия и хим. технология*. 2023. Т. 66. Вып. 5. С. 32–40. DOI: 10.6060/ivkkt.20236605.6785.

For citation:

Belaya N.I., Belyi A.V., Budnikova E.A. The synergy of the antiradical action of natural phenols in mixtures with mono- and oligosaccharides. *ChemChemTech [Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.]*. 2023. V. 66. N 5. P. 32–40. DOI: 10.6060/ivkkt.20236605.6785.

ВВЕДЕНИЕ

Растительные фенолы зарекомендовали себя как эффективные ингибиторы процессов окисления в органических и водных средах за счет их выраженной антиоксидантной и антирадикальной активности [1-3]. Такие соединения в значительном количестве поступают в организм человека, поскольку являются обязательным компонентом почти любого растительного продукта питания. Большое значение имеет их низкая токсичность, а значит, и возможность действия в организме человека в течение длительного времени [4]. В связи с этим постоянно проводится поиск эффективных фенольных антиоксидантов среди объектов растительной природы или отрабатываются способы расширения диапазона их действия путем совместного применения с другими группами природных биологически активных веществ – углеводами,

белками, липидами [5-7]. Исследование таких синергических комбинаций на сегодняшний день актуально и востребовано, поскольку способствует не только расширению ассортимента полифункциональных пищевых добавок с выраженной антирадикальной направленностью, но и позволяет моделировать механизм совместного действия важнейших групп природных соединений в составе растительных препаратов.

Целью данной работы является исследование кинетики реакций окисления различных групп природных фенолов (ArOH) радикалом 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразилом (DPPH[•]) в присутствии моно- и олигосахаридов (Sacch) в водных средах с разным pH, а также установление эффектов синергизма в изученных фенольно-сахаридных композициях.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе без предварительной очистки использовались соединения (табл. 1) (Fluka, Merck,

PanReac), относящиеся к различным группам растительных фенолов (фенолкарбоновые, гидрокси-коричные кислоты, флавоноиды) и зарекомендовавшие себя как эффективные антиоксиданты [8, 9]. Синергистами выступали моно-, ди и трисахариды – D(+)-глюкоза, моногидрат D(+)-мальтозы и D(+)-мальтотриоза (Merck, Acros Organics). Модельным радикалом являлся свободный стабильный радикал DPPH• (Merck) как наиболее широко используемый реагент для тестирования антирадикальной активности (АРА) веществ [10, 11]. Диметилсульфоксид (ДМСО) (Supelco) применяли для повышения растворимости DPPH• и фенолов в смеси с солянокислым ($pH = 2$), фосфатно-цитратным ($pH = 7,35$) и фосфатно-боратным ($pH = 9$) буферами, приготовленными по ГОСТ 4949.2–2016 [12], в соотношении 10:90, 20:80 и 30:70% соответственно.

Раствор DPPH• в ДМСО имеет интенсивный фиолетовый цвет с максимумом поглощения при длине волны 520 нм. При условии его хранения в темноте интенсивность спектра в максимуме поглощения остается неизменной в течение 72 ч. Реакции DPPH• с AgOH и их бинарными композициями с Sacch проводили в растворителях, из которых предварительно удаляли кислород барботированием аргона в течение 15–20 мин для исключения возможных реакций фенолов и продуктов их превращения с кислородом. Кинетику реакций исследовали на спектрофотометре Specord S300 UV-VIS (Carl Zeiss Jena, Германия) в термостатируемой ячейке со встроенной магнитной мешалкой при $T = 293 \pm 2$ К. Композиции фенол–сахарид в разных соотношениях растворяли в смеси буфер–ДМСО, выдерживали в течение 15 мин, а затем аликвоту этого раствора вводили в раствор DPPH• в смеси буфер–ДМСО. Суммарная концентрация фенольно-сахаридной композиции в растворе составляла $1 \cdot 10^{-4}$ моль·л⁻¹ и $1 \cdot 10^{-5}$ моль·л⁻¹ в зависимости от pH среды. Радикал DPPH• и смесь AgOH–Sacch смешивали в соотношении 1:1, затем измеряли оптическую плотность раствора смеси (с интервалом 1–2 с) и с помощью молярного коэффициента светопоглощения ($\epsilon_{\text{буфер-ДМСО}} = 1,7 \cdot 10^3$ л·моль⁻¹·мм⁻¹) по закону Бугера–Ламберта–Бера рассчитывали концентрацию радикала. Кинетический эксперимент повторялся не менее 3 раз. Для обработки полученных данных использовался пакет программ для спектрофотометрического анализа WinASPECT 2.3.1.

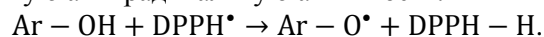
Регрессионный анализ кинетических кривых расходования DPPH• в реакции со смесью AgOH–Sacch в разных соотношениях (с глубиной превращения радикала не менее 60–70%) проводился

в Microsoft Excel с использованием надстройки «Пакет анализа». Параметры функциональной зависимости концентрации от времени вычислялись по экспериментальным данным с помощью инструмента «Линия тренда», а также функций ЛГРФПРИБЛ и ЛИНЕЙН. По величине коэффициента детерминации ($\tilde{r}^2 > 0,98$) установлено, что функциональной зависимостью $[DPPH^{\bullet}] = f(t)$, которая наиболее точно описывает экспериментальные данные, является полином 2-го порядка. Начальная скорость реакции $v_{(0)}$ определялась [13] дифференцированием аналитического выражения функциональной связи $[DPPH^{\bullet}] = [DPPH^{\bullet}]_0 - b_1 t + b_2 t^2$, тогда скорость реакции $v = d[DPPH^{\bullet}]/dt = -b_1 + 2b_2 t$. Величина $v_{(0)}$ вычислялась при подстановке значения $t = 0$ в уравнение скорости.

