



УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“–ШТИП

ЗЕМЈОДЕЛСКИ ФАКУЛТЕТ

Катедра за преработка и контрола на земјоделски производи

Штип

Елеонора Арсевска

**АНТИОКСИДАТИВНИ И МЕТАЛОКОМПЛЕКСИРАЧКИ СВОЈСТВА НА НЕКОИ
ПРИРОДНИ ХИДРОКСИ БЕНЗОКИНОНСКИ СОЕДИНЕНИЈА**

МАГИСТЕРСКИ ТРУД

Штип, 2013 година

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

Комисија за оценка и одбрана

Ментор: Проф.др. Рубин Гулабоски

Земјоделски факултет, УГД - Штип

Член Проф.др. Лилјана Колева - Гудева

Земјоделски факултет, УГД - Штип

Член Проф.др. Виолета Иванова Петропулос

Земјоделски факултет, УГД - Штип

Научно поле: Биотехнички науки

Научна област: Прехрамбена технологија

Датум на одбрана: 24.09.2013

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

**АНТИОКСИДАТИВНИ И МЕТАЛОКОМПЛЕКСИРАЧКИ СВОЈСТВА НА НЕКОИ
ПРИРОДНИ ХИДРОКСИ БЕНЗОКИНОНСКИ СОЕДИНЕНИЈА**

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

Апстракт

Киноните и хидрокиноните се едни од најзастапените органски соединенија распространети во голем број растенија, а учествуваат и во важни физиолошки процеси во сите живи организми. Полифенолите, флавононите, антоцијаните и дериватите на коензим Q се соединенија што спаѓаат во групата на кинонски соединенија. Поради нивната заштитна улога кај луѓето, голем број на кинони се употребуваат како медикаменти. Хидрокиноните (т.е. редуцираните форми на киноните) се едни од најупотребуваните антиоксиданти и нивната примена во медицината главно се базира на специфичните својства што тие ги покажуваат кон разни патогени бактерии.

Во рамките на оваа магистерска работа испитувани се електрохемиските, комплексобразувачките и антиоксидантните својства на три природни хидрокси-кинонски деривати и тоа 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy-p-benzoquinone, 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone и Embelin. Беше покажано дека сите испитувани соединенија имаат способност силно да комплексираат јони на земноалкални метали. Покрај тоа, во серија експерименти со радикални честички беше покажано дека сите испитувани хидрокси бензокинони поседуваат умерено силни антиоксидативни својства што се споредливи со антиоксидативните способности на витамин C.

Како работни методи во оваа магистерска работа беа употребени електрохемиските техники, циклична и квадратно-бранова волтаметрија. Целта на магистерската работа е да се покаже какви се оксидативно-редукционите својства на овие соединенија и можноста за нивна потенцијална примена како антиоксидантни адитиви во храна од растително или животинско потекло.

Клучни зборови

Антиоксиданти, 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy-p-benzoquinone, Ембелин, 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone, цикличната волтаметрија, квадратно-бранова волтаметрија, редукција.

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

ANTIOXIDANT AND METAL-BINDING PROPERTIES OF SOME NATURAL
HYDROXYBENZOQUINONE COMPOUNDS

Abstract

Quinones and hydroquinones are probably the largest class of organic compounds present in various plants, playing important roles in various physiological processes. The polyphenols, such as flavones and flavonoids, anthocyanins and the Coenzyme Q derivatives belong to the family of quinones. Because of their protecting function in the living systems, many quinones are currently used as medicaments. Hydroquinones (i.e. the reduced forms of quinones) are probably one of the most explored antioxidants, and their use in the medicine is mainly due to their specific functions showing on various pathogenic bacteria.

In the frame of this thesis we investigated the electrochemical, liganding and antioxidative properties of three natural hydroxyl-quinone derivatives i.e. 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy-p-benzoquinone, 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone and Embelin. It was shown that all these quinones have a potential to complex earth-alkaline cations quite strongly. In a series of free-radical experiments, it was shown that the investigated compounds have a potential to act as radical scavengers (antioxidants). Their antioxidative potentials were similar to that of Vitamin C.

In this master thesis two electrochemical techniques, were used i.e. the cyclic and square-wave voltammetry. The main goal of the study was to find out whether the studied compounds are potentially applicable as additives (antioxidants) in food from plant or animal origin.

Keywords

Antioxidants, 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy-p-benzoquinone, Embelin, 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone, cyclic voltammetry, square-wave voltammetry, reduction.

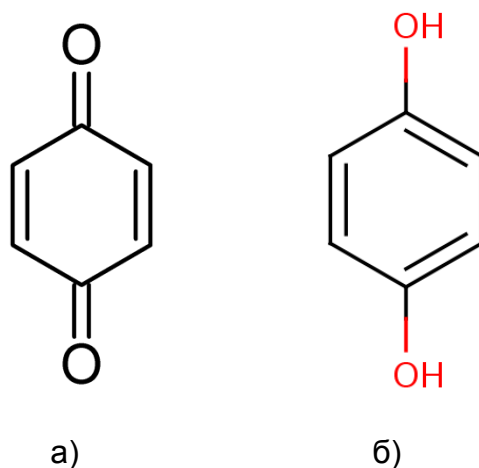
СОДРЖИНА

1. ВОВЕД	7
2. АНТИОКСИДАнти – ОСНОВНИ ДЕФИНИЦИИ И СВОЈСТВА	12
2.1 Својства на антиоксидантите и нивна апликација во храната	13
2.2 Механизам на дејство на антиоксидантите	15
2.3 Класификација на антиоксиданти	18
2.4 Синтетички антиоксиданти	20
2.5 Природни антиоксиданти	23
2.6 Полифенолни антиоксиданти	28
2.7 Коензим Q10 (Coenzyme Q10 или CoQ10)	30
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД НА РАБОТА	33
3.1 Реагенси	33
3.2 Аналитички техники	33
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	35
4.1 Електрохемиски и металокомплексирачки својства на соединението 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone	35
4.2 Електрохемиски и металокомплексирачки својства на соединението 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone	50
4.3 Електрохемиски и металокомплексирачки својства на соединението Ембелин (2,5-dihydroxy-3-undecyl-p-benzoquinone)	59
4.4 Антиоксидативни својства на соединенијата 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy-p-benzoquinone, 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone и Ембелин	68
5. ЗАКЛУЧОК	79
6. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА	81

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

1. ВОВЕД

Киноните и хидрокиноните се широко распространета класа на органски соединенија што се наоѓаат во голем број растенија, а учествуваат и во важни физиолошки процеси во сите живи организми (Morton, 1965). Природните кинони се главни компоненти што ја даваат бојата на голем број растенија (Thomson, 1986), па оттука голем бил интересот за нивното изучување многу одамна. Во денешно време, голем број на кинонски деривати се употребуваат како медикаменти (Morton, 1965), што имаат голем број заштитни функции кај луѓето. Покрај тоа, хидрокиноните (хидрокиноните се редуцирани форми на киноните) се едни од најупотребуваните антиоксиданти и нивната примена во медицината главно се базира на специфичните својства што тие ги покажуваат кон разни патогени бактерии. Сите кинони се сметаат за деривати на соединението бензокинон, а хидрокиноните се деривати на хидрокинононот (слика 1).



Слика 1. Шема на структурни формули на бензокинон (а) и хидрокинон (б)

Figure 1. Scheme of structural formulas of benzoquinone (a) and hydroquinone (b)

Во групата на кинонски/хидрокинонски соединенија може да се класифицираат различни физиолошки активни супстанции како што се:

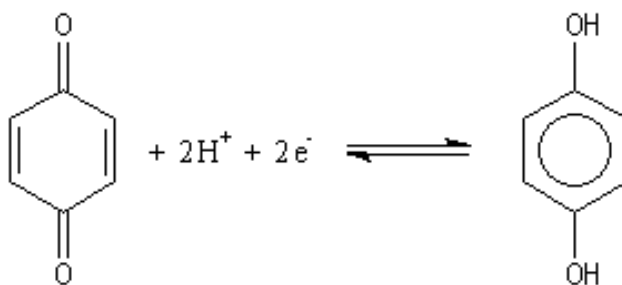
Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

антоцијаните, флавонолите, флавон-3-олите, дериватите на коензим Q и многу други соединенија со слична структура (Lester, Crane, 1958). Интересот за овие соединенија е сè поизразен во последно време поради нивната релативно голема застапеност во природните продукти како што се: грозјето, капините, малините, доматиите, морковите и сл. Показано е дека конзумирањето овошје и зеленчук што содржи високи содржини на полифеноли или хидрокинонски деривати доведува до значително подобрување на голем број физиолошки функции во живите организми (Thomson, 1986). Овие соединенија наоѓаат сè почеста примена во фармацијата, медицината и прехранбената индустрија. Освен во растенијата, кинонските системи се пронајдени и во голем број бактерии и во вишите живи организми, каде што се неопходни соединенија за креирањето на целуларната енергија (Crane, 2001). Витаминот E, соединенијата од фамилијата на Коензим Q, пластокинонот, нафтокиноните, антракиноните и голем број на полифеноли (флавоноиди, стилбени, антоцијани) се само мал број важни соединенија што припаѓаат во групата на кинони. Се знае дека Коензим Q и пластокинонот играат важна улога во биохемиските процеси како оксидативната фосфорилација и митохондријалниот електронски трансфер. Овие процеси се круцијални за синтеза на аденозин трифосфат (АТФ), што е главно енергетско соединение кај сите живи организми. Коензим Q и пластокинонот се есенцијални медијатори во процесите на пренос на електрони. Додека Коензим Q главно има функција на медијатор на електрони во митохондријалниот електронски трансфер кај животните и луѓето, пластокинонот се јавува како медијатор на електрони во процесите на фотосинтеза кај растенијата.

Како што рековме, соединението бензокинон (1,4-benzoquinone или *para*-benzoquinone, види слика 1) се смета за основа на сите кинонски деривати. И покрај тоа што сите кинони имаат еквивалентна базична структура, што е активен дел на нивните молекули, сите кинонски деривати покажуваат различни својства. Тоа зависи, пред сè од природата на супституентите на бензокинонскиот прстен.

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

Голем број на кинонски деривати се употребуваат како антибиотици, антитуморни препарати, антикоагуланти и сл., (Powis, 1989; Lown, 1983; James, Smith, Murphy, 2004; Bentinger, Brismar, Dallner, 2007), но постојат и такви што се токсични и штетни по здравјето на луѓето (Thomson, 1986). Најголем дел од функциите на киноните произлегуваат од нивната редукциско-оксидациска (редокс) активност, односно на нивната способност да примаат електрони и H^+ јони и да се трансформираат во хидрокинони (Rich, 1981), (слика 2). Таканаречената диен-диолска структура кај киноните е погодна платформа за размена на електрони и протони со различни видови на супстрати што можат да реагираат со киноните.



Слика 2. Шема за редукција на кинон до хидрокинон.
Процесот е хемиски реверзибилен и е проследен со размена на 2
електрони и 2 H^+ јони

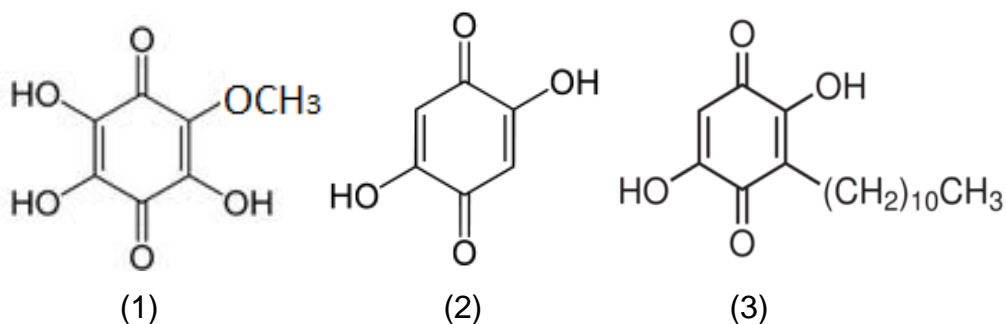
Figure 2. Scheme of reduction process of quinone to hydroquinone.
The process is chemically reversible and is followed by exchange of 2 electrons
and 2 H^+ ions

Иако редокс-хемијата на киноните/хидрокиноните е предмет на студија од многу одамна, сè уште постојат несогласувања во научната јавност околу механизмот на нивна меѓусебна трансформација. Редокс-хемијата на овие соединенија зависи, пред сè од природата на субституентите на бензенскиот прстен, како и од средината (медиумот, т.е. растворувачот) во која се врши електрохемиската трансформација. Дури и во водни раствори, не постои генерален механизам со кој може да се претстави редукција/оксидација на

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

киноните/хидрокиноните. Притоа, треба да се нагласи дека постојат големи разлики во редокс-хемијата на киноните доколку нивната електрохемиска трансформација се студира во медиум што е пуфериран или што не е пуфериран. Сепак, најголем дел од специфичните својства на киноните/хидрокиноните зависат од супституентите што се наоѓаат во позиција 2, 3, 5 и 6 во бензенскиот прстен. Така на пример, присуството на хидроксилни (ОН) групи (една или повеќе) доведува до посилни антиоксидативни својства на таквите хидрокси бензокинонски деривати. Покрај тоа, кај ваквите деривати постои потенцијал да делуваат како хелатори (комплексообразувачи) за некои метални катјони (Bogeski, Gulaboski, Kappl, Mirceski, Stefova et al., 2011).

Во оваа магистерска работа се претставени електрохемиските, комплексообразувачките и антиоксидативните својства на некои природни хидрокси деривати на бензокинонот. Првото соединение е 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone, и тоа е поли-хидроксиден дериват синтетизиран од природниот 2,6-dimethoxy benzoquinone; второто соединение е 2,5-dihydroxy benzoquinone; додека третото соединение е Ембелин (2,5-dihydroxy-3-undecyl p-benzoquinone), (слика 3).



Слика 3. Структури на соединенијата студирани во оваа магистерска работа (1) 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone, (2) 2,5-dihydroxy benzoquinone и на (3) Ембелин

Figure 3. Structures of the compounds studied in this master thesis (1) 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy-p-benzoquinone, (2) 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone and (3) Embelin

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

Соединението 2,6-dimethoxy benzoquinone е присутно во голем број на растенија (пченката, пченицата), додека хидрокси дериватите на ова соединение, како и соединенијата 2,5-dihydroxy benzoquinone и Ембелин се присутни во растението *Embelia ribers* (слика 4).



Слика 4. Растението *Embelia ribers*

Figure 4. Plant *Embelia ribers*

Сите соединенија разработени во оваа магистерска работа се јавуваат како прекурсори во синтезата на Коензим Q соединенијата (Turner, 2004). Треба да се нагласи дека соединението Ембелин привлекува посебно внимание во последно време поради неговите силни антиоксидативни и антибактериски својства. Хемиската структура на Ембелинот е многу слична на структурата на природниот Коензим Q10 (Ubiquinone 50). Според тоа, својствата на ова соединение се очекува да бидат многу слични со својствата на Коензим Q10. Електрохемиските својства на сите испитувани соединенија во оваа магистерска работа не се познати во литература.

Испитувањето на електрохемиските, антиоксидативните и металокомплексирачките својства на соединенијата што се предмет на

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

истражување во оваа магистерска работа е од посебна важност за прехранбената индустрија, бидејќи голем дел од овие соединенија имаат потенцијал да бидат употребени како стабилизатори или како антиоксиданти во готовите преработки од животинско или растително потекло. Од друга страна, комплексирањето на јоните од земноалкалните елементи (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+}) е од голема важност поради големиот број на физиолошки функции на овие јони поврзани пред сè со функционирањето на голем број витамини, ензими и на пренесувањето на редокс-сигналите во клетките. Поради тоа, во последно време посебно внимание во храната се посветува на присуството на овие јони, со соодветни концентрации во храната.

2. АНТИОКСИДАНТИ – ОСНОВНИ ДЕФИНИЦИИ И СВОЈСТВА

Антиоксидант е секоја супстанција која, кога ќе се додаде во мали концентрации, во споредба со супстанцијата што се оксидира, значително ја намалува нејзината оксидација. Антиоксидантите може да се дефинираат и како молекули што ја спречуваат оксидацијата на други молекули. Притоа, како супстрат подложен на оксидација може да биде секоја молекула од храната или биолошки материјал како што се јаглехидратите, протеините, липидите, РНК и ДНК (Powis, 1989).

Оксидацијата претставува реакција при кој една супстанција оддава електрони на друга супстанција, што ги прима тие електрони. Притоа, супстанцијата што ги оддава електроните се нарекува редуциско средство, додека супстанцијата што ги прима електроните се нарекува оксидациско средство. Во процесите на оксидација и редукација, многу често се создаваат и т.н. слободни радикали. Радикалите се високореактивни нестабилни соединенија со мала молекулска маса што имаат еден или повеќе неспарени електрони. Неспарените електрони кај радикалите имаат висок потенцијал да бидат разменети со други супстрати. Тоа е главната причина што радикалите се силно реактивни

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

соединенија. Радикалите лесно стапуваат во реакција со други молекули и предизвикуваат оштетувања на клеточните структури кај живите системи. Тие се создават при нормални метаболитски процеси, при ситуациите на оксидативен стрес, а можат да се внесат во организмот и од надворешната средина. Антиоксидантите се супстанции што ги спречуваат верижните реакции во кои учествуваат радикалите, а со тоа значително ги намалуваат и оштетувањата на клетките.

Во прехранбената индустрија, антиоксидантите главно се користат како прехранбени адитиви, и притоа тие имаат функција да ја зачуваат храната од расипување или промена на бојата и текстурата поради оксидацијата на главните состојки од храната (липидите, јаглехидратите и протеините), (Miller, Rigelhof, Marquart, Prakash, Kanter, 2000).

Во организмот, главни природни антиоксиданти се: глутатион, витамин Ц, витамин Е, ензимите како каталаза, супероксид дисмутази, пероксидази и сл. Ако во организмот дојде до намалување на концентрацијата на антиоксидантите, тогаш може да настане инхибиција на антиоксидативните ензими, при што доаѓа до состојба на т.н. „оксидативен стрес“ и до оштетување на клетките. Целта на антиоксидантните системи не е целосно да ги отстранат реактивните честички и радикалите, туку да ги задржат на оптимално ниво од причини што некои радикали имаат и корисна клеточна функција, на пример во редокс-сигнализацијата (Powis, 1989).

2.1 Својства на антиоксидантите и нивна апликација во храната

Антиоксидантите се супстанции присутни во храната, но истите може дополнително да се додадат на производите во процесот на обработка на храната. Вкупната концентрација на дозволени антиоксиданти не смее да биде поголема од 200 ppm по маса врз основа на содржината на масти во храната. Според тоа, за да се знае колкаво е потребното количество на антиоксиданти што

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

треба да ги содржи храната, потребно е да се знаат податоци и за вкупната содржина на липиди во производите.

Различни антиоксиданти покажуваат различна ефикасност во различна храна што се должи на нивната молекуларна структура. Општо гледано, антиоксидантите што се употребуваат за спречување на оксидацијата во прехранбените производи треба да ги поседуваат следните својства:

- да се термички стабилни супстанции;
- да не предизвикуваат непријатен мирис, вкус или боја;
- да бидат ефикасни при ниски концентрации (0,001- 0,02%);
- да немаат штетни физиолошки ефекти;
- да се амфибилни супстанции, т.е. да се растворливи во масти, а делумно и во вода;
- да се лесно достапни;
- да се ефтини и
- да не се апсорбираат и складираат од страна на телото.

Апликација на антиоксидантите во храна од растително или животинско потекло може да се изведе на следните начини:

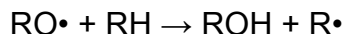
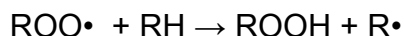
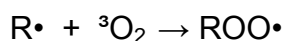
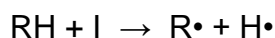
- со додавање на антиоксиданти во храна откако ќе бидат растворени во масло;
- со директно додавање на антиоксидантите во масло или стопена маст;
- распрскување на растворениот антиоксидант во храната;

Понекогаш антиоксидантите влегуваат во синергизам со цел да се подобри ефектот на нивното дејство. *Синергизам* е процес на соработка на антиоксидантите со други соединенија присутни во системите, со цел да се предизвика зголемена активност од збирот на активностите на поединечните компоненти.

2.2 Механизам на дејство на антиоксидантите

Многу често, во храната од растително и животинско потекло се случуваат процеси на оксидација на голем број компоненти во присуство на молекуларен кислород. Притоа, како резултат на делумната редукција на кислородот, може да се формираат т.н. „слободни радикални честички“. Овие слободни радикали најчесто се мали молекули што имаат висок потенцијал за реакција со мастите, маслата и со протеините од храната. Притоа, доколку се случат, таквите реакции ќе доведат до распаѓање на енергетските материји од храната, при што се нарушуваат текстурата, физичките и хемиските својства, како и органолептичките особини на производите. Процесот на оксидација е сличен кај повеќето незаситени органски материјали од храната, и при тој процес најпрво се случува т.н. иницијација, т.е. процес при кој се создадат слободни радикали во системот (Powis, 1989).

Начинот на одвивање на антиоксидативната активност и оксидацијата на липидите може да се претстави со следната реакциска шема:



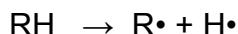
каде што R – алкилна група; H – α метиленски водороден атом; RO \cdot - алкокси радикал; ROO \cdot - пероксиден радикал; I – иницијатор.