Процесс комплексообразования между фенолами и сахарами исследовался методом ЯМР-спектроскопии на спектрометре Bruker Avance-II-400 (производство Bruker, Германия) с рабочей частотой 400 МГц при $T = 298$ К. Спектры ¹H ЯМР регистрировали в CCl₄:ДМСО-d₆ (50 об%:50 об%). Добавка ДМСО-d₆ способствовала повышению растворимости реагентов в композиции AgOH–Sacch. Для снижения процесса самоассоциации AgOH их концентрация (0,01 моль·л⁻¹) в смеси была значительно меньше глюкозы (0,1–0,2 моль·л⁻¹) и поддерживалась постоянной.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование кинетики реакций окисления различных групп природных фенолов радикалом DPPH• в присутствии моно- и олигосахаридов вначале проводилось в сильно кислой среде (при $pH = 2$), подавляющей ионизацию AgOH. По величинам начальных скоростей реакции, полученным из кинетических кривых расходования DPPH• (рис. 1), видно, что фенольные соединения активно реагируют с радикалом, превращая его в неактивное молекулярное соединение – 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразин (DPPH–H), и тем самым проявляют выраженную антирадикальную активность:



Это подтверждается данными, полученными в работе [14], для сред с низкой полярностью (бензол), где растительные фенолы в реакции с DPPH• также зарекомендовали себя как эффективные акцепторы радикалов.

Сахариды не окисляются радикалом, но при этом в определенной концентрации в смеси с фенольными соединениями способны усиливать их антирадикальное действие, проявляя тем самым функции синергиста (рис. 1).

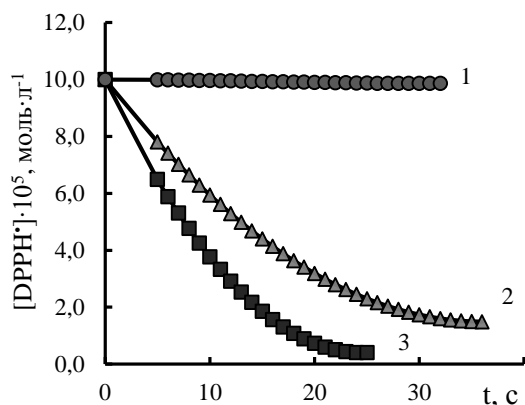


Рис. 1. Кинетические кривые расходования DPPH[•] в присутствии: 1 – мальтотриозы ($C = 2 \cdot 10^{-5}$ моль · л⁻¹); 2 – кофейной кислоты ($C = 8 \cdot 10^{-5}$ моль · л⁻¹); 3 – смеси кофейная кислота–мальтотриоза (80:20%). Растворитель – солянокислый буфер (pH = 2)–DMSO (90:10 об%), суммарная концентрация смеси ArOH–Sacch $1 \cdot 10^{-4}$ моль · л⁻¹, T = 293±2 K

Fig. 1. Kinetic curves of DPPH[•] consumption in the presence of: 1 – maltotriose ($C = 2 \cdot 10^{-5}$ mol · l⁻¹); 2 – caffeic acid ($C = 8 \cdot 10^{-5}$ mol · l⁻¹); 3 – a mixture of caffeic acid and maltotriose (80:20%). Solvent – a mixture of hydrochloric acid buffer with pH=2 and DMSO (90:10 vol%), the total concentration of ArOH–Sacch mixture – $1 \cdot 10^{-4}$ mol · l⁻¹, T = 293±2 K

Для определения наиболее эффективных композиций варьировали соотношение ArOH и Sacch в широком диапазоне при постоянной суммарной концентрации смеси. Величину синергического эффекта (*SE*) оценивали по усилению антирадикального действия смеси по сравнению с аддитивным действием фенола и углевода:

$$SE = \left(\frac{v_{(0)\text{mix}} - v_{\text{add}}}{v_{\text{add}}} \right) \cdot 100\% = \left(\frac{\Delta v}{v_{\text{add}}} \right) \cdot 100\%$$

где $v_{(0)\text{mix}}$ – начальная скорость реакции DPPH[•] со смесью ArOH и Sacch, моль · л⁻¹ · с⁻¹; $v_{\text{add}} = v_{(0)\text{ArOH}} + v_{(0)\text{Sacch}}$ – начальная скорость в предположении, что действие смеси аддитивно (так как $v_{(0)\text{Sacch}} = 0$, то $v_{\text{add}} = v_{(0)\text{ArOH}}$), моль · л⁻¹ · с⁻¹; $v_{(0)\text{ArOH}}$ – начальная скорость реакции DPPH[•] с ArOH при его молярной концентрации, принятой в смеси, моль · л⁻¹ · с⁻¹; $v_{(0)\text{Sacch}}$ – начальная скорость реакции DPPH[•] с Sacch при его молярной концентрации, принятой в смеси, моль · л⁻¹ · с⁻¹. Эффект считался зафиксированным, если $SE > 0$.

Анализ зависимости синергического эффекта *SE* от состава смеси ArOH–Sacch в кислой среде показал (рис. 2), что все изученные углеводы проявляют свойства синергиста, в той или иной мере усиливая антирадикальное действие исследованных групп природных фенолов. Наиболее высокие $SE_{\text{max}} = (\Delta v / v_{\text{add}})_{\text{max}} \cdot 100\%$ (табл. 1) наблюдаются для композиций гидроксикоричных кислот и флавоноидов с трисахаридом.