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

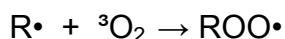
Автооксидацијата е процес на оксидативна деградација (распаѓање) на незаситените масни киселини преку автокаталитичен процес, што се состои од верижан механизам во кој се вклучени слободните радикали.

Верижниот механизам вклучува *иницијација*, *пропагација* и *терминација* на реакции што, кога еднаш се започнати може да се повторуваат (Powis, 1989).

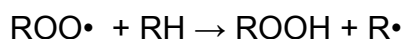
Процесот на иницијација доведува до формирање на слободни радикали во системите. Притоа, α -метиленскиот H-атом е издвоен од молекулите на незаситени липиди за да се формира липиден алкил радикал R•



Липидните радикали се многу реактивни и можат да реагираат со молекулите на атмосферскиот триплетен кислород 3O_2 , при што се создава пероксиден радикал ROO• според реакцијата:



Реакции на пропагација: При реакциите на пропагација, пероксидниот радикал најчесто реагира со друг незаситен липид (RH), при што се формира хидропероксид (ROOH) и се креира нов нестабилен липиден радикал (R•) според реакцијата:

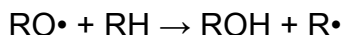


При секој чекор во процесот на пропагација се создава нов слободен радикал, со што се зголемува концентрацијата на изреагиран кислород во системот. Новосоздадените слободни липидни радикали имаат потенцијал да реагираат со кислород, при што се создаваат нови пероксидни радикали што резултира во т.н. авто-катализиран (цикличен) механизам (Powis, 1989).



Хидроксипероксидите се нестабилни и може да создадат дополнителни радикали што ќе ги забрзаат радикалните реакции, како на пример:

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија



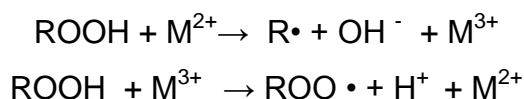
Овие верижни реакции продолжуваат да се случуваат се до моментот кога два слободни радикали се рекомбинираат, при што се формира нерадикален производ и доаѓа до *завршување (терминација) на радикалните реакции* (Powis, 1989).

Автооксидацијата е хемиски процес што се одвива во присуство на кислородот од воздухот, и при овој процес може да дојде до оштетување на молекулите на супстратот (Powis, 1989). Со одвивање на процесите на автооксидација се формираат нови молекули како продукти, што имаат способност да предизвикаат промени на физичките и на хемиските својства на оксидирачкиот супстрат. Распаѓањето на хидроксипероксидите најчесто доведува до креирање на нови молекули во системите, што имаат непријатен мирис и вкус. Оваа појава е тесно поврзана со оксидацијата на незаситените липиди (Powis, 1989). Притоа, треба да се нагласи дека липидите што содржат двојни врски се најчесто подложни на автооксидација, помогната од присуството на некој метален катализатор. Бидејќи незаситените липиди не можат директно да бидат оксидирани со триплетниот кислород присутен во воздухот (3O_2), за да се одвива реакцијата на автооксидација потребно е да постојат т.н. „активатори“ во системот, што ќе овозможат да дојде до реакција помеѓу липидите и кислородот, при што ќе се формираат радикални честички. Кислородот може да се активира во присуство на некои метали или метални комплекси. Во ваква ситуација, можно е да се иницира оксидација на липидите при што ќе се создадат слободни радикали. Изложеноста на липидите од храната на светлина, присуството на метали во храната или присуството на молекуларен кислород се услови при кои може да се создадат примарни пероксидни радикали.

Металите што имаат променлива валентност (поливалентните метали, пример M^{3+} , M^{2+} ...) многу често го катализираат разградувањето на

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

хидроксипероксидите и притоа предизвикаат пропација на радикалните реакции (Powis, 1989):



Храната е медиум во кој често се случува и директна фотооксидација што е иницирана од слободните радикални честички што се креирани од ултравиолетовото зрачење. Ултравиолетовото зрачење има способност да „синтетизира“ радикали што можат да ги катализираат процесите на деградација на хидропероксидите и пероксидите (Powis, 1989).

2.3 Класификација на антиоксиданти

Антиоксидантите можат да се класифицираат на неколку начини и тоа: врз основа на нивната растворливост, врз основа на природата и начинот на нивно дејствување, спрема потеклото, врз основа на структурата и кинетиката и сл., (Powis, 1989).

Според нивната растворливост, антиоксидантите се делат на:

- антиоксиданти растворливи во вода (хидрофилни антиоксиданси)
 - антиоксиданти растворливи во масти и масла (хидрофобни антиоксиданси)
- (Powis, 1989).

Во групата на антиоксиданти растворливи во вода се класифицираат: аскорбинска киселина (витамин Ц), глутатион, липоинска киселина, уринска киселина и сл.

Главни претставници од групата на антиоксиданти растворливи во липиди (липофилни антиоксиданти) се: каротеноидите (β каротен и ретинолот т.е. витамин А), α токоферолот (витамин Е), убикуинолот(коензим Q) и сл.

Според *начинот на дејствување* антиоксидантите се делат на примарни, секундарни и терцијарни антиоксиданти.

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

Примарните антиоксиданти имаат својства да го инхибираат создавањето на нови слободни радикали уште во почетната фаза од радикалните реакции.

Секундарните антиоксиданси имаат способност да ги „ловат“ слободните радикали и на тој начин ја инхибираат иницијацијата и пропацијатана реакциите на оксидација.

Терцијарните антиоксиданти се супстанции што можат да ги обновуваат и отстрануваат оштетените биомолекули што се создале во услови при радикалните реакции во услови на оксидативен стрес.

Според природата и начинот на дејствување, антиоксидантите може да се поделат на *ензимски* и *неензимски* антиоксиданти.

Во групата на ензимски антиоксиданти се класифицираат ензимите глутатион пероксидаза, глутатион редуктаза, каталаза, SOD (супероксид дисмутаза), ензимот глутатион S–трансфераза и сл. Овие антиоксиданти се примарни (превентивни) и тие можат целосно да го инхибираат ендегеното создавање на слободните радикали.

Неензимските антиоксиданти (секундарни антиоксиданти) најчесто се вклучени во системите во услови кога постои зголемена продукција на слободни радикали. Во неензимски антиоксиданти може да се класифицираат аскорбинската киселина (витамин Ц), токоферолот (витамин Е), голем број наполиамини, флавоноидите и многу други фенолни соединенија од растително потекло, потоа коензим Q, билирубинот, креатининот, како и некои соединенија што содржат тиолни групи (метионин, глутатион, цистеинлипоинска киселина).

Терцијарни или репарациони антиоксиданти се високомолекуларни протеински соединенија што учествуваат во регенерацијата на оштетените органски молекули при процесите на оксидативен стрес (пред се, липидите, протеините, јагленхидратите и нуклеинските киселини). Ензимите што имаат потенцијал да ги обноват или отстранат оксидираните супстрати од системите се

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

т.н. ендонуклеази и егзонуклеази ензими од типот на DNK-полимерази и DNK-лигази, метионин сулфоксид редуктаза и сл.

Спрема *потеклото* антиоксидантите се делат на *синтетички* и *природни*.

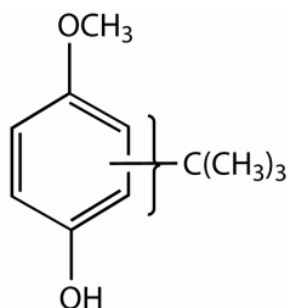
2.4 Синтетички антиоксиданти

Од синтетичките соединенија, најважни се четири антиоксиданси што интензивно се користат во прехранбената индустрија и тоа: (BHA)-butylatedhydroxyanisole, butylatedhydroxytoluene (BHT), propyl gallate (PG), и tert-butylhydroquinone (TBHQ). Синтетичките антиоксиданти што се користат во прехранбената индустрија се додаваат во производите како адитиви, директно или индиректно преку дифузија од материјалот за пакување.

При изборот на антиоксиданти за апликација во даден прехранбен производ потребно е да се внимава на неколку фактори, како на пример: на термичката стабилност, потенцијалните негативни ефекти по здравјето на конзументите, ниската ефективна концентрација, како и на потенцијалот за синергизам на дадениот антиоксидант со други соединенија, присутни во храната. Дозволените максимални граници за употреба од дадени антиоксиданти се различни во различни земји. Но, потребно е да се нагласи дека секогаш постои дадено „максимално дозволено количествона антиоксиданти“ и овој параметар најчесто не се разликува во голема мера од една до друга држава.

BHA (Butylated Hydroxyanisole) е еден од најупотребуваните антиоксиданти во прехранбената индустрија. Според структурата, BHA претставува ароматично фенолно соединение. Овој синтетички антиоксидант е добро растворлив во масти и масла, и е термички стабилен при високи температури. BHA најчесто се употребува како антиоксидант за намалување на оксидативните процеси во растителните масла и маслата за пржење, какои во голем број на козметички препарати.

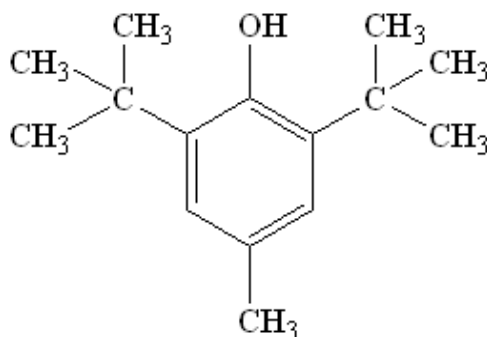
Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија



Слика 5. Структура на ВНА (Butylated Hydroxyanisole)

Figure 5. Structure of BHA (Butylated Hydroxyanisole)

ВНТ (Butylated Hydroxytoluene) е синтетички антиоксидант (фенолно соединение) што е аналог на витаминот Е. Овој антиоксидант има потенцијал за ловење на голем број кислородни радикали, а учествува и во терминацијата на голем број оксидациони процеси.



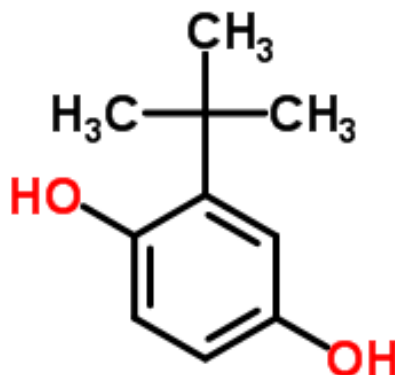
Слика 6. Структура на ВНТ (Butylated Hydroxytoluene)

Figure 6. Structure of BHT (Butylated Hydroxytoluene)

Треба да се потенцира дека ВНТ е нестабилен на повисоки температури. Ова својство го прави ВНТ да се аплицира во производи што најчесто се чуваат на умерена температура. ВНТ се користи како антиоксидант при намалување на оксидативните процеси во растително и животинско масло, во гумите за цвакање, како и во различни видови на храна за животни (Wanasundara, Shahidi, 2005).

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

ТВНQ (tert-Butylhydroquinone) е дифенолен антиоксидант (содржи две ОН групи во бензенското јадро). ТВНQ е поефективен антиоксидант во растителни масла отколку антиоксидантите ВНА и ВНТ. ТВНQ е термички стабилен и истиот е високоефикасен во спречување на оксидациските процеси што се јавуваат при пржење со масла. ТВНQ има поголем антиоксидативен потенцијал кај супстратите што имаат поголем степен на незаситеност (повеќе двојни врски во структурата), што овозможува да се аплицира како антиоксидант во различни видови на растителни масла. ТВНQ може да се аплицира и во маргарин, во храна што е пржена, во рибино масло, како и во различни видови на етерични масла.



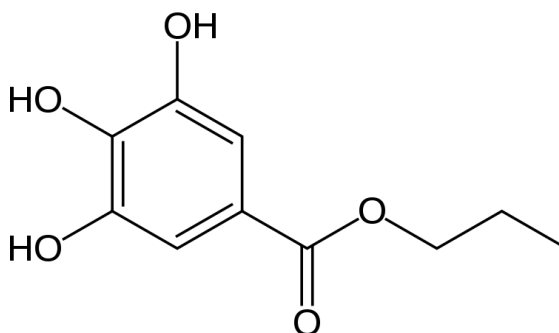
Слика 7. Структура на ТВНQ(tert-Butylhydroquinone)

Figure 7. Structure of TBHQ(tert-Butylhydroquinone)

Пропил галат (PG) е антиоксидант што може да се синтетизира при реакција на естерификација на пропанол со гална киселина. Пропил галатот покажува многу добра антиоксидативна активност кога е аплициран во разни видови на храна од растително потекло и во растителни масла. Многу често се аплицира во комбинација со аскорбил палмитат (дерибат на витамин С и палмитинската киселина). Пропил галатот е помалку растворлив во масла во споредба со ВНА и ВНТ. PG комерцијално доаѓа во форма на бел кристален прав

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

што е умерено малку растворлив во вода и во липиди (Wanasundara, Shahidi, 2005).



Слика 8. Структура на пропил галат
Figure 8. Structure of propyl gallate

2.5. Природни антиоксиданти

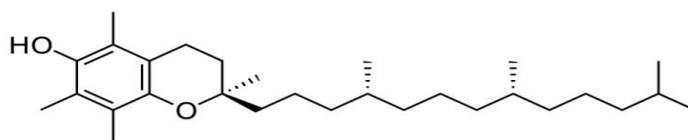
Во прехранбената индустрија, употребата на природни антиоксиданти денес е значително зголемена во однос на синтетичките антиоксиданти. Покрај достапноста и економичноста за нивна апликација, друг фактор за нивна поголема употреба се и намалениот број на штетни споредни ефекти во однос на синтетичките антиоксиданти. Сепак, треба да се нагласи дека природните антиоксиданти имаат и некои недостатоци како што се:

- умерена антиоксидативна ефикасност;
- можна деградација за време на обработката;
- изразена термичка лабилност;
- некои имаат непријатен вкус и мирис;

Токоферолот (витамин Е) и аскорбинска киселина (витамин Ц) се најважните природни антиоксиданти што се употребуваат во прехранбената индустрија. Покрај тоа, постојат и голем број на природни фенолни антиоксиданти што може да се користат во различни апликации на храна (Wanasundara, Shahidi, 2005).

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

Витамин Е (α токоферол) е природен липофилен антиоксидант што е широко распространет во природата. Во големи количини го има во млекото, рибиното месо, во маслото за јадење и сл. Витаминот Е е есенцијален антиоксидант што се внесува преку исхраната бидејќи човекот не може сам да го синтетизира. Витаминот Е е ефикасен липофилен антиоксиданс, и неговото присуство ги стабилизира биолошките мембрани. Антиоксидативните својства на витаминот Е се во функција на превенција и смалување на компликациите кај голем број на болести. Антиоксидативната активност на овој витамин силно зависи од температурата. Показува добри антиоксидативни активности при собна температура, додека при повисоки температури можна е негова деградација (Wanasundara, Shahidi, 2005).



Слика 9. Структура на Витамин Е (α-токоферол)
Figure 9. Structure of Vitamin E (α-Tocopherol)

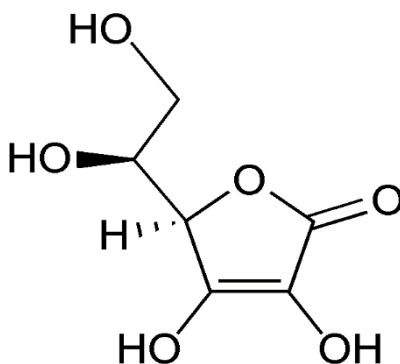
Токоферолите се липофилни соединенија и тие најчесто делуваат во синергизам со други витамини како аскорбинска киселина, лимонската киселина или пак со фосфолипидите. Бидејќи се природни антиоксиданти, токоферолите се безбедни додатоци во храната. Максималната дозволена количина на токоферолите во храната не смее да биде поголема од 500 ppm. Во поголеми концентрации, токоферолите може интензивно да се апсорбираат на ѕидовите од крвните садови, при што може да настане нивно запушување.

L-аскорбинска киселина (витамин Ц) е најефикасен природен антиоксидант од групата на витамини растворливи во вода. Витаминот Ц е есенцијален антиоксидант што се наоѓа во растителни ткива или се синтетизира кај

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

растенијата, додека организмот на човекот не може да го синтетизира. Витаминот Ц има способност лесно да се редуцира. Притоа, неговата антиоксидативна активност се базира на неговата способност да неутрализира голем број супстанции од процесите, при кои се формираат слободните радикали. Аскорбинската киселина се користи за стабилизација во голем број пијалоци и прехранбени продукти, добиени со преработка на овошје и зеленчук. Поради неговата термичка лабилност и поради малата растворливост во масти и масла, витаминот Ц има ограничена употреба во липофилни системи и во производи од анимално потекло.

Присутен во храната, витаминот Ц најчесто своите антиоксидативни способности ги употребува во синергизам со други антиоксидантни соединенија како што се α токоферол, лимонската киселина и сл.



Слика 10. Структура на аскорбинска киселина (Витамин Ц)

Figure 10. Structure of ascorbic acid (Vitamin C)

Природната аскорбинска киселина може лесно да се уништи за времена обработката на храната. Витаминот Ц е термички лабилно соединение и е хемиски реактивен. Антиоксидативни својства на витаминот Ц зависат од температурата, светлината, рН, присуството на кислород и сл. Витаминот Ц може да се употребува во граници од 600 до 2000 mg/ден (Wanasundara, Shahidi, 2005).

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

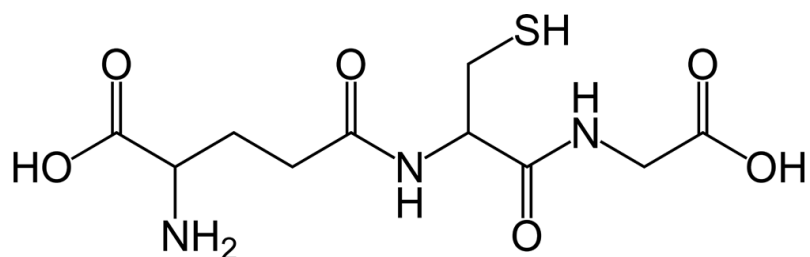
Каротеноидите се липофилни органски молекули што ги даваат жолтите, портокаловите и црвените пигменти на овошјето и зеленчукот. Каротеноидите по хемиски состав се јаглеродни изопреноиди со 40-С атоми. Каротеноидите имаат различни структури во зависност од разгранетоста на нивниот ланец, а она што е карактеристично за нив е присуството на конјугирани двојни врски во нивната структура. Каротеноидите може да се класифицираат како каротини и ксантофили. Некои од каротеноидите се познати како про-витамини на витаминот А, како што се β -каротен и α -каротен (Wanasundara, Shahidi, 2005).

Каротеноидите функционираат како секундарни антиоксиданти во храната, при што имаат способност значително да го редуцираат кислородот. Покрај тоа, каротеноидите може да ја спречат оксидацијата на храната, при што ги неутрализираат слободните радикали во отсуство на молекуларен кислород. Кога се присутни во храната, каротеноидите најчесто стапуваат во синергетско дејство со витамин Е, лутеин, β -каротен, ликопен и сл.

β -каротенот се користи како антиоксидант во мастите и маслата, во сирењето, во голем број на овошни и во некои млечни производи. Слабо се раствара во вода и алкохол, претставува високо реактивна супстанца што е нестабилна при повисоки температури, а неговата реактивност во голема мера зависи од рН на средината и присуството на кислород. Поради тоа, неговата употреба како антиоксидант во храната е ограничена. Треба да се нагласи дека покрај поединечните конвенционални антиоксиданти, голем број на екстракти од овошја, зеленчук, зачини, билки и маслодајни растенија, масло од репка, масло од сусам, масло од тиква, потоа екстракти од грозје, лук, брокула, рузмарин, цимет, зелен чај и сл., може да се употребат во својство на антиоксиданти, бидејќи содржат изобилство на супстанции со висок антиоксидативен потенцијал.

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

Глутатионот е важен водорастворлив антиоксидант што се синтетизира од аминокиселините глицин, глумат и цистеин. Глутатионот има својство директно да ги редуцира слободните радикали како што се липидните пероксиди, а има важни функции и во т.н. ксенобиотичен метаболизам. Изложеноста на црниот дроб на ксенобиотичните супстанции најчесто резултира со оксидативни реакции, при што се зголемува бројот на детоксикациони ензими. Кога човекот е изложен на високи нивоа на ксенобиотици, глутатионот реагира со овие супстанции и влегува во состав на ново формираните продукти на реакциите помеѓу него и ксенобиотите. Притоа, неговата концентрација во телото се намалува и се лимитираат неговите антиоксидативни супстанции. Глутатионот најчесто дејствува во синергизам со витаминот Ц, при што во синергетската активност доаѓа до редуција на слободните радикали што влијаат и врз двата антиоксиданти.



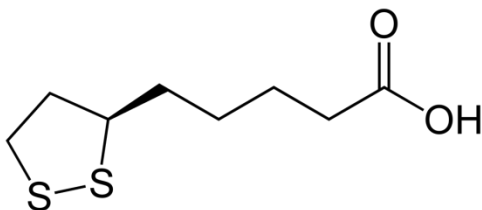
Слика 11. Структура на глутатион

Figure 11. Structure of glutathione

Липоинската киселина е уште еден важен природен антиоксидант, најчесто се категоризира во групата на "тиолни" или "биотиолни" антиоксиданти (тиолите се соединенија што содржат сулфур т.е. S-H тиолна група). Липоинската киселина активно учествува во Кребсовиот циклус, при што ја катализира

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

оксидативната декарбоксилација на алфа-кето киселините, како што се пируватот и алфакртоглутаратот, во процесите на оксидативна фосфорилација (Powis, 1989).