Таблица 1

Величины максимального синергического эффекта (SE_{max}) композиций ArOH–Sacch (суммарная концентрация $1 \cdot 10^{-4}$ моль · л⁻¹) в реакции с DPPH[•] при pH = 2 и T = 293±2 K, а также расчетные значения адиабатических потенциалов ионизации (PI) молекул фенолов (B3LYP/6-311++G(d,p), растворитель – вода, PCM)

Table 1. Values of the maximum synergistic effect (SE_{max}) of ArOH–Sacch compositions (total concentration $1 \cdot 10^{-4}$ mol · l⁻¹) in the reaction with DPPH[•] at pH = 2 and T = 293±2 K, and calculated values of adiabatic ionization potentials (PI) of phenol molecules (B3LYP/6-311++G(d,p), solvent – water, PCM)

| Соединение | $SE_{\text{max}}, \%$ | | | PI, эВ |
|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------|
| | глюкоза | мальтоза | мальтотриоза | |
| пирокатеховая кислота | 29,3±0,9 ^a | 34,8±1,4 ^c | 40,2±1,7 ^c | 6,13 |
| протокатеховая кислота | 23,2±0,9 ^a | 28,7±0,9 ^c | 34,7±1,4 ^c | 6,28 |
| гентициновая кислота | 42,4±1,7 ^a | 45,1±1,7 ^c | 51,4±2,1 ^c | 5,96 |
| 3-пирогаллол карбоновая кислота | 35,4±1,4 ^a | 38,5±1,4 ^c | 45,5±1,7 ^c | 6,16 |
| галловая кислота | 30,4±1,1 ^a | 36,1±1,4 ^c | 39,8±1,7 ^c | 6,25 |
| сиреневая кислота | 35,0±1,4 ^a | 40,1±1,7 ^c | 45,2±1,7 ^c | 6,1 |
| кофейная кислота | 50,8±2,1 ^a | 55,8±2,2 ^c | 66,1±2,7 ^c | 5,71 |
| феруловая кислота | 48,2±1,7 ^a | 52,1±2,1 ^c | 60,1±2,6 ^c | 5,72 |
| синаповая кислота | 42,4±1,7 ^a | 47,4±1,7 ^c | 52,8±2,1 ^c | 5,81 |
| кемпферол | 41,5±1,7 ^b | 44,7±1,7 ^a | 51,3±2,1 ^a | 5,85 |
| кверцетин | 43,4±1,7 ^b | 46,1±1,7 ^a | 52,6±2,1 ^a | 5,82 |
| дигидрокверцетин | 55,8±2,2 ^b | 58,2±2,2 ^a | 65,7±2,7 ^a | 5,67 |
| морин | 52,3±2,1 ^b | 55,2±2,2 ^a | 63,8±2,7 ^a | 5,74 |
| мирицетин | 50,3±2,1 ^b | 51,9±2,1 ^a | 56,4±2,2 ^a | 5,79 |

Примечание: ^{a)} соотношение ArOH–Sacch 70:30%; ^{b)} соотношение ArOH–Sacch 60:40%; ^{c)} соотношение ArOH–Sacch 80:20%

Note: ^{a)} ArOH–Sacch ratio 70:30%; ^{b)} ArOH–Sacch ratio 60:40%; ^{c)} ArOH–Sacch ratio 80:20%

Так, синергизм антирадикального действия смесей кофейная кислота–мальтотриоза (80:20%) и дигидрокверцетин–мальтотриоза (70:30%) превышает 65%. Довольно эффективна смесь кверцетин–мальтотриоза ($SE_{\text{max}} = 52,6\%$), причем кверцетин, как установлено ранее [15], активно действует и в синергической смеси с глюкозой в реакции с пероксирадикалами хлопкового масла.

Менее активны смеси с гидроксibenзойными кислотами, максимальный синергический эффект которых не превышает выше 50% ни с глюкозой, ни с ее димерной и тримерной формами. Причем для всех групп фенолов синергическая активность композиций при переходе от моно- к ди- и трисахариду возрастает, а при увеличении содержания сахара в композиции – снижается (рис. 2).

Кинетическая картина эксперимента изменяется при переходе от кислой к нейтральной среде (при $pH = 7,35$), когда ионизирующая способность среды резко возрастает, а значит, в качестве реагентов могут выступать как молекулярные, так и ионные формы фенолов. Видно (табл. 2, рис. 2), что величина синергического эффекта, определенная по начальным скоростям исследуемой реакции, снижается в среднем в 2-3 раза.

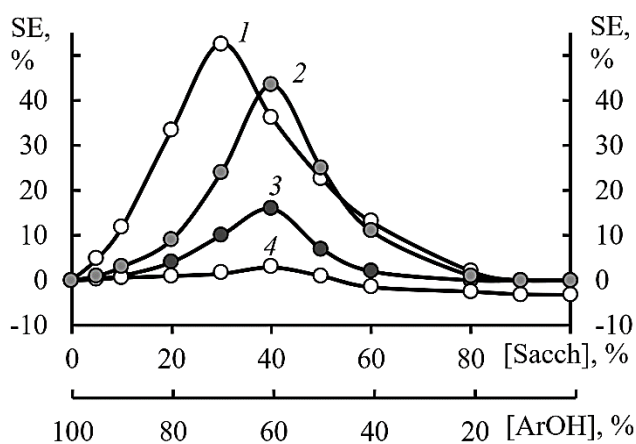


Рис. 2. Зависимость величины синергического эффекта (SE) в реакции с DPPH[•] от состава смеси: 1 – кверцетин–мальтоотриоза при pH = 2 (суммарная концентрация смеси $3 \cdot 10^{-4}$ моль·л⁻¹); 2 – кверцетин–глюкоза при pH = 2 (суммарная концентрация смеси $3 \cdot 10^{-4}$ моль·л⁻¹); 3 – кверцетин–глюкоза при pH = 7,35 (суммарная концентрация смеси $1 \cdot 10^{-5}$ моль·л⁻¹); 4 – кверцетин–глюкоза при pH = 9 (суммарная концентрация смеси $1 \cdot 10^{-5}$ моль·л⁻¹). T = 293±2 K

Fig. 2. Dependence of the synergistic effect value (SE) in the reaction with DPPH[•] on the composition of the mixture: 1 – quercetin–maltotriose at pH = 2 (total concentration of the mixture $3 \cdot 10^{-4}$ mol·l⁻¹); 2 – quercetin–glucose at pH = 2 (total concentration of the mixture $3 \cdot 10^{-4}$ mol·l⁻¹); 3 – quercetin–glucose at pH = 7.35 (total concentration of the mixture $1 \cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹); 4 – quercetin–glucose at pH = 9 (total concentration of the mixture $1 \cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹). T = 293±2 K

Более резкое падение синергического действия наблюдается для смесей сахаридов с флавоноидами, где SE_{max} не превышает 35%. Дальнейшее повышение pH среды до 9 приводит фактически к полному нивелированию антирадикального синергизма (до 10%) во всех исследованных фенольно-сахаридных смесях, а также к появлению эффектов антагонизма при высоком содержании углевода в композиции (рис. 2).

Таблица 2

Величины максимального синергического эффекта (SE_{max}) композиций ArOH–Sacch (суммарная концентрация $1 \cdot 10^{-5}$ моль·л⁻¹) в реакции с DPPH[•] при pH = 7,35 и T = 293±2 K

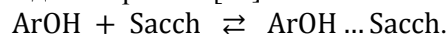
Table 2. Values of the maximum synergistic effect (SE_{max}) of ArOH–Sacch compositions (total mixture concentration $1 \cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹) at pH = 7.35 and T = 293±2 K

| Соединение | SE_{max} , % | | |
|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | глюкоза | мальтоза | мальтотриоза |
| пирокатеховая кислота | 12,4±0,4 ^a | 18,8±0,7 ^c | 22,2±0,9 ^c |
| протокатеховая кислота | 9,8±0,4 ^a | 13,5±0,4 ^c | 19,2±0,8 ^c |
| гентиизиновая кислота | 18,0±0,7 ^a | 24,4±0,8 ^c | 30,4±1,2 ^c |
| 3-пирогаллолкарбоновая кислота | 15,0±0,5 ^a | 20,8±0,8 ^c | 25,1±1,1 ^c |
| галловая кислота | 12,9±0,4 ^a | 17,5±0,7 ^c | 22,0±0,9 ^c |
| сиреневая кислота | 14,8±0,5 ^a | 21,7±0,8 ^c | 25,0±1,1 ^c |
| кофейная кислота | 21,5±0,8 ^a | 30,1±1,2 ^c | 36,5±1,3 ^c |
| феруловая кислота | 20,4±0,8 ^a | 28,1±1,1 ^c | 33,2±1,2 ^c |
| синаповая кислота | 18,0±0,7 ^a | 25,6±1,1 ^c | 29,2±1,1 ^c |
| кемпферол | 15,3±0,5 ^b | 23,2±0,9 ^a | 27,0±1,1 ^c |
| кверцетин | 15,9±0,5 ^b | 21,7±0,9 ^a | 26,5±1,1 ^a |
| дигидрокверцетин | 19,8±0,7 ^b | 28,1±1,1 ^a | 34,4±1,2 ^a |
| морин | 18,7±0,7 ^b | 25,0±1,1 ^a | 28,6±1,1 ^a |
| мирицетин | 16,1±0,5 ^b | 22,8±0,9 ^a | 30,9±1,2 ^a |

Примечание: ^a) соотношение ArOH–Sacch 70:30%; ^b) соотношение ArOH–Sacch 60:40%; ^c) соотношение ArOH–Sacch 80:20%

Note: ^a) ArOH–Sacch ratio 70:30%; ^b) ArOH–Sacch ratio 60:40%; ^c) ArOH–Sacch ratio 80:20%

Наиболее вероятно, что установленный синергизм относится к типу, когда при взаимодействии реагентов образуется продукт, более эффективно реагирующий с радикалом, чем исходные индивидуальные вещества. Такими продуктами могут быть межмолекулярные водородные комплексы фенолов с сахарами (ArOH... Sacch), возможность образования которых была доказана при изучении гидротропных свойств углеводов с флавоноидами в работе [16]:



Результаты, полученные ранее [17] и представленные в данной работе, также дают основание утверждать, что синергический эффект смеси природных фенолов с сахарами в реакции с DPPH[•] реализуется за счет образования H-комплекса ArOH... Sacch с восстановительными свойствами выше, чем у соответствующих мономеров.

Наиболее реакционноспособными являются комплексы донорного типа, когда в качестве протонодонора выступает фенол [17, 18]. Наличие таких Н-комплексов было непосредственно подтверждено методом ЯМР-спектроскопии. При сравнении спектров индивидуальных фенолов видно (рис. 3а), что в диапазоне 7,10–12,20 м.д. находятся сигналы протонов гидроксигрупп ArOH. Для углеводов они практически все расположены в области меньших химических сдвигов, что значительно упрощает анализ спектров смесей фенол–сахарид. На примере композиции кверцетина с мальтозой показано (рис. 3б), что добавка дисахарида к флавоноиду приводит к смещению пиков фенола при 12,01, 8,85 и 7,21 м.д. в более слабое поле по сравнению с индивидуальным веществом (рис. 3а). Это является характерной особенностью О–Н-групп, связанных водородной связью [19].