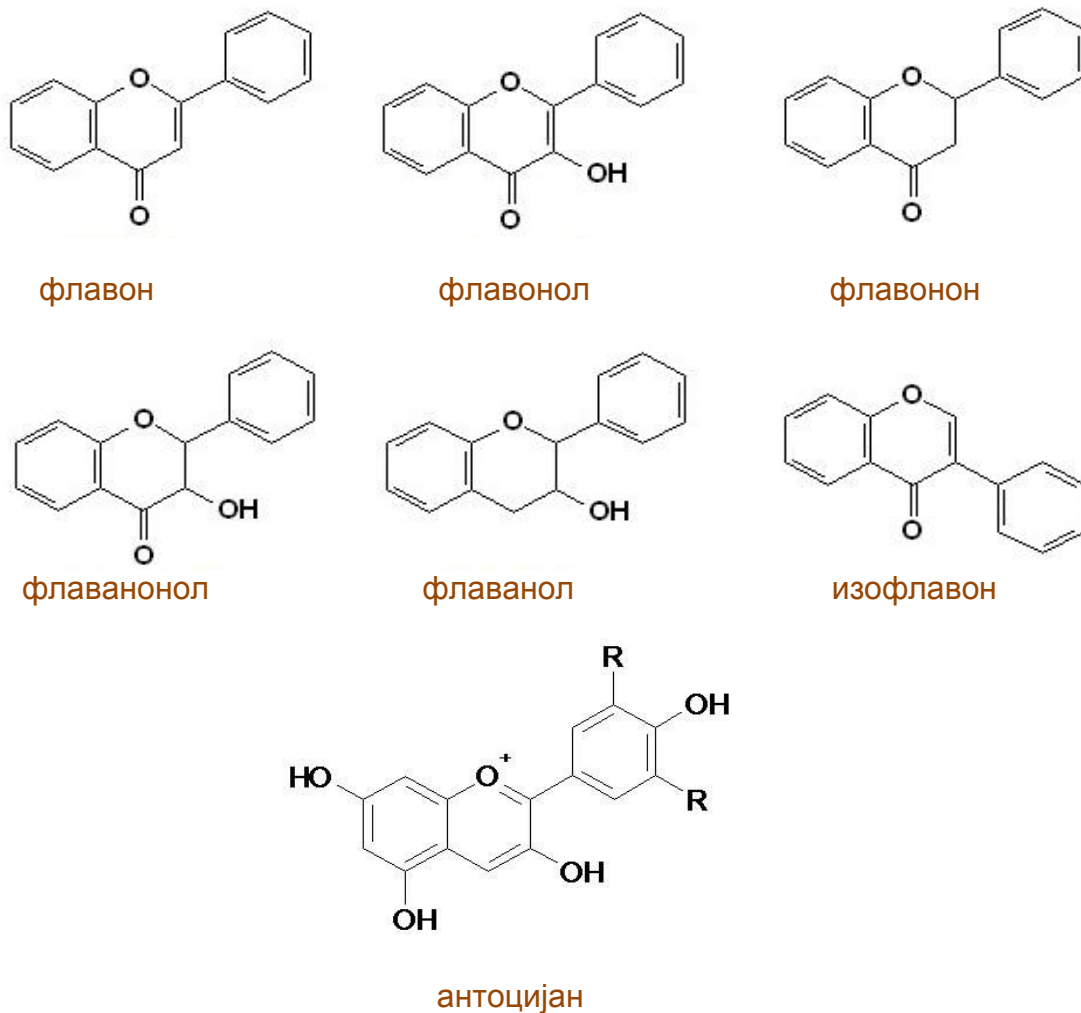
Слика 12. Структура на липоинска киселина

Figure 12. Structure of lipoic acid

2.6 Полифенолни антиоксиданти

Голем број на други диететски антиоксидантни супстанции постојат надвор од традиционалните витамини, што се дискутирани погоре во оваа магистерска работа. Многу растителни супстанции (најчесто секундарни метаболити), со едно име се нарекуваат "фитонутриенти," или "фитохемикалии," што се познати по своите антиоксидативни активности. *Полифенолите* претставуваат група од околу 8000 соединенија што покажуваат високо антиоксидативно дејство. Групата на полифенолите е поделена на флавоноиди и нефлавоноиди. Флавоноидите се поделени на повеќе групи: флавони, флавоноли, изофлаволи, флаван-3-оли, антоцијани и флавонони. Во нефлавоноиди спаѓаат: фенолните киселини и стилбени. Фенолните киселини, пак, може да се поделат на две подгрупи: деривати на бензоевата киселина и деривати на хидроксициметната киселина. Досега се карактеризирани и опишани својствата и структурите на повеќе од 3.000 флавоноиди. Во растенијата, флавоноидите покажуваат заштитни својства против различни еколошки стресови, додека кај луѓето функционираат како "модификатори на биолошкиот одговор".

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија



Слика 13. Структури на флавоноиди

Figure 13. Structure of flavonoids

Флавоноидите покажуваат антиалергенски, антиинфламаторни, антивирусни и антиканцерогени својства (Powis, 1989). Терапевтските ефекти на флавоноидите се тесно поврзани со нивните антиоксидативни својства. Така на пример, флавоноидните соединенија имаат способност да го штитат срцето од болести преку инхибиција на циклооксигеназата и липоксигеназата во тромбоцитите и макрофагите (Powis, 1989). Денес, најдобар начин за да се

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

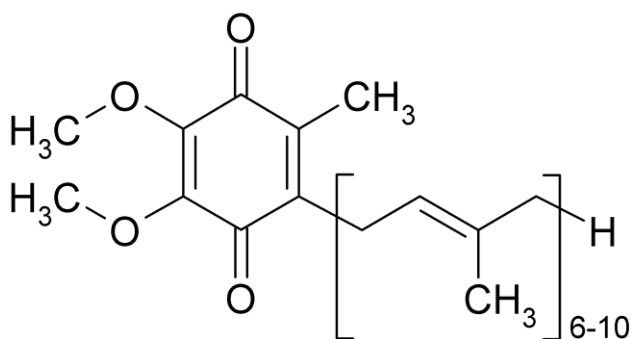
обезбеди соодветна доза на фитонутриенти е да се јаде храна во широк спектар, богата со свежо овошје и зеленчук. Фитонутриентните додатоци сега се комерцијално достапни супстанции.

2.7. Коензим Q10 (Coenzyme Q10 или CoQ10)

Молекулата на редуцираната форма на соединението коензим Q10 (CoQ10) има антиоксидативно својство и претставува витамин растворлив во масти. Оваа форма на коензим Q10 е присутна во повеќето еукариотски клетки, а главно е застапена во митохондриите. Коензим Q10 е една од главните компоненти што учествува во аеробното клеточни дишење во синцирот на трансфер на електрони, каде се генерира енергија за организмите во форма на ATP (аденозин трифосфат). Околу 95% од енергијата на човечкото тело се генерира во процесите на оксидативна фосфорилација во синцирот на електронски трансфер (Кребсовиот Циклус). Поради тоа, органите во организмот што имаат највисоки енергетски потреби (срцето, црниот дроб и бубрезите) содржат најголеми концентрации на Коензим Q10 (CoQ10). Како електронски транспортер, молекулата на CoQ10 постојано се конвертира во оксидирана и редуцирана форма преку оксидационо-редукционен циклус. Доколку оксидираната форма на Коензим Q10 прими електрони, таа преминува во редуцирана форма и обратно. Во својата редуцирана форма, молекулата на CoQ10 ги „држи“ електроните доста лабаво, па оваа молекула (CoQ) многу лесно може да ги испушти едниот или двата електрона, и со тоа дејствува како редуцирачко средство (антиоксидант). Треба да се потенцира дека постојат три стабилни редокс-состојби на Коензим Q10: целосно оксидирана (ubiquinone), делумно редуцирана форма-семикинон (ubisemiquinone) и целосно редуцирана форма (ubiquinol). Можноста на CoQ10 да егзистира во целосно оксидирана форма и во целосно редуцирана форма овозможува ова соединение да ги врши циклично функциониите во транспортниот ланец на електрони и како антиоксидант, соодветно. Со Q10 ја инхибира

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

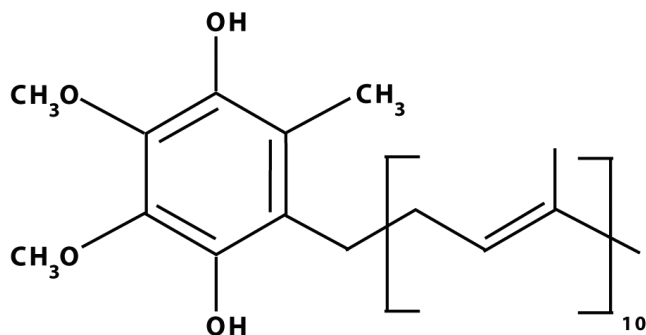
липидната пероксидација, со тоа што го спречува формирањето на липидните пероксил радикали (LOO). Покрај тоа, CoQH₂ (редуцираната форма на CoQ10) ги намалува содржините на иницијалните перферил-радикали и молекуларниот кислород во процесите на липидна пероксидација, при што се формира убисемикинон и H₂O₂. Ова потиснување на перферил-радикалите (што го спречуваат ширењето на липидната пероксидација), освен липидите, од оксидација ги заштитува и протеините. Покрај тоа, редуцираната форма на CoQ има способност да го регенерира витаминот Е од α-токофероксил радикалите. За време на оксидативен стрес, интеракцијата на H₂O₂ со голем број поливалентни метални придонесува да се генерираат хидроксилни радикали каде што е вклучена и ДНК. Молекулата на CoQ ефикасно ја спречува оксидацијата на базите од ДНК, особено на митохондријалната ДНК. За разлика од другите антиоксиданти, ова соединение го инхибира иницирањето и пропацијата на оксидативните процеси кај протеините и липидите. Циркулацијата на CoQ10 во LDL („лошата форма“ на холестерол) ја спречува оксидацијата на LDL, што е круцијален фактор во превенцијата на кардиоваскуларните болести (Wanasundara, Shahidi, 2005).



Слика 14. Структура на CoQ10 (оксидирана форма-Quinone)

Figure 14. Structure of CoQ10 (oxidized form -Quinone)

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија



Слика 15. Структура на CoQ10 (редуцирана форма-Quinol)

Figure 15. Structure of CoQ10 (reduced form -Quinol)

Во следната табела даден е преглед на најзначајните природни антиоксиданти.

Табела 1. Преглед на некои природни антиоксиданти

Table 1. Overview of some natural antioxidants

Класи на соединенија/ Classes of compounds	Антиоксиданти/ Antioxidants
Каротеноиди	β -carotene, Lycopene, Lutein
Ензими	SOD, Catalase, GPx
Глутатион	Glutathione
Хормони	Melatonin, Oestrogen
Липиди поврзани со хемикалии	Ubiquinol-10, N-acetylcysteine, lipoic acid
Минерали	Zinc, Selenium, Copper
Феноли	Quercetin, Catechin
Сапонини, стероиди	Cortisone, Estradiol, Estriol
Витамини	α -tocopherol, Ascorbic acid

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД НА РАБОТА

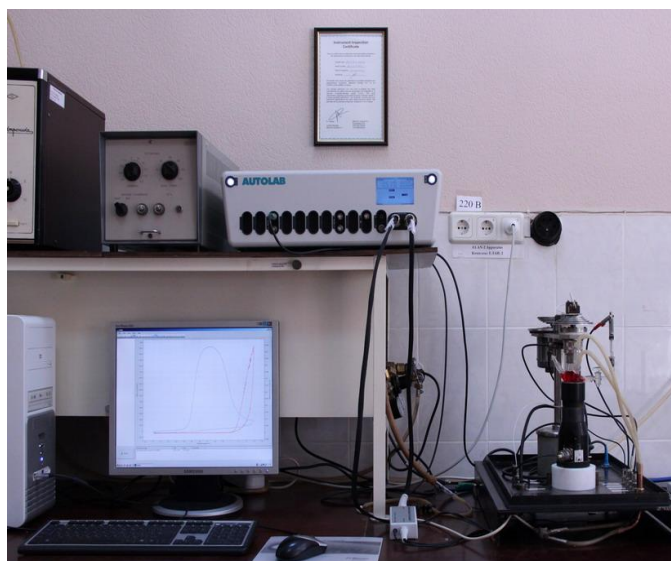
3.1 Реагенси

Сите употребени хемикалии беа со р.а. чистота и беа купени од Sigma-Aldrich и Merck (Германија). Соединението 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone беше синтетизирано според постапката опишана во Патентот на Гулабоски и соработниците (Gulaboski, Bogeski, Kappl, Hoth, 2011). Идентификацијата на ова соединение е извршена со масена спектрометрија (HPLC MS), и од неговиот UV-VIS спектар. Целата постапка детално е опишана во трудот (Gulaboski, Bogeski, Mirceski, et al., 2013).

3.2 Аналитички техники

Како работни техники во магистерската работа беа употребени циклична волтаметрија и квадратно-бранова волтаметрија со примена на AUTOLAB potentiostat model PGSTAT 128N (Eco-Chemie, The Netherlands, слика 16.a). Електрохемиските експерименти беа изведени во класичен три електроден систем (слика 16.б), каде графитна електрода (со дијаметар од 1.5 mm) беше употребена како работна електрода, додека како референтна и помошна електрода беа користени Ag/AgCl (заситен раствор од 3 mol/L KCl) и Pt електрода, соодветно. Чистењето на работната електрода беше извршено со полирање врз етанолен раствор од алуминиум оксид, а потоа површината од работната електрода беше промивана со дејонизирана вода. Сите експерименти беа изведени на собна температура. Експериментите со соединенијата 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone и 2,5-dihydroxy benzoquinone беа изведени во водени електролитни раствори, додека експериментите со Ембелин беа изведени во електролитни раствори (70:30 етанол-вода). За споредба беа правени и спектрофотометриски експерименти за чија намена беше користен UV VIS Prospec Spectrophotometer во подрачјето од 200-900 nm.

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија



a)



б)

Слика 16. а) PGSTAT 128N

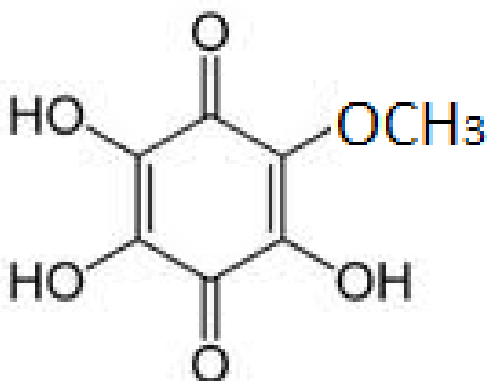
б) Приказ на една три-електродна електрохемиска ќелија

Figure 16. a) PGSTAT 128N

б) Display of a three-electrode electrochemical cell

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1 Електрохемиски и металокомплексирачки својства на соединението 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone



Слика 17. 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone

Figure 17. 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone

Во патентот на Гулабоски и соработниците (Gulaboski, Vogeski, Kappl, Hoth, 2011), опишана е деталната постапка на синтезата на соединението 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone. Како појдовна компонента за оваа синтеза е употребена реакцијата на 2,6-dimethoxy benzoquinone во силно алкална средина. Во овој дел на кратко ќе бидат опишани својствата на нативното соединение 2,6-dimethoxy benzoquinone, како и постапката на синтеза и својствата на 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone.

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

Растворено во кисела, неутрална или во слабо алкална средина, соединението *2,6-dimethoxy benzoquinone* дава жолто обојување на растворите (слика 18). Притоа, неговата максимална растворливост во водни раствори со pH од 1 до 9 е околу 0.5 mmol/L.

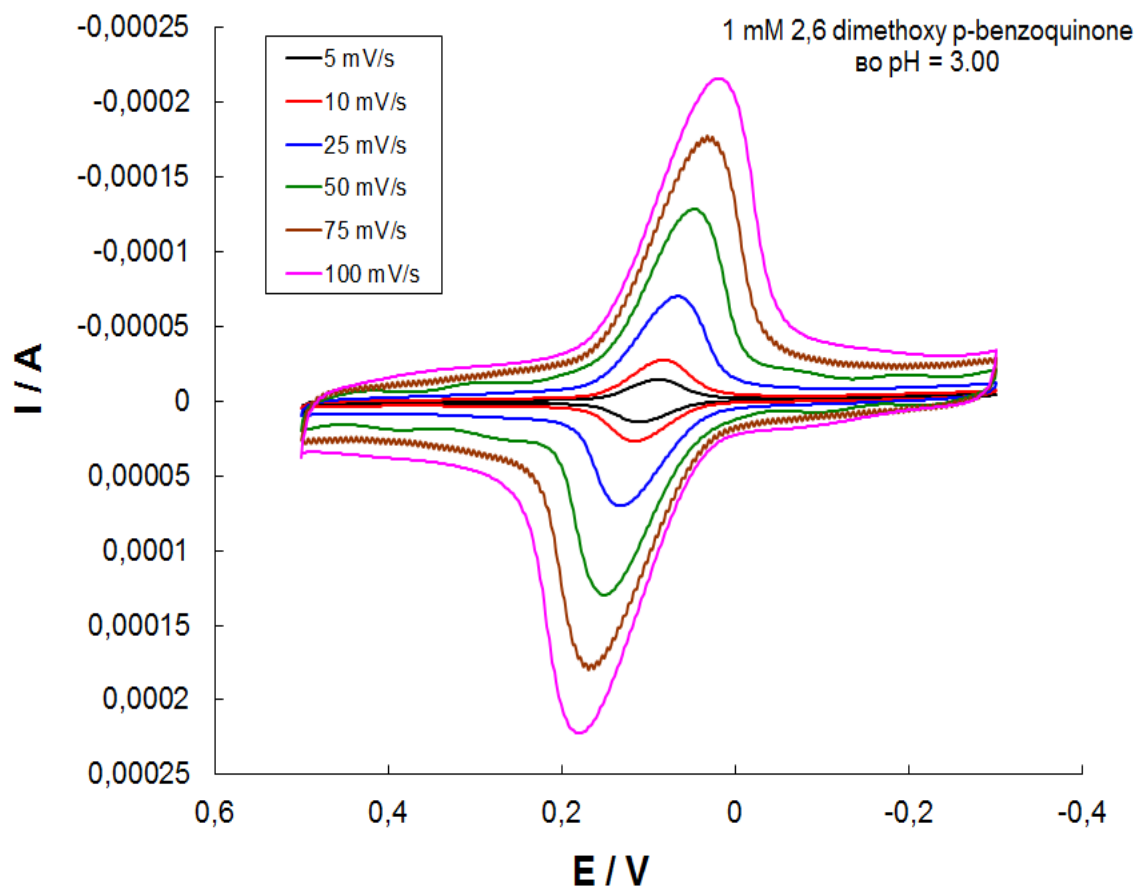


Слика 18. Раствор на 0.1 mM *2,6-dimethoxy benzoquinone* во pH = 7.00

Figure 18. Solution of 0.1 mM *2,6-dimethoxy benzoquinone* at pH = 7.00

Во кисела, неутрална и слабо базна средина соединението дава електрохемиски квазиревверзибилни одговори што се дифузионо контролирани. Доказ за тоа е линеарната зависност на струјата на пиковите како функција од квадратниот корен на брзината на промената на потенцијалот, при кои се снимени цикличните волтамограми (слика 19 и 20).

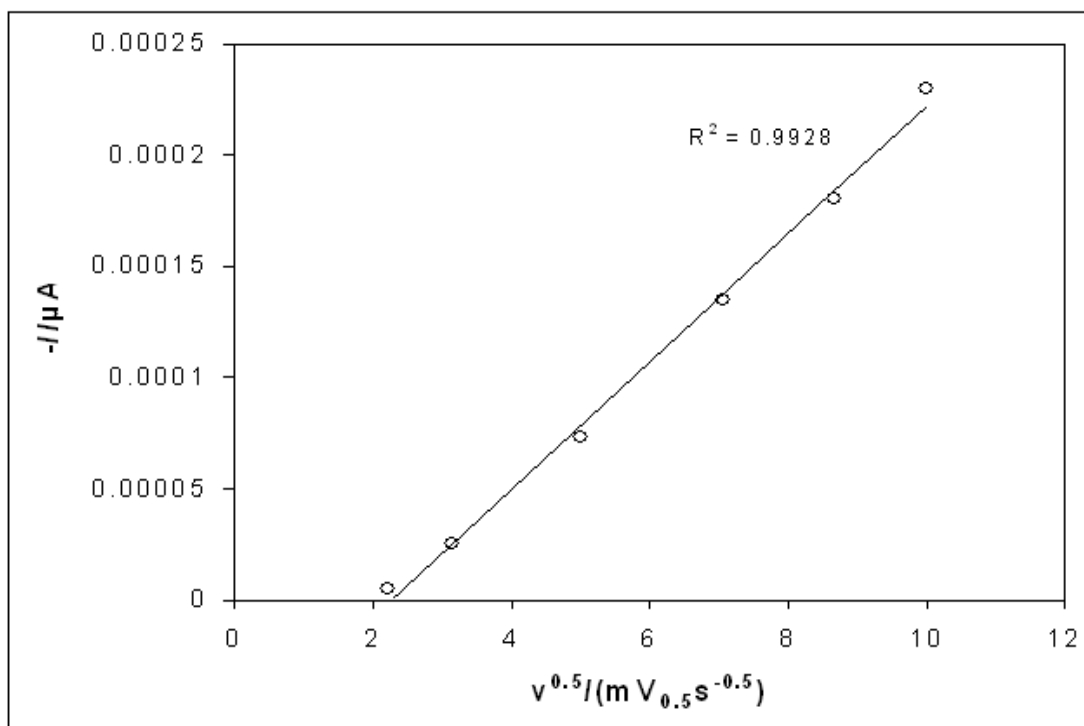
Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија



Слика 19. Циклични волтамограми на 1 mM 2,6-dimethoxy benzoquinone снимени при различни брзини на промена на потенцијалот во воден раствор со pH = 3.00

Figure 19. Cyclic voltammogram of 0.1 mM 2,6-dimethoxy benzoquinone recorded at different speeds of change of potential in aqueous solution with pH=3.00

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија



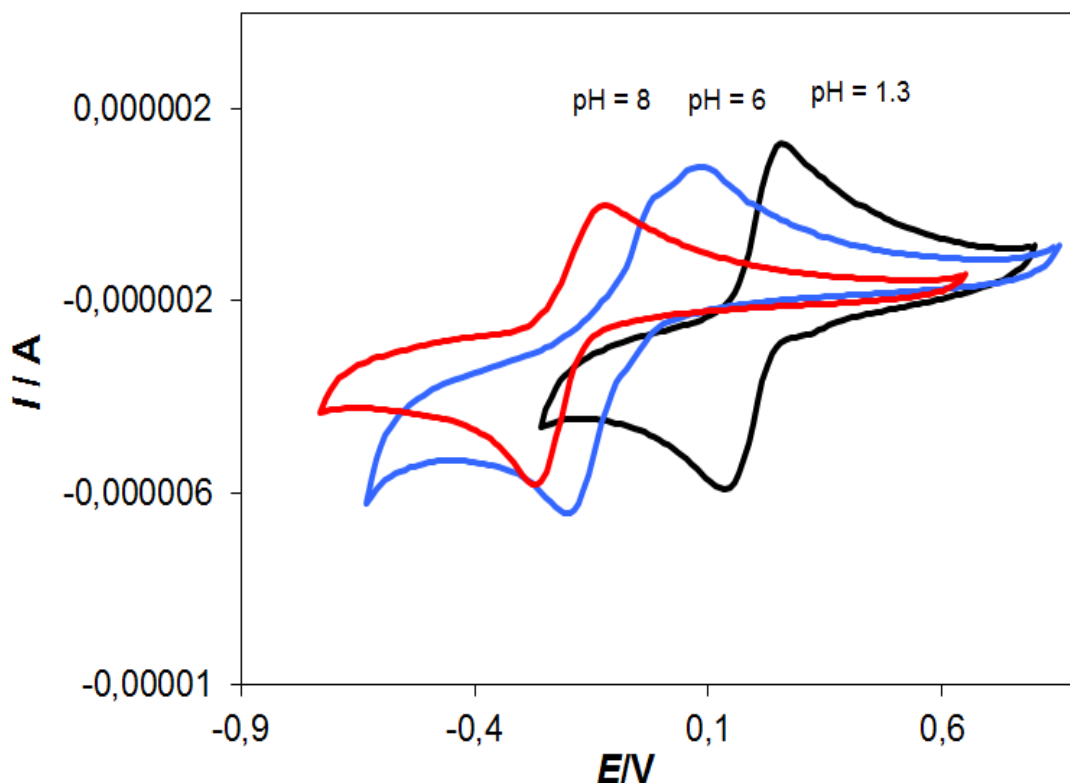
б)

Слика 20. Зависот на интензитетот на катодната пик струја од квадратен корен на брзината на промена на потенцијалот за волтамограмите дадени на Слика 19.

Figure 20. Dependence on the intensity of the cathode ray peak current of the square root of the rate of scan rate for voltamograms recorded in Figure 19.

Електрохемиските одговори на соединението *2,6-dimethoxy benzoquinone* во водени раствори чија рН се движи од 1 до 8, зависат од концентрацијата на H^+ јоните (т.е. од рН вредноста на растворите). Притоа, со зголемување на рН, волтаметриските одговори на соединението *2,6-dimethoxy benzoquinone* се поместуваат кон понегативни вредности на потенцијалите (слика 21).

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

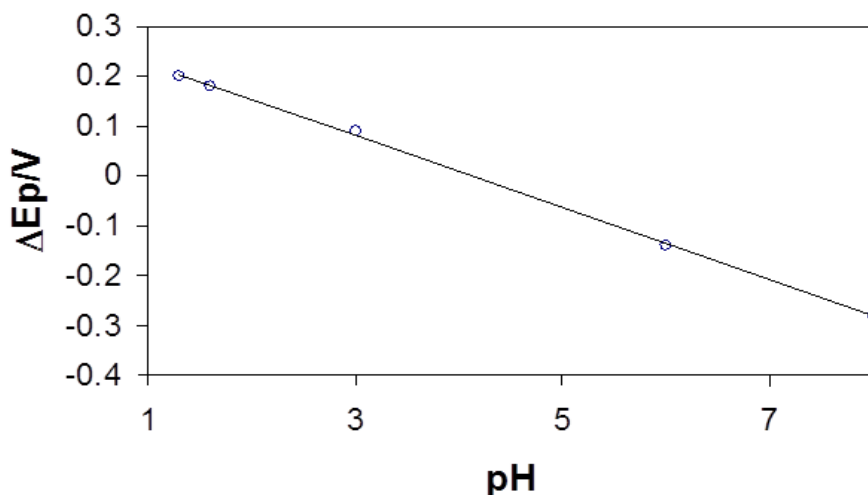


Слика 21. Циклични волтамограми на 0.1 mM/L 2,6-dimethoxy benzoquinone снимени во раствори со различни вредности на pH при брзина на промена на потенцијалот од 50 mV/s

Figure 21. Cyclic voltammograms of 0.1 mM/L 2,6-dimethoxy benzoquinone recorded in solution with different pH values at scan rate of 50 mV/s (Gulaboski et al 2013)

Доколку се нацрта зависноста на полубрановите потенцијали на цикличните волтамограми како функција од pH, се добива линеарна зависност чиј нагиб изнесува -60 mV/pH (слика 22). Оваа вредност на нагибот на правата укажува на фактот дека во електрохемискиот процес на трансформација на 2,6-dimethoxy benzoquinone учествуваат 2 електрони и 2 H^+ јони.

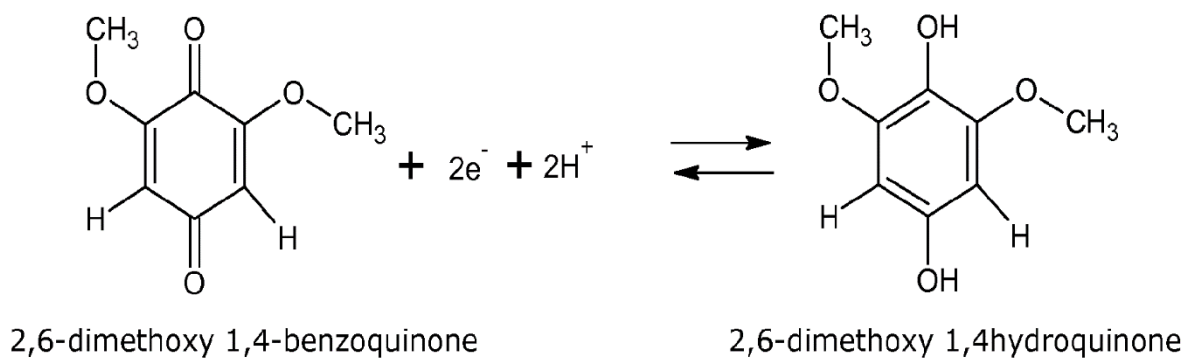
Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија



Слика 22. Зависнот на полубрановиот потенцијал на волтамограмите од *2,6-dimethoxy benzoquinone* како функција од pH.

Figure 22. Dependence of half-wave potential (voltamograms) of *2,6-dimethoxy benzoquinone* on pH

Притоа, редокс-реакцијата на *2,6-dimethoxy benzoquinone* во овие услови може да се претстави со шемата на слика 23:

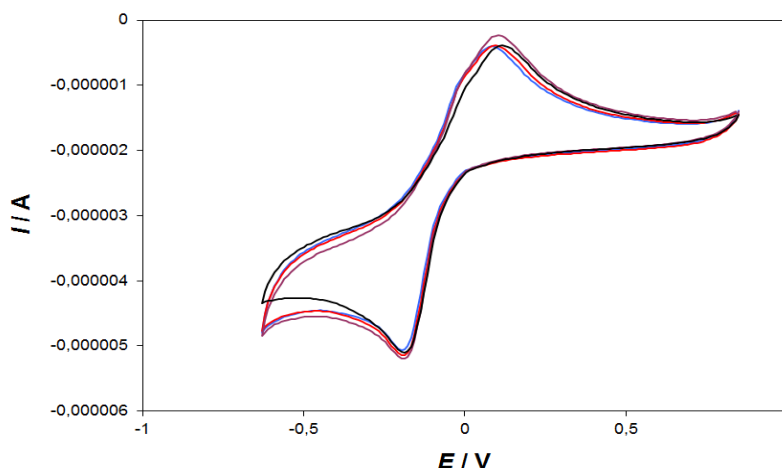


Слика 23. Редокс-реакцијата на *2,6-dimethoxy benzoquinone*

Figure 23. Redox-reaction of *2,6-dimethoxy benzoquinone*

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

Карактеристично својство за соединението *2,6-dimethoxy benzoquinone* е што неговите електрохемиски одговори не се осетливи на концентрацијата на алкални и земноалкални јони (слика 24). Тоа покажува дека ова соединение не може да комплексира метални јони ниту кога е во оксидирана, ниту кога е во редуцирана енергетска состојба.



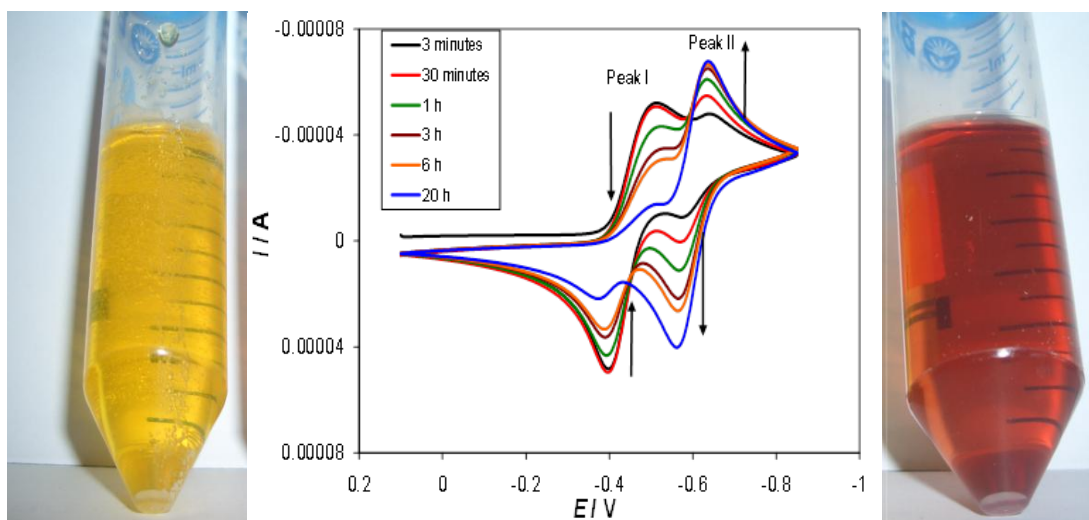
Слика 24. Циклични волтамограми на соединението *2,6-dimethoxy-p-benzoquinone* снимени при брзина на промена на потенцијалот од 50 mV/s во водни раствори со pH = 7.00, при конц. на Ca²⁺ јоните во растворот од 10, 50 и 100 mmol/L.

Figure 24. Cyclic voltammograms of compound *2,6-dimethoxy-p-benzoquinone* recorded at a scan rate of 50 mV/s in aqueous solution with pH=7.00, and concentration Ca²⁺ ions in the solution of 10, 50 and 100 mmol/L.

Кога соединението *2,6-dimethoxy benzoquinone* ќе се стави во силно алкална средина (pH > 11), тогаш доаѓа до реакција на *2,6-dimethoxy benzoquinone* со хидроксилните OH⁻ јони, при што растворот ја менува бојата од жолта во интензивно црвена. После одредено време на реакција и после ре-титрацијата на овој раствор до неутрални pH вредности, растворот сè уште ја задржува црвената боја (слика 25 десно). Промената на бојата е значаен индикатор дека се случила хемиска трансформација на *2,6-dimethoxy benzoquinone*. Индикации за одвивањето на хемиска реакција беше студирано и со циклична волтаметрија

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

(слика 25). Притоа, со растворањето на *2,6-dimethoxy benzoquinone* во силно алкална средина ($\text{pH} = 12$), покрај сигналот од нативното соединение што се јавува на потенцијали од околу -0.42 V , се јавува уште еден сигнал на многу понегативни потенцијали од околу -0.70 V . Со текот на времето, интензитетот на сигналот од нативниот *2,6-dimethoxy benzoquinone* се намалува, додека интензитетот на сигналот на понегативни потенцијали пропорционално се зголемува (слика 25). После период од околу 20 часа, во системот е видлив главно сигналот на понегативни потенцијали, што потекнува од новото соединение добиено при реакција на *2,6-dimethoxy benzoquinone* со OH^- јоните. Неодамна беше покажано дека во реакцијата на *2,6-dimethoxy benzoquinone* со OH^- јоните се создаваат повеќе хидрокси деривати на метокси бензокинонот, но како главен продукт е соединението *2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone* (Gulaboski et al., 2011, and Gulaboski et al., 2013).

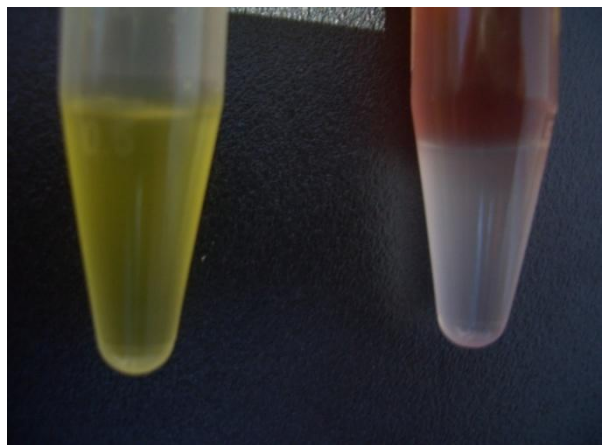


Слика 25. Циклични волтамограми на соединението *2,6-dimethoxy benzoquinone* (1 mmol/L) снимени при брзина на промена на потенцијалот од 50 mV/s при неколку различни времиња на реакција во воден раствор на 0.1 mol/L NaOH

Figure 25. Cyclic voltammograms of compound *2,6-dimethoxy benzoquinone* (1 mmol/L) recorded at a scan rate of 50 mV/s at several different times of reaction in aqueous solution of 0.1 mol/L NaOH

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

Треба да се нагласи дека нативното соединение *2,6-dimethoxy benzoquinone* е слабо растворливо во вода и водени раствори со pH од 1 до 9. Меѓутоа, ново синтетизираното соединение *2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone*, е силно хидрофилно и неговата растворливост во вода е поголема од 0.05 mol/L. Идентификација на ова соединение е извршена со HPLC-MS (Gulaboski, Bogeski, Mirceski, et al., 2013). Преку серија од партициони експерименти, покажано е дека нативниот *2,6-dimethoxy benzoquinone* не полесно се раствора во слабо поларни органски растворувачи (дихлоретан), додека *2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone* воопшто не се раствора во слабо-поларниот растворувач дихлоретан (слика 26 десно).



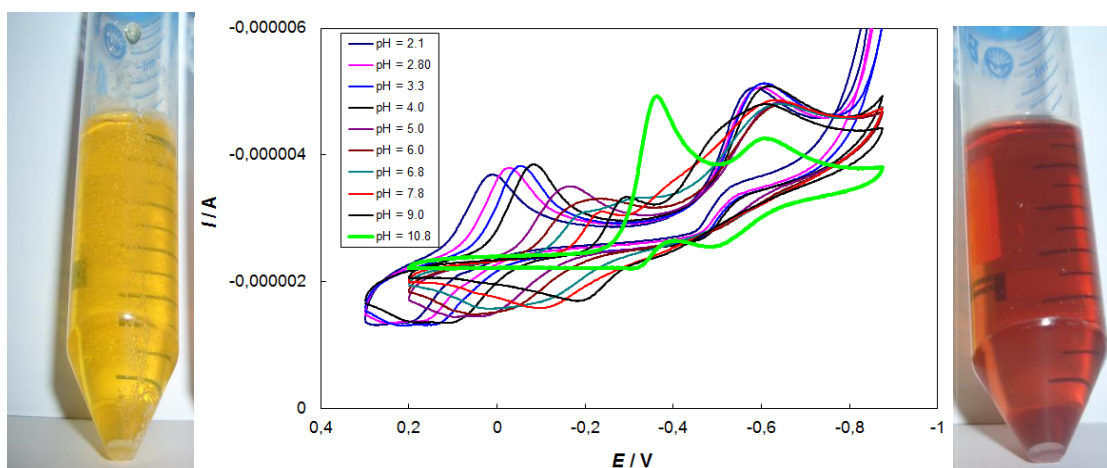
Слика 26. Дистрибуција на *2,6-dimethoxy benzoquinone* (лево) и на *2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone* (десно) помеѓу вода и дихлоретан. Дихлоретан е органски растворувач што не се меша со вода и стои долу во киветите. Водениот раствор е во горниот дел на киветите.

Figure 26. Distribution of *2,6-dimethoxy benzoquinone* (left) and *2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone* (right) between water and dichloroethane. Dichloroethane is an organic solvent which does not interfere with water, standing down in cuvettes. Aqueous solution is in the upper part of the cuvettes.

Посебно треба да се нагласи дека за разлика од редокс-хемијата на нативниот *2,6-dimethoxy benzoquinone*, редокс-хемијата *2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone* е неосетлива на концентрацијата на H⁺ јони во раствори чие pH се

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

движи од 3 до 12 (слика 27). Тоа имплицира на дисоцијација на сите хидроксилни групи од структурата на 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone, при што ова соединение во подрачје на рН од 3 до 12 егзистира во форма на анјонска (негативно набиена) молекула. Ваквото однесување на соединението 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone може да се очекува, знаејќи го фактот дека полихидроксилните бензокинони се однесуваат како умерено силни киселини. Стабилизацијата на продуктот на електрохемиската трансформација на соединението 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone настанува преку формирање на водородни врски со молекулите од водата, како што е објаснето во трудот на Smith и соработниците (Quan, Sanchez, Wasylikiw, Smith., 2007).

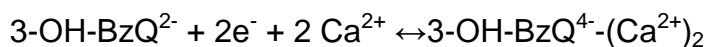


Слика 27. Циклични волтамограми од 2,6-dimethoxy benzoquinone (сигналот на попозитивни потенцијали) и од 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone (сигналот на понегативни потенцијали) снимени при $v = 50 \text{ mV/s}$ во раствори со различни рН вредности. Кај овие експерименти, 2,6-dimethoxy benzoquinone (1 mM/L) беше оставен да реагира во воден раствор на 0.1 mol/L NaOH за време од 45 минути, а потоа рН беше подесена со тиртирање со HCl (1 mol/L) до вредностите прикажано во графикот.

Figure 27. Cyclic voltammograms of 2,6-dimethoxy benzoquinone (signal at more positive potentials) and 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone (signal at more negative potentials) recorded at a scan rate of 50 mV/s in solutions with different pH values. In these experiments, 2,6-dimethoxy benzoquinone (1 mM/L) was left to react in an aqueous solution of 0.1 mol / L NaOH for a period of 45 minutes, and then the pH was adjusted with titration with HCl (1 mol / L) to the values shown in the graph.