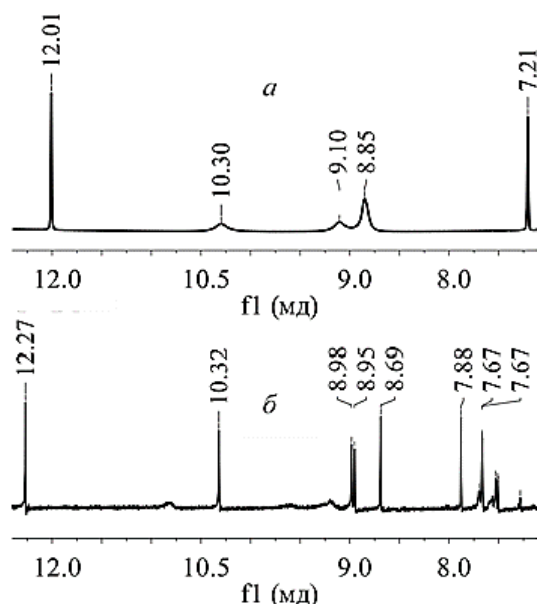
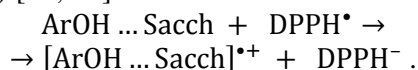


Рис. 3. ^1H ЯМР-спектры кверцетина (а) ($C = 0,01$ моль·л $^{-1}$) и смеси $0,01$ моль·л $^{-1}$ кверцетина с $0,1$ моль·л $^{-1}$ мальтозы (б). Растворитель – CCl_4 – DMSO-d_6 (90:10 об%). $T = 298$ К
Fig. 3. ^1H NMR-spectra of quercetin (a) ($C = 0.01$ mol·l $^{-1}$) and of the mixture of 0.01 mol·l $^{-1}$ quercetin with 0.1 mol·l $^{-1}$ maltose (б). Solvent – the mixture of CCl_4 and DMSO-d_6 (90:10 vol%). $T = 298$ K

Таким образом, в полярных средах с низкой ионизирующей способностью (кислый буфер) гидразильный радикал будет наиболее активно дезактивироваться донорным Н-комплексом $\text{ArOH} \dots \text{Sacch}$ по известному механизму переноса электрона (лимитирующая стадия) с последующей передачей протона (ET–PT, Electron Transfer–Proton Transfer) [20, 21]:



Примечательно, что SE_{max} композиций проявляется в области с низким содержанием углевода, что, по-видимому, связано с образованием максимально возможного количества донорных Н-комплексов (рис. 2). Дальнейшее же увеличение доли сахаров в смеси способствует снижению синергического эффекта, вероятно, за счет повышения содержания комплексов акцепторного типа с меньшими восстановительными свойствами.

По этой же причине, по-видимому, наблюдается снижение синергической активности смесей при повышении pH среды, поскольку в этом случае часть ArOH диссоциирует с образованием фенолят-ионов, которые при образовании водородного комплекса с углеводом выполняют роль протоноакцептора. Подтверждением вышесказанному, служит снижение эффектов синергизма (табл. 2) и даже антагонизм (рис. 2) фенольно-сахаридных композиций в нейтральном и щелочном буферах.

По полученным данным в средах с разным pH видно, что поиск и исследование синергических природных композиций фенол–углевод с высокой антирадикальной активностью является сложной и нетривиальной задачей, поскольку для ее решения требуется комплексное исследование связи «среда – механизм – структура – активность соединения».

Одна из трудностей заключается в поиске параметров строения вещества, ответственных за синергический эффект смеси. Такими параметрами могли бы быть структурные характеристики образующегося Н-комплекса $\text{ArOH} \dots \text{Sacch}$. Однако найти их крайне проблематично, поскольку в системе образуется смесь комплексов разных типов. Наиболее рациональным представляется иной подход – определить взаимосвязь между структурными параметрами мономеров Н-комплексов и синергическим эффектом композиций.

В нашей работе, где более представительным является фенольный компонент смеси, методом DFT был рассчитан потенциал ионизации молекулы фенола как структурный механизм-зависимый параметр, который связан одновременно и с восстановительными свойствами комплекса $\text{ArOH} \dots \text{Sacch}$, и с лимитирующей стадией механизма ET–PT в полярных средах.

Термохимические характеристики ArOH рассчитывались в рамках теории функционала плотности (DFT) с использованием гибридного функционала B3LYP в программе Gaussian 09 [22]. Поиск основных конформеров предварительно осуществлялся в рамках полуэмпирического метода PM6. Структуры с самой низкой электронной энергией использовались в качестве начального

приближения для расчета на уровне ВЗЛУР/6-311++G(d,p). Геометрия всех структур была оптимизирована по всем независимым переменным без ограничений по симметрии. Все полученные результаты относятся к основному состоянию и стандартным условиям ($T = 298\text{K}$, $P = 1\text{ атм}$). Первичные расчеты проводились в газовой фазе, а затем использовались в качестве основы для полной оптимизации геометрии фенолов с учетом влияния растворителя (вода) с применением подхода поляризуемого континуума РСМ [23]. Для всех равновесных структур был проведен гармонический колебательный анализ с целью тестирования на соответствие минимуму.

Значения адиабатических потенциалов ионизации молекул фенольных соединений (PI) рассчитывались по формулам:

$$PI = (E_{\text{tot}} + E_{\text{ZPE}} + H_{\text{corr}})_{\text{ArOH}^+} - (E_{\text{tot}} + E_{\text{ZPE}} + H_{\text{corr}})_{\text{ArOH}}$$

где E_{tot} – полная электронно-ядерная энергия частицы, E_{ZPE} – энергия нулевых колебаний частицы, H_{corr} – температурная поправка к энтальпии частицы.