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

Додека нативното соединение *2,6-dimethoxy benzoquinone* не покажува комплексирачки способности кон земноалкалните метални јони, соединението на *2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone* покажува значителен афинитет кон комплексирање на некои земноалкални јони. На сликата 28, се прикажани волтамограми од нативниот *2,6-dimethoxy benzoquinone* (сигналот на попозитивни потенцијали) и од *2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone* (сигналот на понегативни потенцијали) снимени во присуство на различни концентрации на Ca^{2+} јони. Додека волтаметрискиот сигнал од *2,6-dimethoxy benzoquinone* не е осетлив на концентрацијата на Ca^{2+} јоните, волтаметрискиот сигнал од *2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone* (пикот на понегативни потенцијали) се поместува пропорционално кон попозитивни вредности со зголемување на концентрацијата на Ca^{2+} јоните во растворот. Зависноста на полубрановиот потенцијал на волтаметрискиот сигнал од *2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone* како функција од $\log[\text{c}(\text{Ca}^{2+})]$ е права линија со наклон од $59 \text{ mV}/\log[\text{c}(\text{Ca}^{2+})]$ и отсечок од -408 mV . Нагибот од 59 mV имплицира дека се формира комплекс помеѓу редуцираниот *2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone* и Ca^{2+} јоните со стехиометрија 1:2, додека во отсечокот се содржи вредноста на константата на комплексирање (константата на стабилност) помеѓу *2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone* (3-OH-BzQ) и Ca^{2+} јоните. Со примена на методот на DeFord and Hume (DeFord and Hume, 1951), од Нерстоновата равенка што за овој случај на реакцијата на редукција и комплексирање на 3-OH-BzQ со Ca^{2+} јоните (Gulaboski et al 2011, and Gulaboski et al 2013),

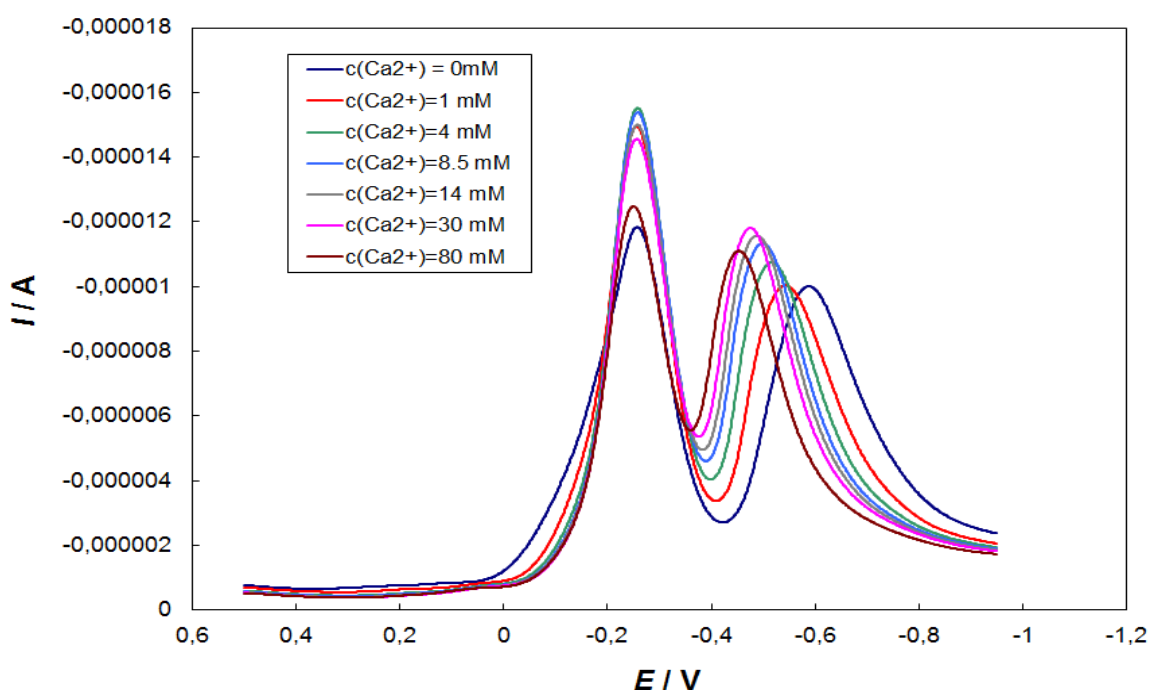


(каде 3-OH-BzQ^{2-} е реактантот, а $3\text{-OH-BzQ}^{4-}(\text{Ca}^{2+})_2$ е комплексот на редуцираниот облик на 3-OH-BzQ^{2-} со Ca^{2+} јоните) го има следниот облик:

$$E_{p,mid} = E^0 + 0.059 \log(\text{Ca}^{2+}) + 0.029 \log(K_{stab})$$

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

Пресметавме дека вредноста на константата на стабилност помеѓу 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone и Ca^{2+} јоните изнесува $K_{\text{stab}} = 1.95 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ L}^3$. Кај овие експерименти, нативниот 2,6-dimethoxy benzoquinone (1 mmol/L) беше оставен да реагира во воден раствор на 0.1 mol/L NaOH за време од 45 минути, а потоа pH на растворот беше подесена со тиртирање со HCl (1 mol/L) до pH од 7.00.

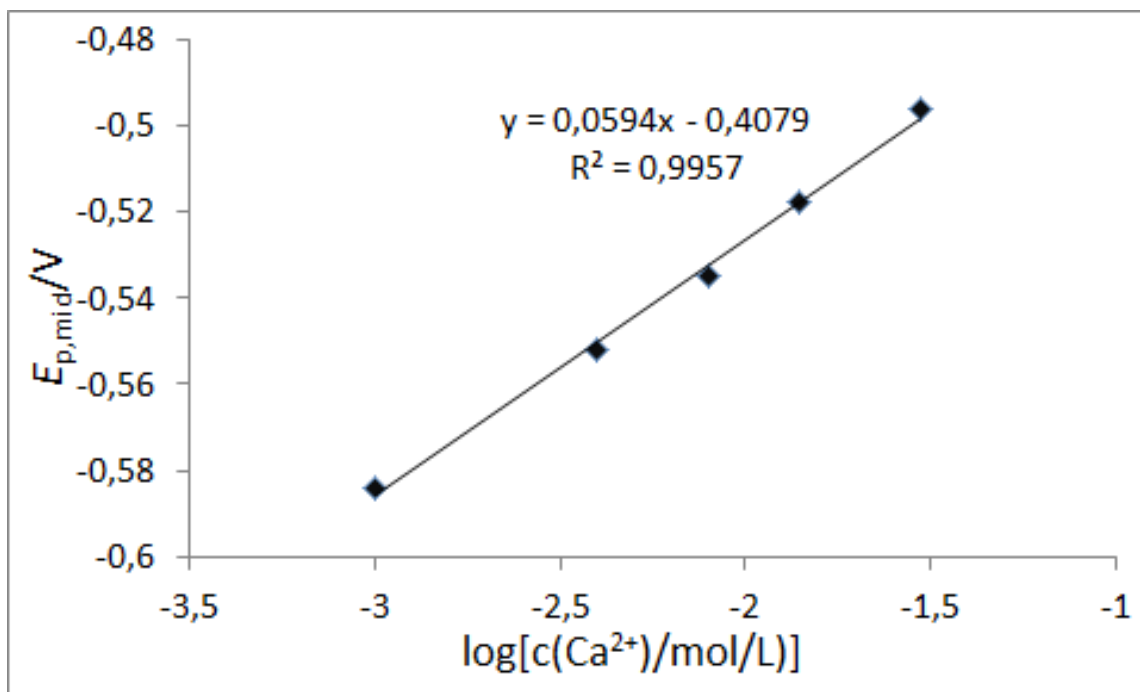


Слика 28. Циклични волтамограми од 2,6-dimethoxy benzoquinone (сигналот на попозитивни потенцијали) и од 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone (сигналот на понегативни потенцијали) снимени при брзина на промена на потенцијалот од 50 mV/s и при различни концентрации на Ca^{2+} јони во растворот при pH од 7.00.

Figure 28. Cyclic voltammograms of 2,6-dimethoxy benzoquinone (signal more positive potentials) and 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone (signal more negative potentials) recorded at a rate of change of potential of 50 mV/s in solutions containing different concentrations of Ca^{2+} ions at pH 7.00.

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

Поместувањето на сигналот од 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone кон попозитивни вредности со зголемување на концентрацијата на Ca^{2+} јоните во растворот имплицира на формирање на комплекс помеѓу редуцираниот облик на 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone и Ca^{2+} јоните.



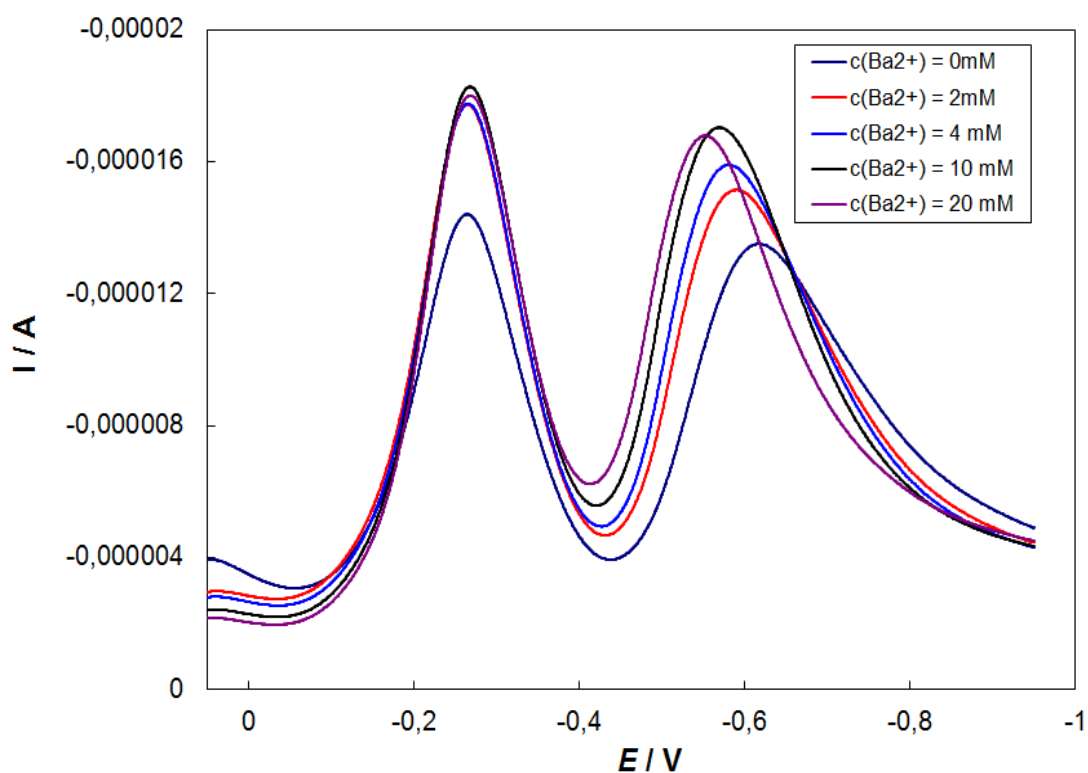
Слика 29. Зависност на полубрановиот потенцијал на сигналите од 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone од слика 28 како функција од логаритам на моларната концентрација на Ca^{2+} јоните

Figure 29. Dependence of the half wave potential signals of 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone from figure 28 on the logarithm of the molar concentration of Ca^{2+} ions

На сличен начин, беше утврдено дека електрохемиски редуцираниот облик на соединението 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone гради комплекси и со Ba^{2+} (слика 30) и Sr^{2+} јоните, додека со Mg^{2+} јоните комплексирањето е многу послабо (слика 31). Малиот радиус на Mg^{2+} јоните и нивната силна хидратација во водни раствори се најверојатната причина за отсуството на интеракции со 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone. На овој начин, соединението 2,3,5-trihydroxy-6-

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

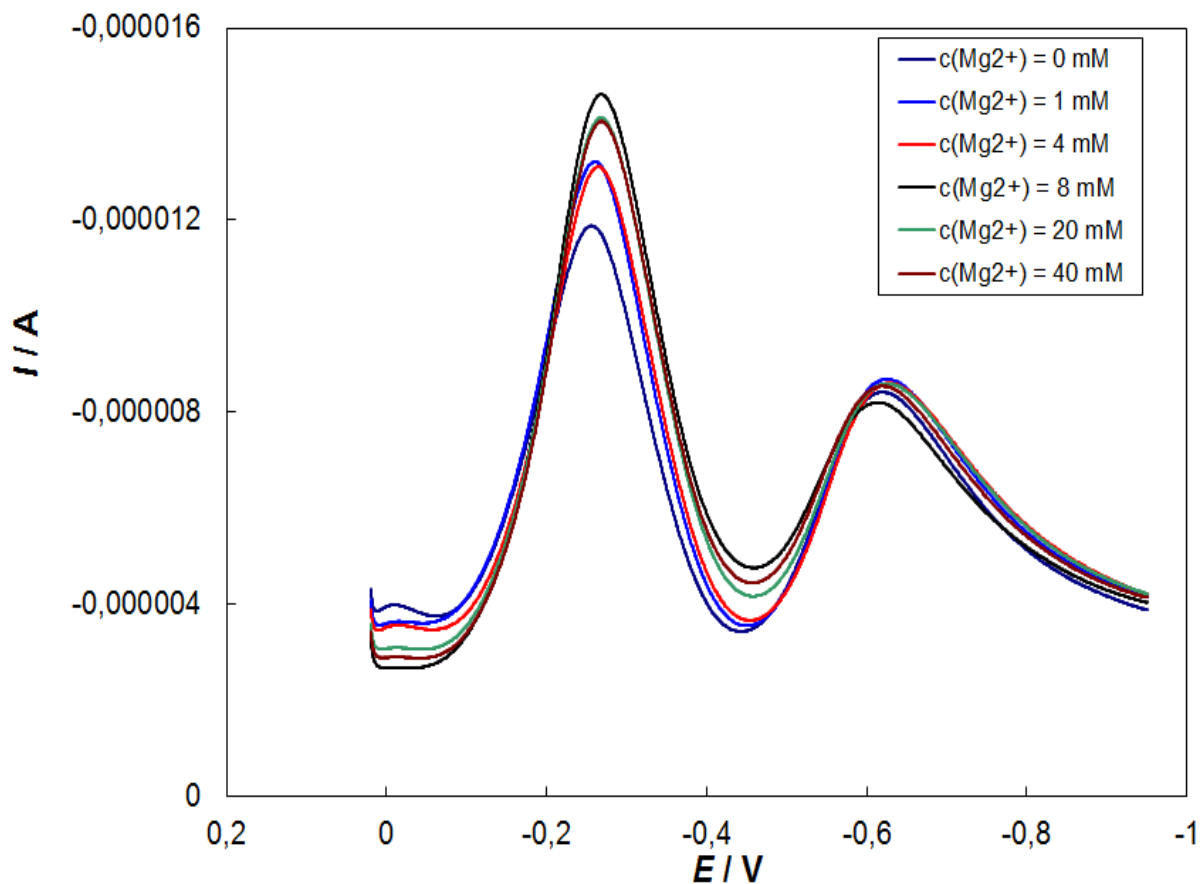
methoxy benzoquinone може да се гледа како селективен лиганд за земјоалкални катјони. Константите на стабилност (K_{stab}) на 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone и Ba^{2+} и Sr^{2+} јоните беа пресметани по методот на DeFord и Hume (DeFord and Hume, 1951), од нагибот на правите и со примена на Нернстовата равенка. Вредности за константата на стабилност изнесуваат: $K_{stab} = 6.95 \times 10^7 \text{ mol}^{-1} \text{ L}^3$ за комплексот со Ba^{2+} и $K_{stab} = 1.45 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ L}^3$ за комплексот со Sr^{2+} јоните.



Слика 30. Циклични волтамограми од 2,6-dimethoxy benzoquinone (сигналот на попозитивни потенцијали) и од 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone (сигналот на понегативни потенцијали) снимени при брзина на промена на потенцијалот од 50 mV/s и при различни концентрации на Ba^{2+} јони во растворот при pH од 7.00.

Figure 30. Cyclic voltammograms of 2,6-dimethoxy benzoquinone (signal more positive potentials) and 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone (signal more negative potentials) recorded at a scan rate of 50 mV/s and at different concentrations of Ba^{2+} ions in solution at pH 7.00.

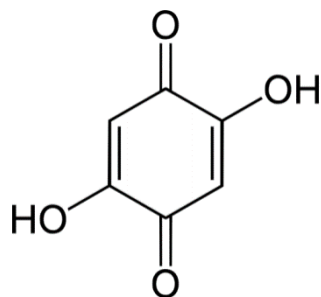
Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија



Слика 31. Циклични волтамограми од 2,6-dimethoxy benzoquinone (сигналот на попозитивни потенцијали) и од 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone (сигналот на понегативни потенцијали) снимени при брзина на промена на потенцијалот од 50 mV/s и при различни концентрации на Mg²⁺ јони во растворот при pH од 7.00.

Figure 31. Cyclic voltammograms of 2,6-dimethoxy benzoquinone (signal more positive potentials) and 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone (signal more negative potentials) recorded at a scan rate of 50 mV / s and at different concentrations of Mg²⁺ ions in solution at pH 7.00.

4.2 Електрохемиски и металокомплексирачки својства на соединението 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone



Слика 32. 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone

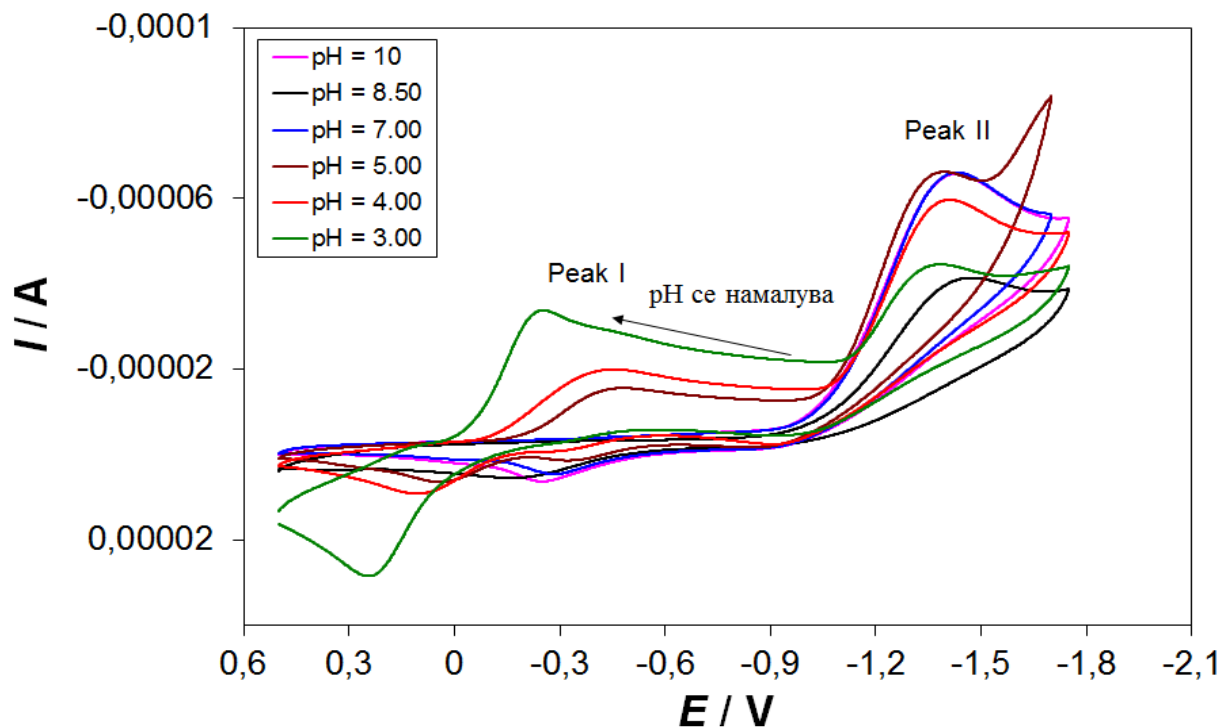
Figure 32. 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone

Соединението 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone е хидрофилен дихидроксиден бензокинон и е познат лиганд за голем број на преодни метали (Mostafa, 1999). Неговата синтеза е релативно едноставна, додека во литературата постојат главно податоци за структурите на комплексите на 2,5-dihydroxy benzoquinone со лантанидите и со јоните на некои преодни метали, како бакарот и железото. Неговата електрохемија е малку позната во литературата, а нема податоци и за неговата антиоксидативна активност. Познато е дека киноните што содржат две хидроксилни групи се потенцијални лиганди за голем број на метални јони, а растворени во вода се однесуваат како умерено силни киселини. Иако ова сооединение е симетрично, сепак има две различни константи на дисоцијација. Вредностите на константите на дисоцијација на 2,5-dihydroxy benzoquinone изнесуваат $pK_{a,1} = 2.95$, $pK_{a,2} = 4.87$. Тоа значи дека во физиолошки услови (во раствори со рН вредности од околу 7.00), ова соединение ќе биде присутно во дисоцирана форма како ди-анјон, при што двете хидроксидни ОН групи ќе бидат дисоцирани. Соединението 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone лесно се раствора во вода при концентрации до 0.05 mol/L. Кога е растворено во вода во раствори чии вредности на рН се поголеми од 4, растворите се обоени интензивно црвено.

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

Црвената боја на водените раствори од овие соединенија е визуелен индикатор за дисоцијацијата на хидроксидните групи во нивната структура.

Во непуферирани водни раствори чие што рН е во подрачјето од 5 до 10, соединението 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone покажува електрохемиска активност што не зависи од рН. Притоа, во цикличните волтамограми во ова подрачје на рН се забележува само еден квазиреверзибилен волтаметриски сигнал на потенцијали од околу -1.3 V, чија позиција не зависи од рН. Во раствори чии вредности на рН се од 3 до 5, покрај сигналот на -1.3 V, се јавува уште еден сигнал на попозитивни потенцијали. Позицијата на овој сигнал се поместува кон попозитивни вредности за намалување на рН на средината (слика 33).