Анализ полученных расчетных значений PI (табл. 1) показал, что чем меньше величина потенциала ионизации фенола, тем выше синергический эффект фенольно-сахаридной композиции. Между экспериментальными SE_{max} смесей и вычисленными PI молекул фенолов (табл. 1, 2) устанавливались линейные регрессионные зависимости в системе Statistica Demo 6.0. В кислой среде наблюдаются обратно пропорциональные зависимости с высоким коэффициентом корреляции порядка 0,95. Например, для композиций с мальтотриозой:

$$SE_{\text{max}} = (6,99 \pm 0,10) - (2,04 \pm 0,19) \cdot 10^{-2} PI,$$

$n = 14$; $\tilde{r} = 0,950$; $\tilde{r}^2 = 0,902$; $F = 111$; $p < 0,00000$; $S_{\text{est}} = 0,07$,

где n – число опытов; \tilde{r} – парный коэффициент корреляции; F – критерий Фишера проверки значимости линейной регрессии; p – уровень значимости, при котором может быть принята гипотеза о равенстве нулю истинного углового коэффициента уравнения регрессии. S_{est} – стандартная ошибка оценки (или стандартное отклонение ошибок предсказания) является мерой точности величин, предсказанных по предложенной линейной модели.

При переходе к нейтральному и щелочному буферам связь SE_{max} с PI слабо выражена или полностью отсутствует. Примечательно, что высокие коэффициенты корреляции в кислой среде и отсутствие указанной зависимости в щелочном буфере служат дополнительным подтверждением реали-

зации установленного механизма синергического антирадикального действия фенольно-сахаридных композиций с участием донорного Н-комплекса $\text{ArOH} \dots \text{Sacch}$.

ВЫВОДЫ

При исследовании эффектов синергизма в реакциях окисления различных групп природных фенолов радикалом DPPH^{\cdot} в присутствии моно- и олигосахаридов в водных средах максимальный синергический эффект проявили бинарные композиции кофейная кислота–мальтотриоза (80:20%) и дигидрокверцетин–мальтотриоза (70:30%) в солянокислом буфере с $pH = 2$. Механизм синергического действия смеси заключается в образовании между реагентами исследованной реакции Н-комплекса фенол–сахарид донорного типа, более эффективно взаимодействующего с радикалом, чем соответствующие мономеры. Установленные линейные регрессии между экспериментальным синергическим эффектом композиции и расчетным потенциалом ионизации фенольного соединения могут в дальнейшем послужить основой для формирования полуэмпирических моделей прогнозирования эффективности антирадикального действия синергических смесей природный фенол–углевод.

БЛАГОДАРНОСТИ

Расчеты в рамках теории функционала плотности выполнены в Центре коллективного пользования «Высокопроизводительные вычисления» Южного Федерального университета. Авторы выражают признательность заведующему кафедрой физической и коллоидной химии имени профессора В.А. Когана Южного Федерального университета, профессору И.Н. Щербакову за оказанную помощь при выполнении квантово-химических расчетов.

Calculations within the framework of the density functional theory were performed at the Center for Collective Use "High-Performance Computing" of the Southern Federal University. The authors express their gratitude to the head of the Department of Physical and Colloidal Chemistry named after Professor V.A. Kogan of the Southern Federal University, Professor I.N. Shcherbakov for assistance in performing quantum chemical calculations.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

The authors declare the absence a conflict of interest warranting disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Khanam U., Oba S., Yanase E., Murakami Y.** Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables. *J. Funct. Foods*. 2012. V. 4. N P. 979-987. DOI: 10.1016/j.jff.2012.07.006.
2. **Das S., Mitra I., Batuta S., Niharul Alam M., Roy K., Begum N.** Design, synthesis and exploring the quantitative structure-activity relationship of some antioxidant flavonoid analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014. V. 24. N 21. P. 5050-5054. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.09.028.
3. **Chen Y., Xiao H., Zheng J., Liang G.** Structure-Thermodynamics-Antioxidant Activity Relationships of Selected Natural Phenolic Acids and Derivatives: An Experimental and Theoretical Evaluation. *PLoS ONE*. 2015. V. 10. N 3. P. 1-20. DOI: 10.1371/journal.pone.0121276.
4. **Перевозкина М.Г.** Тестирование антиоксидантной активности полифункциональных соединений кинетическими методами. Новосибирск: СибАК. 2014. 240 с.
5. **Mirela K., Ante L., Zaklina S., Mihaela S., Anita P.** Evaluation of Antioxidant Interactions of Combined Model Systems of Phenolics in the Presence of Sugars. *Nat. Prod. Commun.* 2016. V. 11. N 10. P. 1445-1448. DOI: 10.1177/1934578X1601101008.
6. **Pereira R.B., Sousa C., Costa A., Andrade P.B., Valentão P.** Glutathione and the Antioxidant Potential of Binary Mixtures with Flavonoids: Synergisms and Antagonisms. *Molecules*. 2013. V. 8. N 18. P.8858-8872. DOI: 10.3390/molecules18088858.
7. **Doert M., Jaworska K., Moersel J.-Th., Kroh L.W.** Synergistic effect of lecithins for tocopherols: lecithin-based regeneration of α -tocopherol. *Eur. Food. Res. Technol.* 2012. V. 5. N 235. P. 915-928. DOI: 10.1007/s00217-012-1815-7.
8. **Filipović M., Marković Z., Dorović J., Marković J., Lučić B., Amić D.** QSAR of the free radical scavenging potency of selected hydroxybenzoic acids and simple phenolics. *Comptes Rendus Chimie*. 2015. V. 18. N 5. P. 492-498. DOI: 10.1016/j.crci.2014.09.001.
9. **Khanam U., Oba S., Yanase E., Murakami Y.** Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables. *J. Funct. Foods*. 2012. V. 4. P. 979-987. DOI: 10.1016/j.jff.2012.07.006.
10. **Kedare S.B., Singh R.P.** Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol.* 2011. V. 48. N 4. P. 412-422. DOI: 10.1007/s13197-011-0251-1.
11. **Marinova G., Batchvarov V.** Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. *Bulg. J. Agric. Sci.* 2011. V. 17. N 1. P. 11-24.
12. ГОСТ 4919.2–2016 Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления буферных растворов. М.: Стандартинформ. 2016. 13 с.
13. **Денисов Е.Т.** Кинетика гомогенных химических реакций. М.: Высш. Школа. 1978. 367 с.
14. **Белая Н.И., Белый А.В.** Полуэмпирическая модель прогнозирования антирадикальной активности природных фенолкарбоновых кислот. *Изв. вузов. Химия и хим. технология*. 2019. Т. 62. Вып. 7. С. 80-84. DOI: 10.6060/ivkkt.20196207.5952.
15. **Белая Н.И., Белый А.В., Тихонова Г.А., Удалов Я.С., Андриенко Г.О.** Синергический эффект бинарных композиций кверцетин–моносахарид в реакции со свободными радикалами. *Изв. вузов. Химия и хим. технология*. 2019. Т. 62. Вып. 2. С. 38-42. DOI: 10.6060/ivkkt.20196202.5822.