Слика 33. Циклични волтамограми од соединението 2,5-dihydroxy benzoquinone (1 mmol/L) снимени при брзина на промена на потенцијалот од 50 mV/s во водни раствори со различни вредности на рН

Figure 33. Cyclic voltammograms of the compound 2,5-dihydroxy benzoquinone (1 mmol/L) recorded at a scan rate of 50 mV/s in aqueous solution with different pH values

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

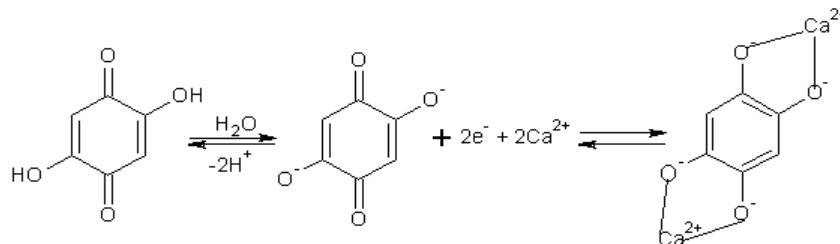
И двата волтаметриски одговори се дифузионо контролирани, а тоа е покажано со линеарната зависност на пик-струите од квадратниот корен на брзините на промените на потенцијалот во цикличната волтаметрија.

Во раствори што имаат физиолошки рН вредности од околу 7.00, единствениот волтаметриски пик од соединението 2,5-dihydroxy benzoquinone е тој на потенцијали од -1.3 V. Овој сигнал покажува силна осетливост кон Ca^{2+} , Mg^{2+} и Ba^{2+} јоните, при што зголемувањето на концентрацијата на овие јони во водениот раствор доведува до поместување на волтаметрискиот сигнал кон попозитивни потенцијали (слика 35, 36 и 37). Во сите случаи на студираниите јони, зависноста на средниот потенцијал ($E_{p, \text{mid}}$) на волтаметрискиот одговор од 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone како функција од логаритмите од концентрациите на Ca^{2+} , Mg^{2+} и Ba^{2+} јоните е линеарна со нагиби од околу 59 mV/log[c(Ca^{2+} , Mg^{2+} и Ba^{2+} јоните)]. Ваквата вредност на термодинамичкиот нагибна правата $E_{p, \text{mid}}$ vs. log[c(Ca^{2+} , Mg^{2+} и Ba^{2+} јоните)] покажува дека се формираат комплекси помеѓу редуцираната форма на 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone и студираниите земноалкални јони во однос 1:2. Константите на стабилност (K_{stab}) на соединението 2,5-dihydroxy benzoquinone и Ca^{2+} , Ba^{2+} и Mg^{2+} јоните беа пресметани по методот на DeFord и Hume (DeFord and Hume, 1951), преку отсекоците на правите прикажани на сликите 38, 39 и 40 и нивните вредности изнесуваат: $K_{\text{stab}} = 9 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ L}^3$ за комплексот со Ca^{2+} , $K_{\text{stab}} = 4 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ L}^3$ за комплексот со Ba^{2+} јоните и $K_{\text{stab}} = 5 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ L}^3$ за комплексот со Mg^{2+} јоните.

Во споредба со константите на стабилност на земноалкалните јони со соединението 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone, може да се забележи дека константите на стабилност на 2,5-dihydroxy benzoquinone со Ca^{2+} , Ba^{2+} и Mg^{2+} јоните се за околу еден ред на величина поголеми. Тоа се должи на фактот што ефективниот негативен полнеж кај 2,5-dihydroxy benzoquinone е поголем во однос 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy benzoquinone поради отсуството на метокси групата во структурата на соединението 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone. Процесот на

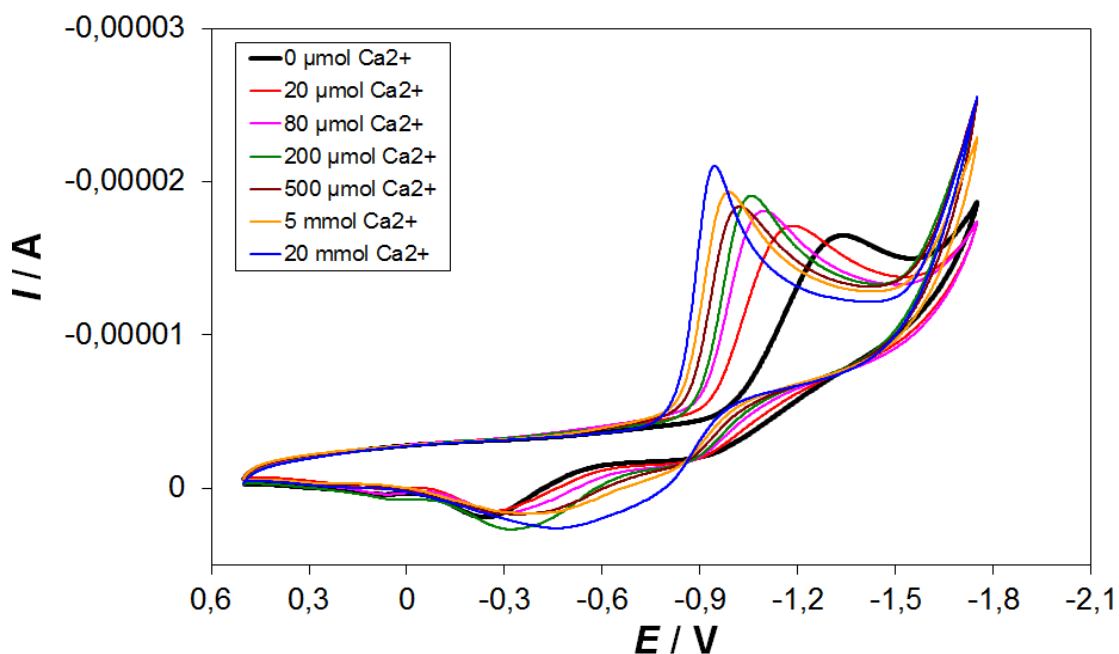
Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

електрохемиска редукција на 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone и последователното комплексирање со земноалкалните јони може да се претстави со шема на следната слика:



Слика 34. Шема на електрохемиска редукција и комплексирање на продуктот од електрохемиската редукција на 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone со Ca^{2+} јоните.

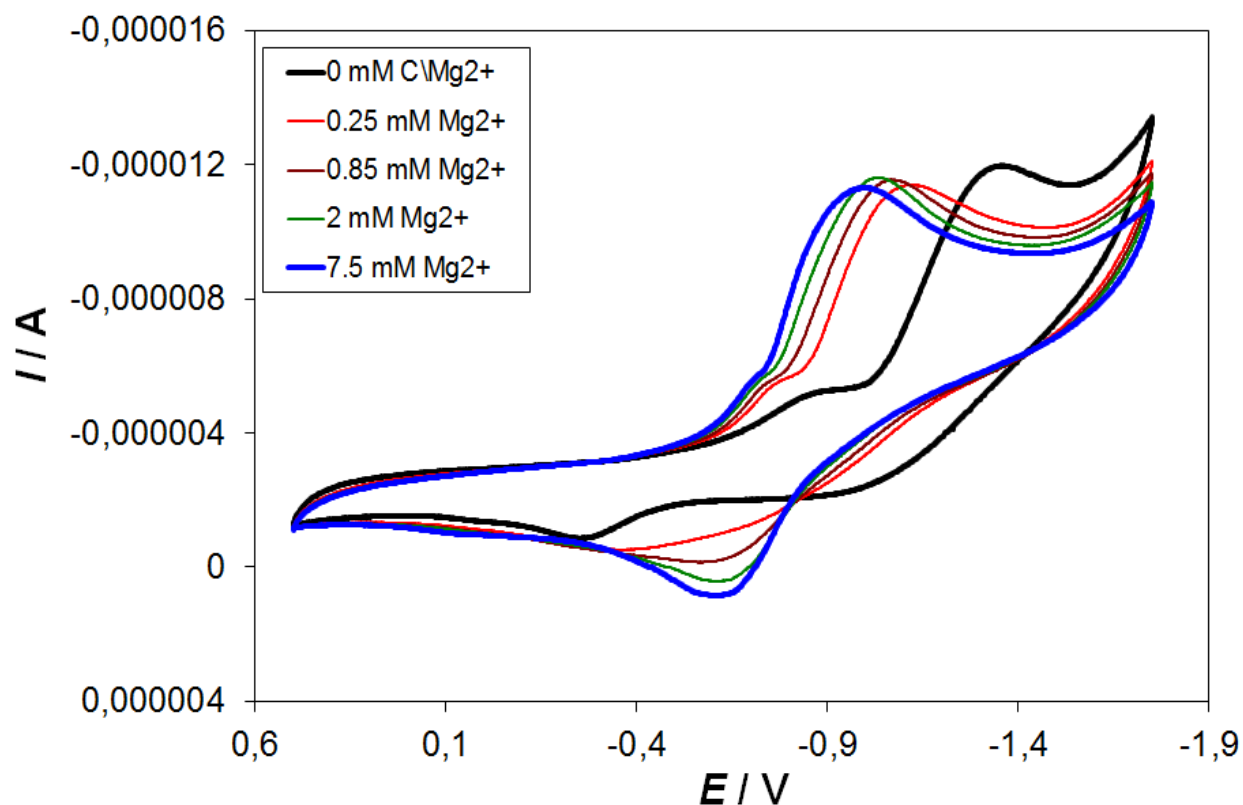
Figure 34. Scheme of electrochemical reduction and complexing product electrochemical reduction 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone with Ca^{2+} ions.



Слика 35. Циклични волтамограми на 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone снимени при брзина на промена на потенцијалот од 50 mV/s во раствори со pH = 7.00 и при различни концентрации на Ca^{2+} јоните во растворите

Figure 35. Cyclic voltammograms of 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone recorded at scan rate of 50 mV/s in solutions with pH=7.00 and at different concentrations of Ca^{2+} ions in solutions

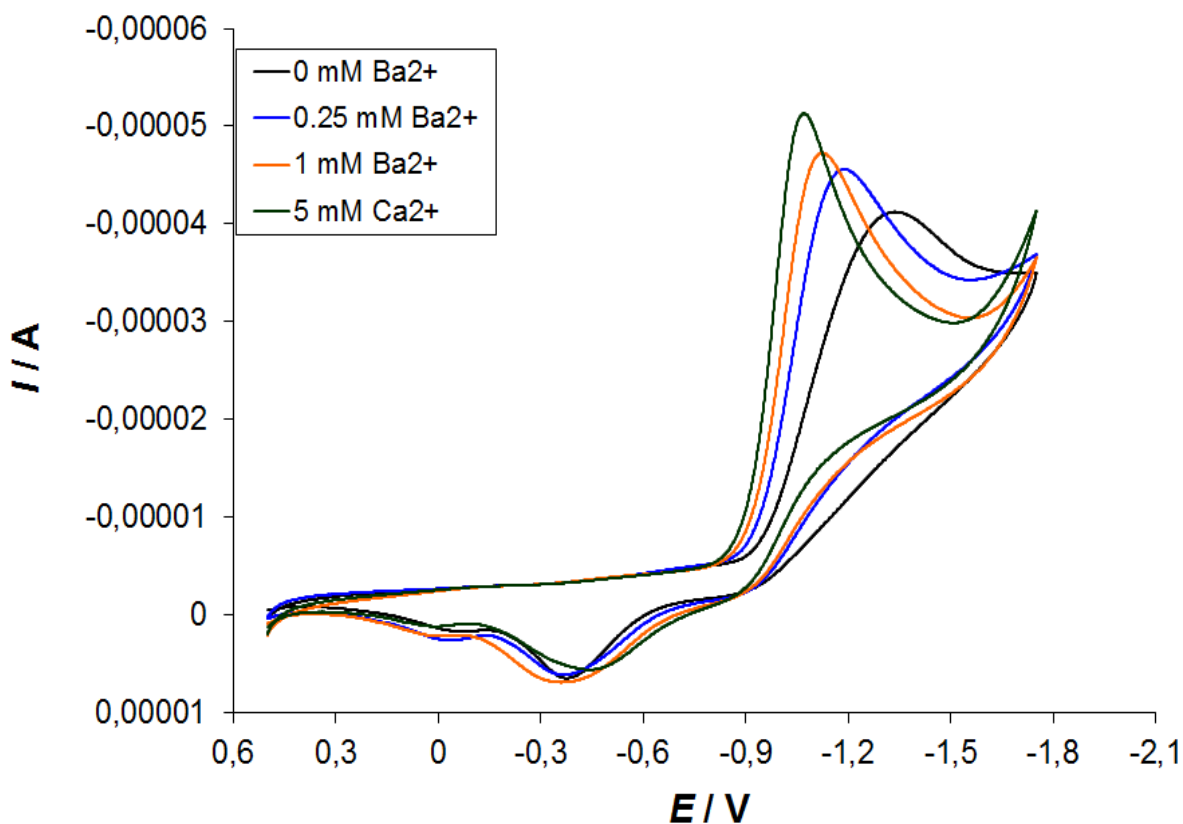
Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија



Слика 36. Циклични волтамограми на 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone снимени при брзина на промена на потенцијалот од 50 mV/s во раствори со pH = 7.00 и при различни концентрации на Mg²⁺ јоните во растворите

Figure 36. Cyclic voltammograms of 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone recorded at scan rate of 50 mV/s in solutions with pH=7.00 and at different concentrations of Mg²⁺ ions in solutions

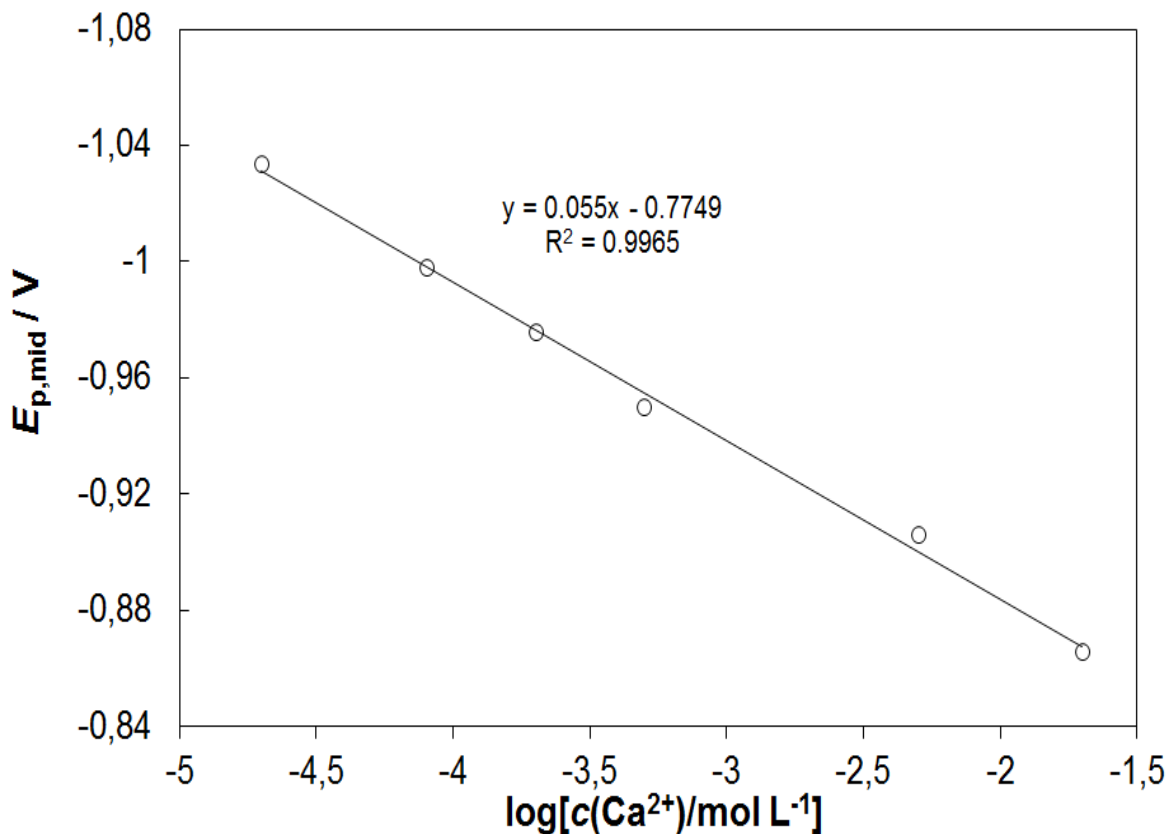
Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија



Слика 37. Циклични волтамограми на 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone снимени при брзина на промена на потенцијалот од 50 mV/s во раствори со pH = 7.00 и при различни концентрации на Ba²⁺ јоните во растворите

Figure 37. Cyclic voltammograms of 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone recorded at scan rate of 50 mV/s in solutions with pH=7.00 and at different concentrations of Ba²⁺ ions in solutions

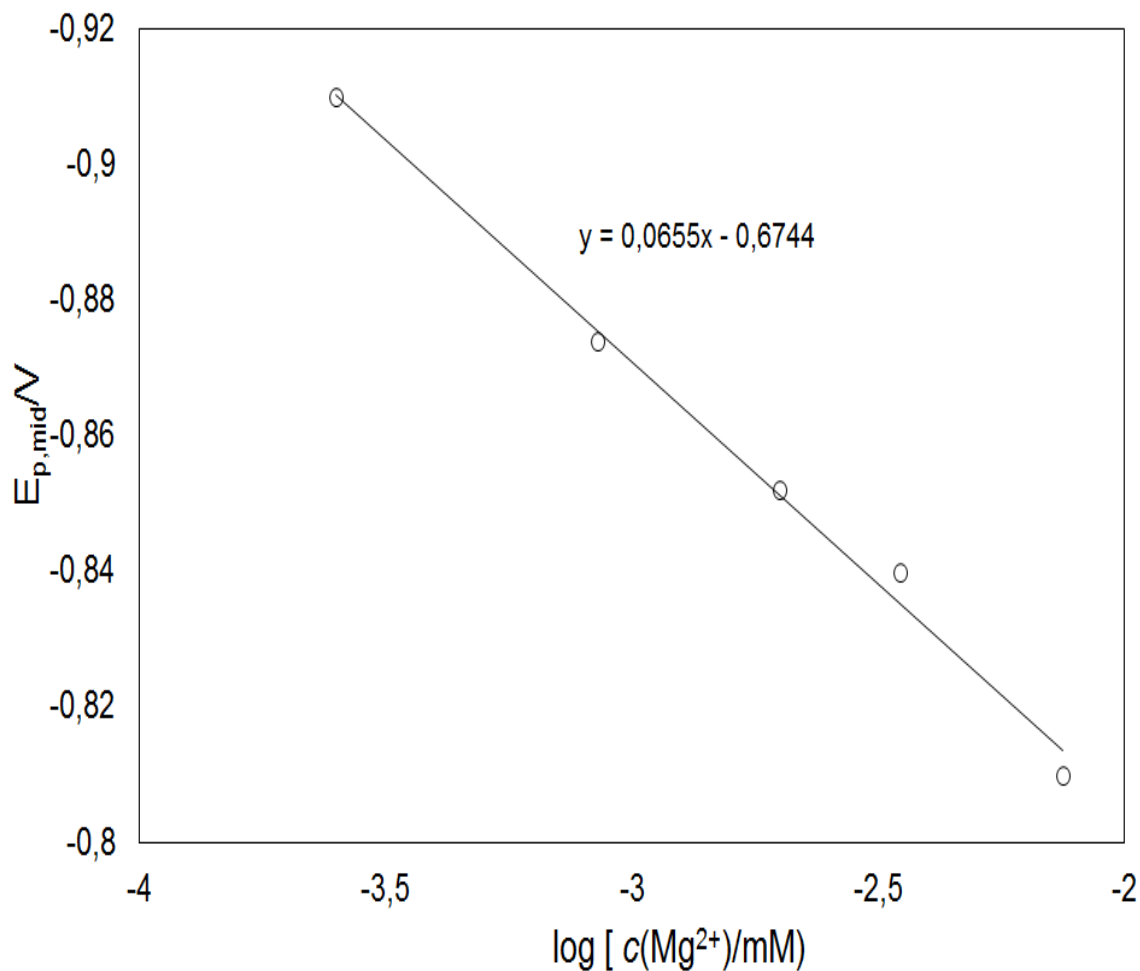
Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија



Слика 38. Зависност на полубрановиот потенцијал ($E_{p,\text{mid}}$) на волтамограмите од 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone од слика 35 како функција од логаритам на моларните концентрации на Ca^{2+} јоните во растворите

Figure 38. Dependence of the half wave potential ($E_{p,\text{mid}}$) of voltammogramite of 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone from figure 35 on the logarithm of the molar concentrations of Ca^{2+} ions in solutions

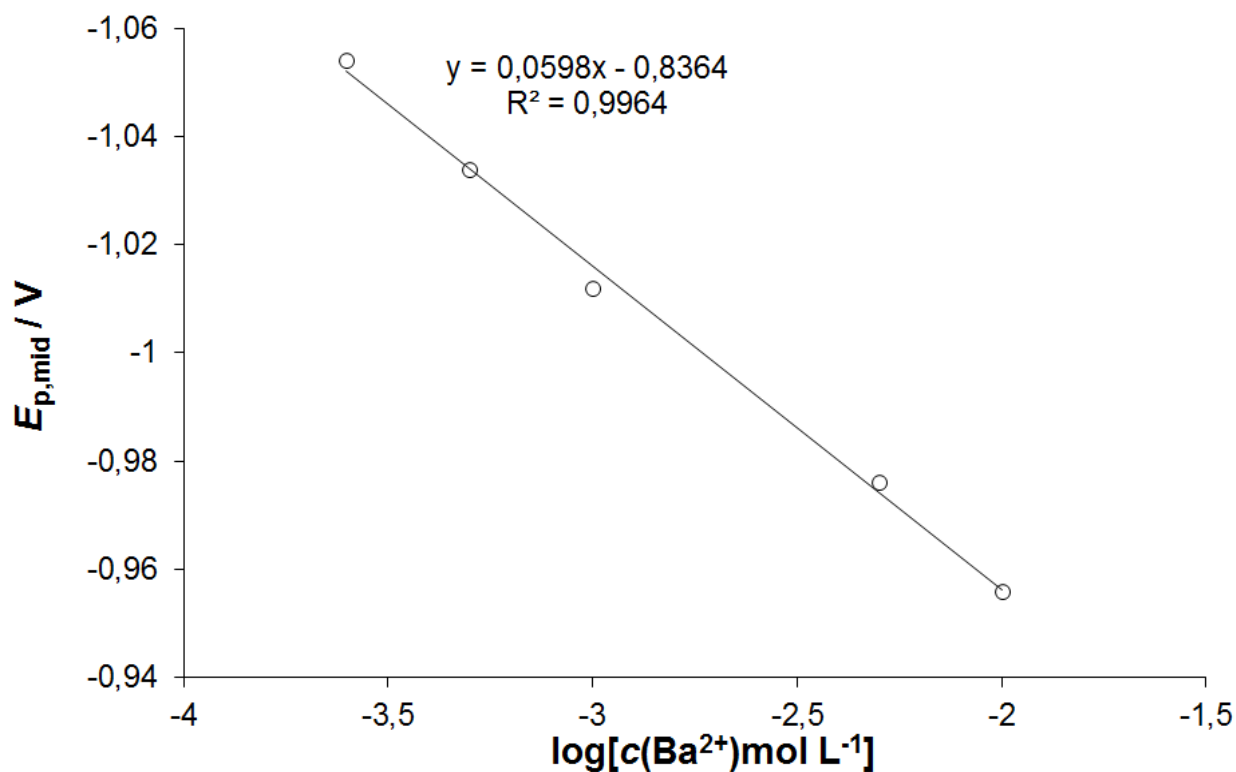
Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија



Слика 39. Зависност на полубрановиот потенцијал ($E_{p,\text{mid}}$) на волтамограмите од 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone од слика 36 како функција од логаритам на моларните концентрации на Mg^{2+} јоните во растворите

Figure 39. Dependence of the half wave potential ($E_{p,\text{mid}}$) of voltammogramite of 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone from figure 36 on the logarithm of the molar concentrations of Mg^{2+} ions in solutions

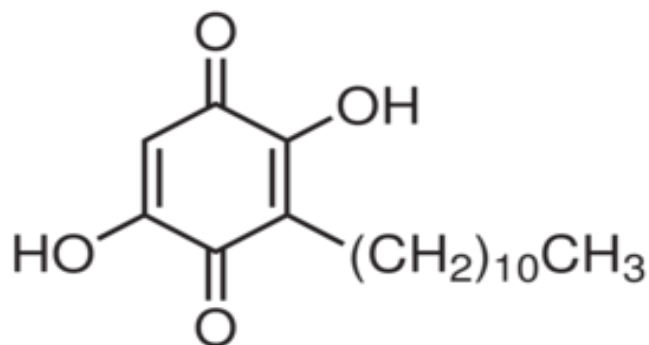
Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија



Слика 40. Зависност на полубрановиот потенцијал ($E_{p,\text{mid}}$) на волтамограмите од 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone од слика 37 како функција од логаритам на моларните концентрации на Ba^{2+} јоните во растворите

Figure 40. Dependence of the half wave potential ($E_{p,\text{mid}}$) of voltammogramite of 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone from figure 37 on the logarithm of the molar concentrations of Ba^{2+} ions in solutions

4.3 Електрохемиски и металокомплексирачки својства на соединението Ембелин (2,5-dihydroxy-3-undecyl-p-benzoquinone)



Слика 41. Ембелин

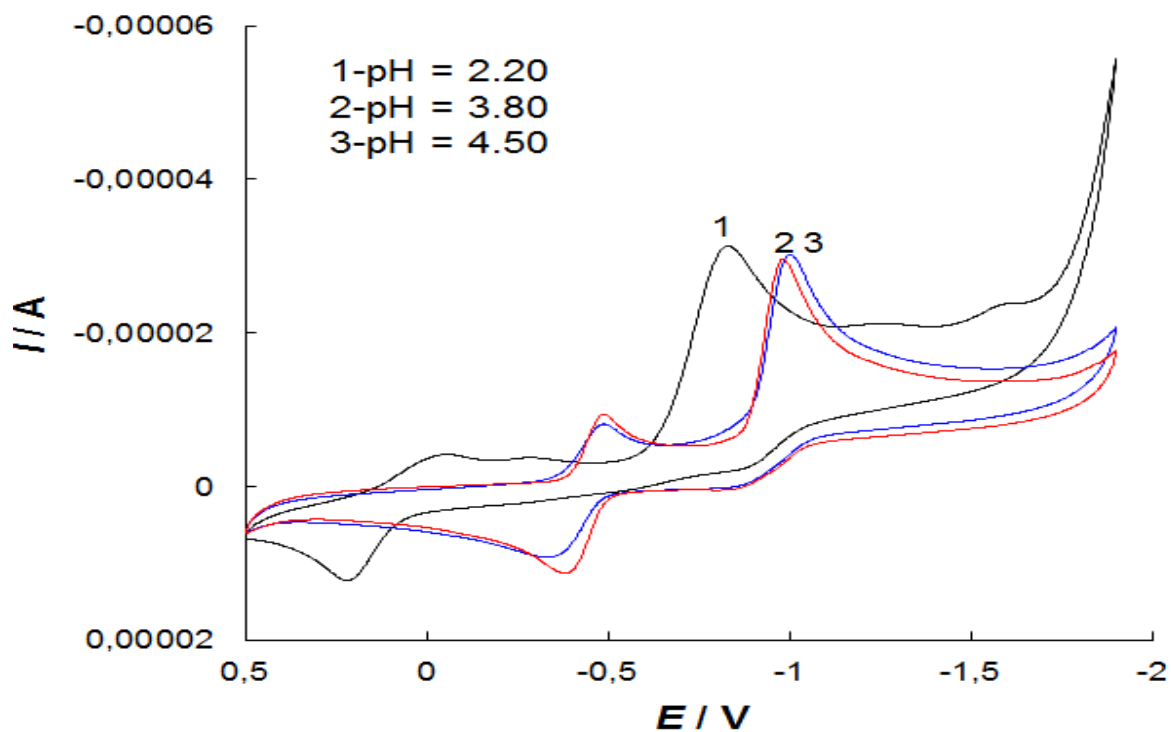
Figure 41. Embelin

Ембелин (2,5-dihydroxy-3-undecyl-p-benzoquinone) е една од главните активни компоненти што е изолирана од соединението *Embelia ribes*. Во литература може да се најде широк спектар на податоци за ова соединение што покажува различни биолошки и физиолошки активности. Така на пример, покажано е дека Ембелинот може да ги неутрализира радикалите од соединението 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH), при што може да ја инхибира деградацијата на деоксирибозата што е индуцирана од хидроксилните радикали (Joshi, Kamat, Mukherjee, 2007). Покрај тоа, покажано е дека Ембелинот може да ја инхибира и пероксидацијата на липидите, а има својство и да го регенерира ензимот Mn-супероксид дисмутаза во митохондриите на црниот дроб (Radhakrishnan, Gnanamani, Mandal, 2011). Соединението Ембелин има и широк спектар на антибактериски, антитуморни и антиоксидативни активности (Radhakrishnan, Gnanamani, Mandal, 2011; Singh, D., Singh, R., Singh, P., Gupta, 2009). Во последно време рапидно е зголемен интензитетот на испитувањата на

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

ова соединение поради неговата потенцијална примена како антиканцерогена супстанција (Xu, Cui, Fu, Proksch, Lin, Li, 2005). Хемиската структура на Ембелин е многу слична со структурата на природниот Коензим Q10 (ubiquinone) и се очекува Ембелинот да има слични својства како и Коензим Q10. За разлика од природниот Коензим Q10, соединението Ембелин има способност да комплексира голем број на јони како Лантанидите (III), Be^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Zr^{4+} , Ru^{3+} , Cd^{2+} , Sn^{2+} , и Cu^{2+} , Sb^{2+} , Tb^{3+} , Pb^{2+} и Bi^{3+} (Radhakrishnan, N et al, 2011). Поради присуството на алкилен страничен ланец во позицијата 5 на бензокинонскиот прстен, соединението Ембелин е тешко растворливо во вода, но добро се раствора во алкохоли и неполарни органски растворувачи. За разлика од соединенијата 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone и 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy-p-benzoquinone кои лесно се раствораат во вода, електрохемиските својства на Ембелинот можат да се студираат само во алкохолна средина или во смеса на алкохол и вода што содржи повеќе од 70% алкохол. Електрохемиските својства на Ембелинот до сега не се познати во литературата. Во електролитен раствор, (алкохол и вода 70:30), Ембелинот дава два пара на квазиреверзибилни сигнали што се осетливи на рН на средината во подрачје на рН од 1 до 6. Процесот на редукција на Ембелинот е следен со протонација на електрохемискиот продукт на реакцијата, при што во актот на електрохемиска трансформација учествуваат 2 електрони и 2 H^+ јони. Како резултат на учеството на H^+ јони во електрохемискиот процес, волтаметриските сигнали на Ембелинот се поместуваат со промена на рН. Притоа, со зголемување на рН доаѓа до поместување на двата сигнали кон понегативни потенцијали (слика 42).

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

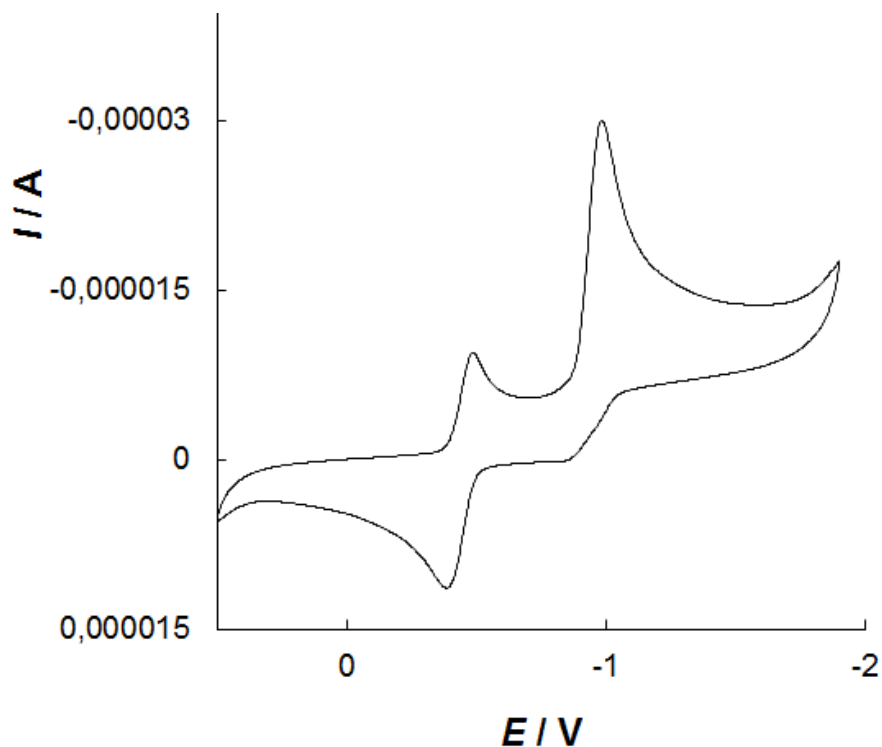


Слика 42. Циклични волтамограми на Ембелин (0.5 mM/L) снимени при брзина на промена на потенцијалот од 50 mV/s во смеша од алкохол:вода (70:30 v/v) како функција од pH на средината.

Figure 42. Cyclic voltammograms of Embelin (0.5 mM/L) recorded at a scan rate of 50 mV/s in a mixture of alcohol:water (70:30 v/v) as a function of pH in the middle

Во раствори со физиолошко pH од околу 7, во волтаметриските одговори на Ембелин се забележуваат два сигнали (слика 43), што е поврзано во помалата киселост на OH групите од Ембелинот ($pK_{a,1} = 4.20$, $pK_{a,2} = 5.70$).

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

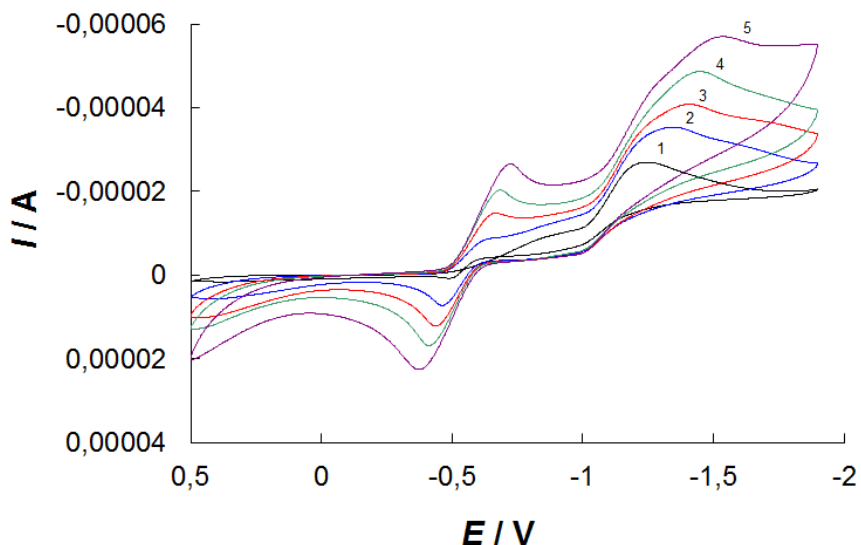


Слика 43. Цикличен волтамограм на Ембелин (0.5 mM/L) снимен при брзина на промена на потенцијалот од 5 mV/s во смеса од алкохол:вода (70:30 v/v) при pH од 7.00.

Figure 43. Cyclic voltammograms of Embelin (0.5 mM/L) recorded at a scan rate of 5 mV/s in a mixture of alcohol:water (70:30 v/v) at pH of 7.00.

Двата процеси во студираниите раствори покажуваат трансфер на маса што е контролиран од дифузијата на Ембелинот. Притоа, струјата на волтаметриските максимуми на двата сигнали зависи линеарно од квадратниот корен на брзината на скенирање (слика 43), што е доказ за дифузиската контрола на процесот на трансфер на маса од растворот кон електродата.

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија



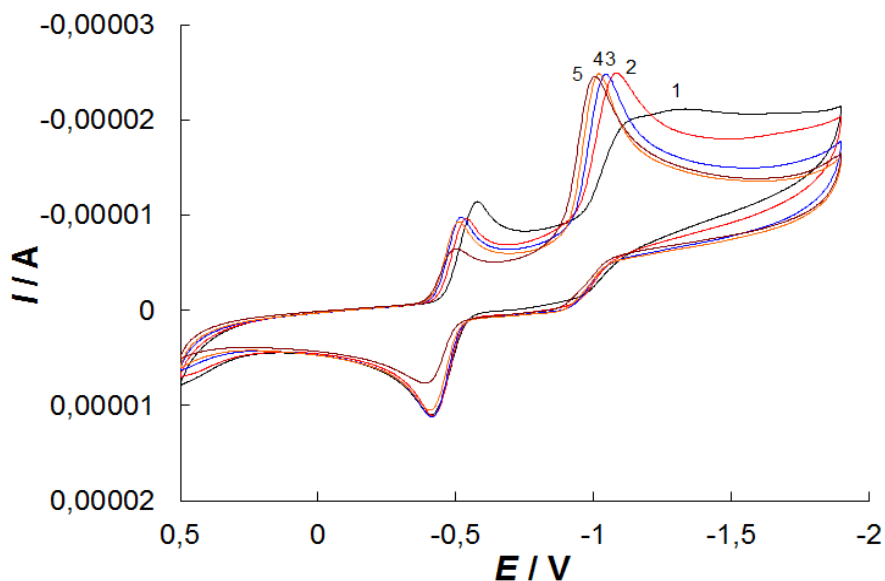
Слика 44. Циклични волтамограми на Ембелин (0.5 mM/L) снимени во смеша од алкохол:вода (70:30 v/v) при pH = 7.00 и при брзини на промена на потенцијалот од 10 (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) и 100 mV/s (5).

Figure 44. Cyclic voltammograms Embelin (0.5 mM/L) recorded in a mixture of alcohol:water (70:30 v/v) at pH=7.00 and at scan rates of 10 (1), 25 (2), 50 (3), 75 (4) and 100 mV/s (5).

Бидејќи комплексите на Ембелинот со јоните на Ca^{2+} не се познати во литературата, нашата идеја беше да се испита потенцијалот на Ембелинот да гради комплекс со јоните на Ca^{2+} во водено-алкохолна средина. Неодамна од Гулабоски и соработниците (Bogeski, Gulaboski et al. 2011) беше покажано дека деривати добиени од соединението Коензим Q10 во алкална средина имаат потенцијал да комплексираат и да трансферираат јони на земноалкални метали преку митохондријални мембрани (Bogeski, Gulaboski, Kappl, Mirceski, Stefova et al., 2011). Бидејќи структурата на Ембелин е многу слична со дериватите што се испитувани во трудот (Bogeski, Gulaboski, Kappl, Mirceski, Stefova et al., 2011), се очекува и Ембелинот да покажува сличен афинитет кон јоните на Ca^{2+} . За таа цел, во електролитен раствор со pH од 7.00 (алкохол и вода во однос 70:30), ја

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

зголемување концентрацијата на Ca^{2+} јоните во растворот, при што го следевме поместувањето на двата сигнали од волтаметрискиот одговор на Ембелинот. Притоа, зголемувањето на Ca^{2+} јоните во растворот беше проследено со поместување на двата волтаметриски сигнали од Ембелин во позитивна насока (слика 44).



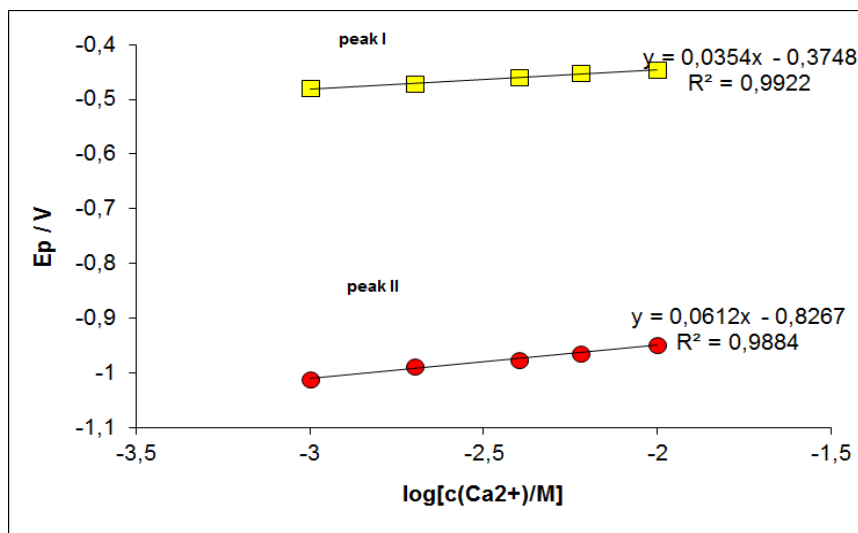
Слика 45. Циклични волтамограми на Ембелин (0.5 mM/L) снимени при брзини на промена на потенцијалот од 50 mV/s во смеса од алкохол:вода (70:30 v/v) при pH = 7.00 и при концентрации на Ca^{2+} јоните од 0 (1), 1 (2), 3 (3), 6 (4) и 10 mmol/L (5).

Figure 45. Cyclic voltammograms Embelin (0.5 mM/L) recorded at scan rates of 50 mV/s in a mixture of alcohol:water (70:30 v/v) at pH=7.00 and at a concentration of Ca^{2+} ions from 0(1), 1 (2), 3 (3), 6 (4) and 10 mmol/L (5).

За разлика од сигналот на понегативни потенцијали, чиј полубранов потенцијал се поместуваше за околу 59 mV/log[c(Ca^{2+} јоните)] (слика 45, peak II, сигналот на попозитивни потенцијали се поместуваше за околу 30 mV со секое десеткратно зголемување на концентрацијата на Ca^{2+} јоните (слика 45, peak I). Тоа имплицира дека кај сигналот на понегативни потенцијали, соединението Embelin е во целосно дисоцирана форма и гради комплекс со Ca^{2+} јоните во однос 1:2,

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

додека сигналот на попозитивни потенцијали е од монодисоцираната форма на Ембелини, таа форма гради комплекс со Ca^{2+} јоните во однос 1:1. Пресметаните константи на стабилност на двете форми на Ембелин со Ca^{2+} јоните изнесуваат: $K_{\text{stab}} = 6 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ L}^3$ за комплексот на целосно дисоцираната форма на Embelin со Ca^{2+} јоните; и $K_{\text{stab}} = 2 \times 10^5$ за комплексот на монодисоцираната форма на Ембелин со Ca^{2+} јоните. Очигледно, константите на стабилност на Ембелин со Ca^{2+} јоните се многу помали од тие на 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone и 2,3,5-trihydroxy-p-benzoquinone со јоните на земноалкалните метали. Како главна причина за тоа се стерните пречки што доаѓаат од присуството на долгиот алифатичен ланец во структурата на Ембелинот, што создава еден вид бариера при формирањето на комплексите на Ембелин со јоните на земноалкалните метали.