REFERENCES

1. **Khanam U., Oba S., Yanase E., Murakami Y.** Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables. *J. Funct. Foods*. 2012. V. 4. N P. 979-987. DOI: 10.1016/j.jff.2012.07.006.
2. **Das S., Mitra I., Batuta S., Niharul Alam M., Roy K., Begum N.** Design, synthesis and exploring the quantitative structure-activity relationship of some antioxidant flavonoid analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014. V. 24. N 21. P. 5050-5054. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.09.028.
3. **Chen Y., Xiao H., Zheng J., Liang G.** Structure-Thermodynamics-Antioxidant Activity Relationships of Selected Natural Phenolic Acids and Derivatives: An Experimental and Theoretical Evaluation. *PLoS ONE*. 2015. V. 10. N 3. P. 1-20. DOI: 10.1371/journal.pone.0121276.
4. **Perevozkina M.G.** Testing the antioxidant activity of polyfunctional compounds by kinetic methods. Novosibirsk: SibAK. 2014. 240 p. (in Russian).
5. **Mirela K., Ante L., Zaklina S., Mihaela S., Anita P.** Evaluation of Antioxidant Interactions of Combined Model Systems of Phenolics in the Presence of Sugars. *Nat. Prod. Commun.* 2016. V. 11. N 10. P. 1445-1448. DOI: 10.1177/1934578X1601101008.
6. **Pereira R.B., Sousa C., Costa A., Andrade P.B., Valentão P.** Glutathione and the Antioxidant Potential of Binary Mixtures with Flavonoids: Synergisms and Antagonisms. *Molecules*. 2013. V. 8. N 18. P.8858-8872. DOI: 10.3390/molecules18088858.
7. **Doert M., Jaworska K., Moersel J.-Th., Kroh L.W.** Synergistic effect of lecithins for tocopherols: lecithin-based regeneration of α -tocopherol. *Eur. Food. Res. Technol.* 2012. V. 5. N 235. P. 915-928. DOI: 10.1007/s00217-012-1815-7.
8. **Filipović M., Marković Z., Dorović J., Marković J., Lučić B., Amić D.** QSAR of the free radical scavenging potency of selected hydroxybenzoic acids and simple phenolics. *Comptes Rendus Chimie*. 2015. V. 18. N 5. P. 492-498. DOI: 10.1016/j.crci.2014.09.001.
9. **Khanam U., Oba S., Yanase E., Murakami Y.** Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables. *J. Funct. Foods*. 2012. V. 4. P. 979-987. DOI: 10.1016/j.jff.2012.07.006.
10. **Kedare S.B., Singh R.P.** Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol.* 2011. V. 48. N 4. P. 412-422. DOI: 10.1007/s13197-011-0251-1.
11. **Marinova G., Batchvarov V.** Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. *Bulg. J. Agric. Sci.* 2011. V. 17. N 1. P. 11-24.
12. GOST 4919.2–2016 Reagents and highly pure substances. Methods for preparing buffer solutions. M.: Standartinform. 2016. 13 p. (in Russian).
13. **Denisov Ye.T.** Kinetics of homogeneous chemical reactions. M.: Vyssh. Shkola. 1978. 367 p. (in Russian).
14. **Belaya N.I., Belyi A.V.** Semi-empirical model for predicting phenol carboxylic acids antiradical activity. *ChemChemTech [Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.]*. 2019. V. 62. N 7. P. 80-84. DOI: 10.6060/ivkkt.20196207.5952.
15. **Belaya N.I., Belyi A.V., Tikhonova G.A., Udalov Ya.S., Andriyenko G.O.** Synergistic effect of binary quercetin–monosaccharide mixtures in the reaction with free radicals. *ChemChemTech [Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.]*. 2019. V. 62. N 2. P. 38-42. DOI: 10.6060/ivkkt.20196202.5822.

16. Pogodaeva N.N., Medvedeva S.A., Sukhov B.G., Larina L.I. Spectroscopic study of the reaction of a natural arabinogalactan polysaccharide with 3-hydroxyflavones in aqueous solutions. *Chem. Nat. Comp.* 2012. V. 48. N 5. P. 723-727. DOI: 10.1007/s10600-012-0368-0.
17. Белая Н.И., Белый А.В., Тихонова Г.А., Удалов Я.С. Активность межмолекулярных водородных комплексов кверцетина с глюкозой в реакциях с пероксирадикалами хлопкового масла. *Химия раст. сырья*. 2020. № 3. С. 57-65. DOI: 10.14258/jcprm.2020036631.
18. Samuilov A.Ya., Samuilov Ya.D. The role of hydrogen bonds in the mechanisms of organic reactions. *Butlerov Commun.* 2011. V. 28. N 19. P. 1-15.
19. Дероум Э. Современные методы ЯМР для химических исследований. М.: Мир. 1992. 403 с.
20. Belaya N., Belyj A., Zarechnaya O., Shcherbakov I., Mikhailchuk V., Doroshkevich V. The effect of the medium polarity on the mechanism of the reaction of hydroxybenzenes with hydrazyl radical in aprotic solvents. *Russ. J. Gen. Chem.* 2017. V. 87. N 4. P. 690-697. DOI: 10.1134/S1070363217040053.
21. Milenković D., Yorović J., Jeremić S., Marković J.M.D., Avdović E.H., Marković Z. Free Radical Scavenging Potency of Dihydroxybenzoic Acids. *J. Chem.* 2017. V. 2017. P. 1-9. DOI: 10.1155/2017/5936239.
22. Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Scalmani G., Barone V., Mennucci B., Petersson G.A., Nakatsuji H., Caricato M., X.Li, Hratchian H.P., Izmaylov A.F., Bloino J., Zheng G., Sonnenberg J.L., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Vreven T., Montgomery J.A., Jr., Peralta J.E., Ogliaro F., Bearpark M., Heyd J.J., Brothers E., Kudin K.N., Staroverov V.N., Keith T., Kobayashi R., Normand J., Raghavachari K., Rendell A., Burant J.C., Iyengar S.S., Tomasi J., Cossi M., Rega N., Millam J.M., Klene M., Knox J.E., Cross J.B., Bakken V., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R.E., Yazyev O., Austin A.J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J.W., Martin R.L., Morokuma K., Zakrzewski V.G., Voth G.A., Salvador P., Dannenberg J.J., Dapprich S., Daniels A.D., Farkas O., Foresman J.B., Ortiz J.V., Cioslowski J., Fox D.J. Gaussian 09. Revision B.01 Gaussian, Inc. Wallingford CT, 2010.
23. Tomasi J., Mennucci B., Cammi R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.* 2005. V. 105. N 8. P. 2999-3093. DOI: 10.1021/cr9904009.
16. Pogodaeva N.N., Medvedeva S.A., Sukhov B.G., Larina L.I. Spectroscopic study of the reaction of a natural arabinogalactan polysaccharide with 3-hydroxyflavones in aqueous solutions. *Chem. Nat. Comp.* 2012. V. 48. N 5. P. 723-727. DOI: 10.1007/s10600-012-0368-0.
17. Belaya N.I., Belyj A.V., Tikhonova G.A., Udalov Ya.S. The activity of intermolecular hydrogen complexes of quercetin with glucose in reactions with cotton oil peroxy radicals. *Khim. Rast. Syr'ya*. 2020. N 3. P. 57-65 (in Russian). DOI: 10.14258/jcprm.2020036631.
18. Samuilov A.Ya., Samuilov Ya.D. The role of hydrogen bonds in the mechanisms of organic reactions. *Butlerov Commun.* 2011. V. 28. N 19. P. 1-15.
19. Derome E. Modern NMR methods for chemical research. M.: Mir. 1992. 403 p. (in Russian)
20. Belaya N., Belyj A., Zarechnaya O., Shcherbakov I., Mikhailchuk V., Doroshkevich V. The effect of the medium polarity on the mechanism of the reaction of hydroxybenzenes with hydrazyl radical in aprotic solvents. *Russ. J. Gen. Chem.* 2017. V. 87. N 4. P. 690-697. DOI: 10.1134/S1070363217040053.
21. Milenković D., Yorović J., Jeremić S., Marković J.M.D., Avdović E.H., Marković Z. Free Radical Scavenging Potency of Dihydroxybenzoic Acids. *J. Chem.* 2017. V. 2017. P. 1-9. DOI: 10.1155/2017/5936239.
22. Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Scalmani G., Barone V., Mennucci B., Petersson G.A., Nakatsuji H., Caricato M., X.Li, Hratchian H.P., Izmaylov A.F., Bloino J., Zheng G., Sonnenberg J.L., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Vreven T., Montgomery J.A., Jr., Peralta J.E., Ogliaro F., Bearpark M., Heyd J.J., Brothers E., Kudin K.N., Staroverov V.N., Keith T., Kobayashi R., Normand J., Raghavachari K., Rendell A., Burant J.C., Iyengar S.S., Tomasi J., Cossi M., Rega N., Millam J.M., Klene M., Knox J.E., Cross J.B., Bakken V., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R.E., Yazyev O., Austin A.J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J.W., Martin R.L., Morokuma K., Zakrzewski V.G., Voth G.A., Salvador P., Dannenberg J.J., Dapprich S., Daniels A.D., Farkas O., Foresman J.B., Ortiz J.V., Cioslowski J., Fox D.J. Gaussian 09. Revision B.01 Gaussian, Inc. Wallingford CT, 2010.
23. Tomasi J., Mennucci B., Cammi R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.* 2005. V. 105. N 8. P. 2999-3093. DOI: 10.1021/cr9904009.

Поступила в редакцию 12.12.2022

Принята к опубликованию 25.01.2023

Received 12.12.2022

Accepted 25.01.2023