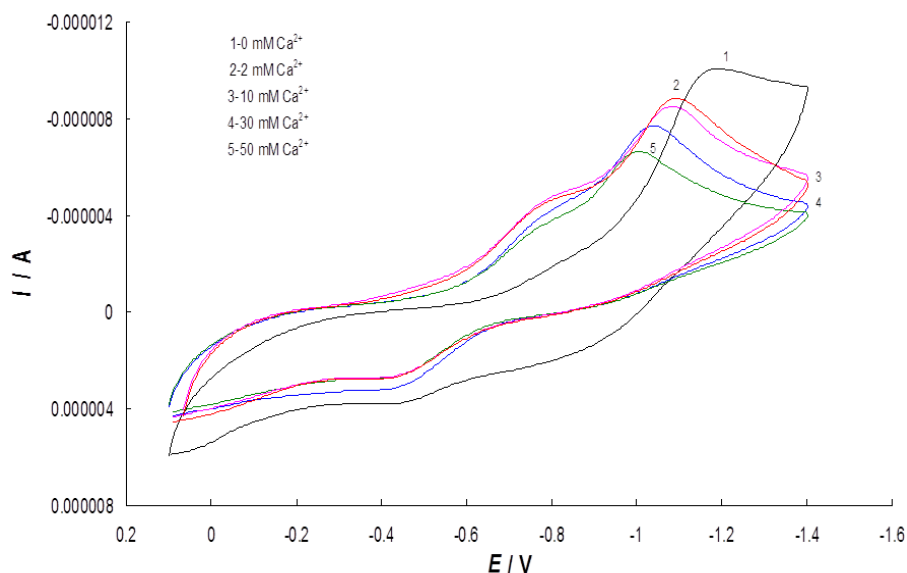
Слика 46. Зависност на полубрановите потенцијали ($E_{p, \text{mid}}$) на сигналите од волтамограмите на Ембелин од слика 37 како функција од $\log[c(\text{Ca}^{2+} \text{ јоните})]$

Figure 46. Dependence of the half wave potentials ($E_{p, \text{mid}}$) signals from voltammogramite Embelin of figure 37 on $\log[c(\text{Ca}^{2+} \text{ ions})]$

Покрај способноста на Ембелинот да гради комплекси со Ca^{2+} јоните, во експерименти со т.н. електрода модифицирана со органски филм, ние покажавме

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

дека ова соединение е способно да трансферира Ca^{2+} јони преку вештачки органски мембрани. За таа цел, соединението Ембелин беше растворено во органски растворувач (дихлоретан) во кој имаше растворено и органска база што предизвикуваше дисоцијација на Ембелин во органската фаза. Тенок филм од овој раствор беше нанесен на површината од работната електрода и потоа електродата беше вронета во воден раствор со различна концентрација на Ca^{2+} јони. Притоа, електрохемиската редукција на Ембелин во тенкиот органски филм беше проследена со трансфер на Ca^{2+} јоните од водата кон органската фаза. Тоа беше отсликано преку промената на положбата на сигналот од Ембелинот со зголемување на концентрацијата на Ca^{2+} јоните во водената фаза (слика 47).



Слика 47. Циклични волтамграмина Embelin (0.25 mM/L) растворен во органски растворувач дихлоретан чиј раствор е потоа нанесен во форма на тенок филм врз работната електрода што последователно е вронета во водени раствори што содржат различни концентрации на Ca^{2+} јоните.

Figure 47. Cyclic voltammograms of Embelin (0.25 mM/L) dissolved in organic solvent dichloroethane whose solution is then applied in the form of a thin film on the working electrode was subsequently immersed in an aqueous solution containing different concentrations of Ca^{2+} ions.

4.4 Антиоксидативни својства на соединенијата 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy-p-benzoquinone, 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone и Ембелин

Антиоксидантите присутни во храната играат важна улога како фактор на заштитата на здравјето на луѓето. Постојат силни научни докази дека антиоксидантите го намалуваат ризикот од хронични заболувања, како што се канцерогените и срцевите заболувања. Примарен извор на природни антиоксиданти се интегралните житарици, овошјето и зеленчукот. Растенијата се извор на важни антиоксиданти во храната како витамин С, витамин Е, каротени, фенолните киселини и сл. Главна карактеристика на сите антиоксиданти е да ги „ловат“ штетните слободни радикали. Слободните радикали често предизвикуваат иреверзибилни физиолошки оштетувања на ДНА, РНА, фосфолипидите и сл., што доведува до развој на голем број дегенеративни болести. Меѓутоа, не сите антиоксиданти имаат иста способност за намалување на штетните ефекти од слободните радикали. Галатите на пример, (соли на галната киселина) се силни антиоксиданти што се присутни во храната од растително потекло, додека фенолите што содржат една ОН група во својата структура се слаби антиоксиданти (Wanasundara, Shahidi, 2005). Општо земено, колку е поголем бројот на ОН групите во структурата на едно фенолно или органско соединение што е антиоксидант, толку е поголема неговата антиоксидативна способност. Постојат голем број на клинички студии каде е покажано дека антиоксидантите присутни во овошјето, зеленчукот, чајот и црвеното вино директно влијаат врз сузбивањето на различни хронични заболувања. Дејството на антиоксидантите врз неутрализацијата на слободните радикали е детално проучувано и претставено во трудовите на Miller и Rigelhof со соработниците (Miller, Rigelhof, Marquart, Prakash, Kanter, 2000; Miller, Rigelhof, Marquart, Prakash, Kanter, 2000).

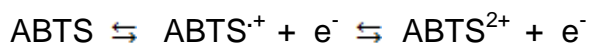
Денес се развиени голем број на аналитички методи за определување на антиоксидативните активности во храната. Голем број од методите се базираат на техниката Електронска Парамагнетна Резонанца (EPR) која има својство да ги

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

мери активностите на слободните радикали (Powis,1989). Во присуство на антиоксиданти, се намалува активноста на слободните радикали, а со тоа се намалува и интензитетот на сигналите од радикали при мерењата со Електронска Парамагнетна Резонанца. Сепак, овие методи се доста скапи и бараат добро познавање на теоријата на Електронската Парамагнетна Резонанца, а со нив треба да ракуваат добро обучени аналитичари. Голем број од аналитичките методи за определување на антиоксидативните способности на дадени соединенија се базираат на споредување на антиоксидативна активност на испитуваните соединенија со антиоксидативните активности на некој познат антиоксидант. Методите вклучуваат мерење на антиоксидативните активности на испитуваните соединенија врз слободни радикали како што се 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) радикалот, радикалот на супероксидниот анјон ($\cdot\text{O}^{2-}$), хидроксил радикалот ($\cdot\text{OH}$), или пероксил радикалот ($\text{ROO}\cdot$). Една од најупотребуваните методи за мерењето на антиоксидативниот потенцијал на голем број антиоксиданти е методата со 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Соединението DPPH се употребува интензивно за тестирања каде се мери антиоксидативната способност на дадена супстанца или на храната. Оваа метода се употребува за квантификација на антиоксидантите не само во храна, туку и во комплексни биолошки примероци.

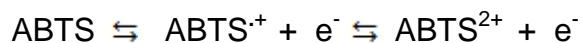
Неодамна, Гулабоски и соработниците (Gulaboski, Mirceski, Mitrev, 2013) објавија труд каде е претставен нов едноставен електрохемиски метод за определување на антиоксидативниот капацитет во храна и хранливи производи со употреба на соединението ABTS [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]. ABTS може (хемиски или електрохемиски) да се конвертира во катјонски радикал и притоа на едноставен начин може да се следи антиоксидативната активност на голем број антиоксиданти како витамин С, глутатјон, феноли или флавоноиди. Електрохемиската реакција на претворање на ABTS во катјонски радикал се одвива во два чекори и тоа:

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија



Во првиот електрохемиски чекор на оваа реакција се формира монокатјонски радикал на ABTS, а во вториот чекор се формира 2+ катјонски радикал на ABTS. Притоа, и двата радикали можат да бидат редуцирани со помош на соединенијата испитувани во оваа магистерска работа (2,3,5-trihydroxy-6-methoxy-p-benzoquinone, 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone и Ембелин). За споредба на антиоксидативната активност на испитуваните соединенија, како референтен антиоксидант беше употребено соединението Витамин С. Притоа, антиоксидативната активност на 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy-p-benzoquinone, 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone и Ембелин, е изразена во однос на антиоксидативната способност на Витаминот С.

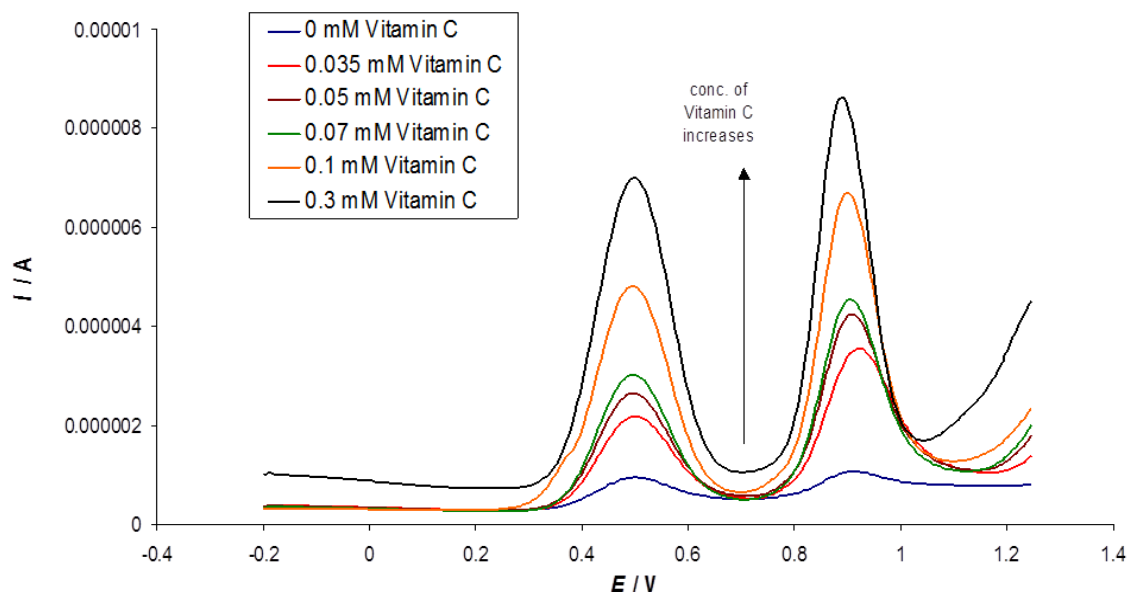
За мерење на антиоксидативниот потенцијал (или антиоксидативната способност) на 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy-p-benzoquinone, 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone и Ембелинот беше користена техниката квадратно-бранова волтаметрија (square-wave voltammetry-SWV). Во водени (или водено-алкохолни раствори), соединението ABTS може електрохемиски да се оксидира, при што на волтамограмите се јавуваат два реверзибилни волтаметриски сигнали како резултат на следните електрохемиски реакции:



Првиот сигнал на потенцијали од околу +0.5 V е од оксидацијата на ABTS до $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (монокатјонски радикал на ABTS) додека вториот сигнал на околу +0.9 V е од оксидацијата на $\text{ABTS}^{\cdot+}$ до ABTS^{2+} (дикатјонски радикал на ABTS). И двата сигнали се контролирани од дифузијата на ABTS електрохемиски активните компоненти, при што покажуваат стабилност во период од 8 дена. Во присуство на антиоксидантот Витамин С, двата волтаметриски сигнали од ABTS покажуваат промени. Притоа, доаѓа до пропорционално растење на двата сигнали со

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

зголемувањето на концентрацијата на Витамин С (слика 49). Растењето на двата волтаметриски сигнали од ABTS во присуство на антиоксидантот Витамин С е во согласност со таканаречениот „електрохемиски регенеративен (каталитички) механизам“ (Gulaboski, Kokoskarova, Mitrev, 2012).



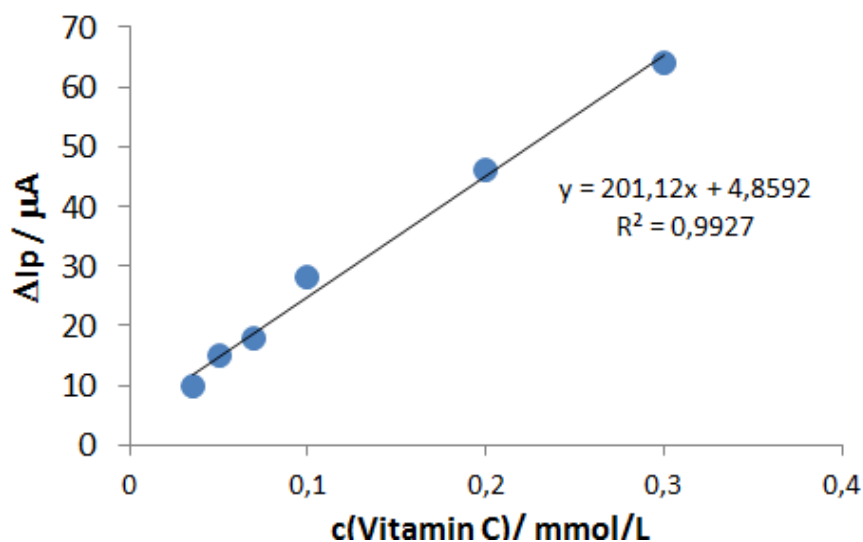
Слика 49. Квадратно-бранови волтамограми на ABTS (0.05 mmol/L) снимени во фосфатен пуфер со pH = 7.00 при фреквенција од 10 Hz и при различни концентрации на витамин С

Figure 49. Square-wave voltammograms of ABTS (0.05 mmol/L) recorded in phosphate buffer with pH=7.00 at a frequency of 10 Hz in presence of several concentrations of vitamin C

Зголемувањето на концентрацијата на витамин С доведува до редукција на радикалните честички $ABTS^{\cdot+}$ и $ABTS^{\cdot 2+}$ во текот на мерењето на струјата во употребената техника, при што се случува хемиска регенерација на електроактивната редуцирана компонента вклучена во соодветната електрохемиска реакција. Овој феномен доведува до повеќекратно искористување на електроактивниот материјал во текот на мерењето на струјата во електрохемиската техника, а со тоа се зголемува и струјата на соодветните волтаметриски одговори. Дополнителен феномен карактеристичен за

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

електрокаталитичкиот регенеративен механизам е и зголемувањето на струите што се јавуваат на крајот од волтамограмите на потенцијали што се повеќе позитивни од тие на кои се јавуваат волтаметриските пикови на слика 46 (Gulaboski, Kokoskarova, Mitrev, 2012). Струјата на волтаметриските сигнали на двете електрохемиски реакции на слика 49 се зголемуваат пропорционално со зголемување на концентрацијата на витамин С. Разликите на струите на пиковите измерени во присуство на витамин С и на волтаметрискиот пик на ABTS снимен во отсуство на витамин С (кривата со најниска струја на слика 49), претставени како функција од концентрацијата на витамин С во суб-милимоларно концентрационо подрачје даваат доста добра линеарна зависност со вредност на коефициентот на корелација $R^2 > 0.99$ (слика 50).



Слика 50. Зависност на разликите на струите на пиковите измерени во присуство на витамин С и на волтаметрискиот пик на ABTS снимен во отсуство на витамин како функција од концентрацијата на витамин С во растворот. Податоците се однесуваат за пикот што се јавува на +0.5 V на слика 49.

Figure 50. Dependence of the differences of the currents of the peaks measured in presence of vitamin C and peaks ABTS recorded in absence of vitamin C as a function of the concentration of vitamin C in solution. Data refer to the peak that occurs +0.5 V at Figure 49.

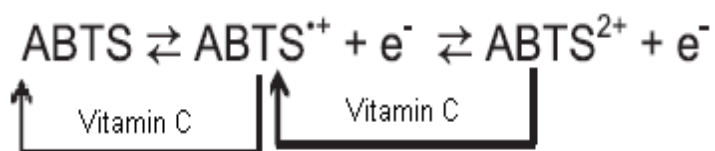
Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

Равенката на линеарната права на слика 50 е:

$$\Delta I_p = 201.12 \mu\text{A L mol}^{-1} \cdot c(\text{vitamin C}) + 4.859 \mu\text{A}.$$

Оваа равенка беше употребена за пресметување на антиоксидативниот потенцијал на другите испитувни компоненти во оваа магистерска работа.

Регенеративниот електрокаталитички механизам на ABTS^+ и ABTS во присуство на витамин С може да се претстави со следната шема:



Во слично сценарио, како погоре опишаното, при регенеративниот електрокаталитички механизам на ABTS во присуство на витамин С, беше определен и антиоксидативниот потенцијал на испитуваните соединенија 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy-p-benzoquinone, 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone и Embelin.

При испитувањето на антиоксидативниот потенцијал на 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy-p-benzoquinone и 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone беше користен фосфатен пуфер со $\text{pH} = 7.00$, додека во случајот на Ембелин беше употребен раствор од метанол и фосфатен пуфер во однос 70:30 (v/v). Притоа, во сите случаи покажавме дека испитуваните соединенија во оваа магистерска работа (2,3,5-trihydroxy-6-methoxy-p-benzoquinone, 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone и Ембелин) можат да ги редуцираат катјонските радикали на ABTS , при што се забележуваа промени на волтаметриските одговори на ABTS типични за електрохемискиот регенеративен механизам (слики 51, 52 и 53).

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

Пресметаните вредности за антиоксидативната способност на 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy-p-benzoquinone, 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone и Ембелин изнесуваа:

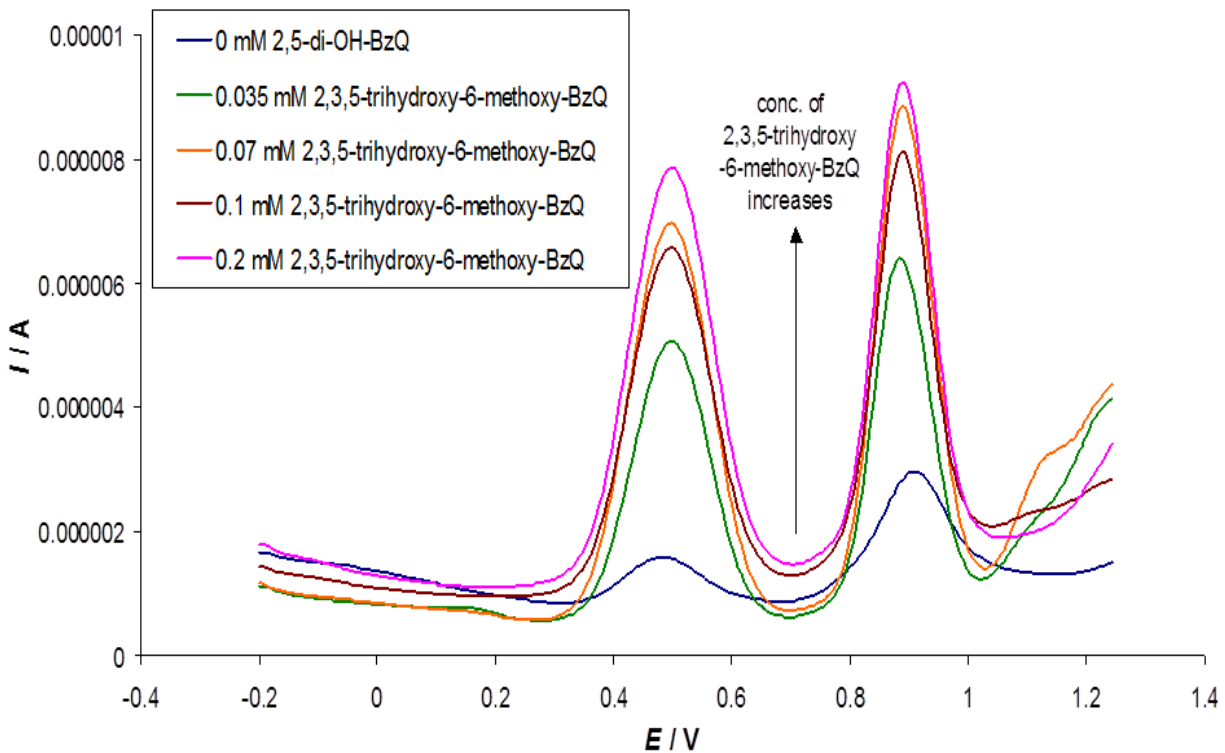
1. **0.78** (за 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy-p-benzoquinone);
2. **0.64** (за 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone) и
3. **0.74** (за Ембелин)

Сите вредности за антиоксидативните способности се изразени во однос на антиоксидативната способност на витамин С, а се пресметани од равенката на правата на слика 50.

Според пресметаните вредности, сите испитувани супстанции имаат слични вредности за антиоксидативниот капацитет, и се многу блиски до антиоксидативниот капацитет на витаминот С.

Највисока вредност за антиоксидативниот капацитет има соединението 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy-p-benzoquinone. Присуството на дополнителна ОН група во структурата на ова соединение (во однос на другите две соединенија) придонесува за поголемата антиоксидативна активност на ова соединение. Ембелинот исто така има висока вредност за антиоксидативниот капацитет, што е малку необично поради присуството на долг алифатичен синџир во неговата структура што најчесто влијае врз ефектот на ОН групите. Сепак, треба да се има предвид дека антиоксидативниот капацитет на Ембелин, за разлика од другите две соединенија, е мерен во друга средина (вода+алкохол) и тоа е најверојатно една од причините за неговиот висок антиоксидативен капацитет.

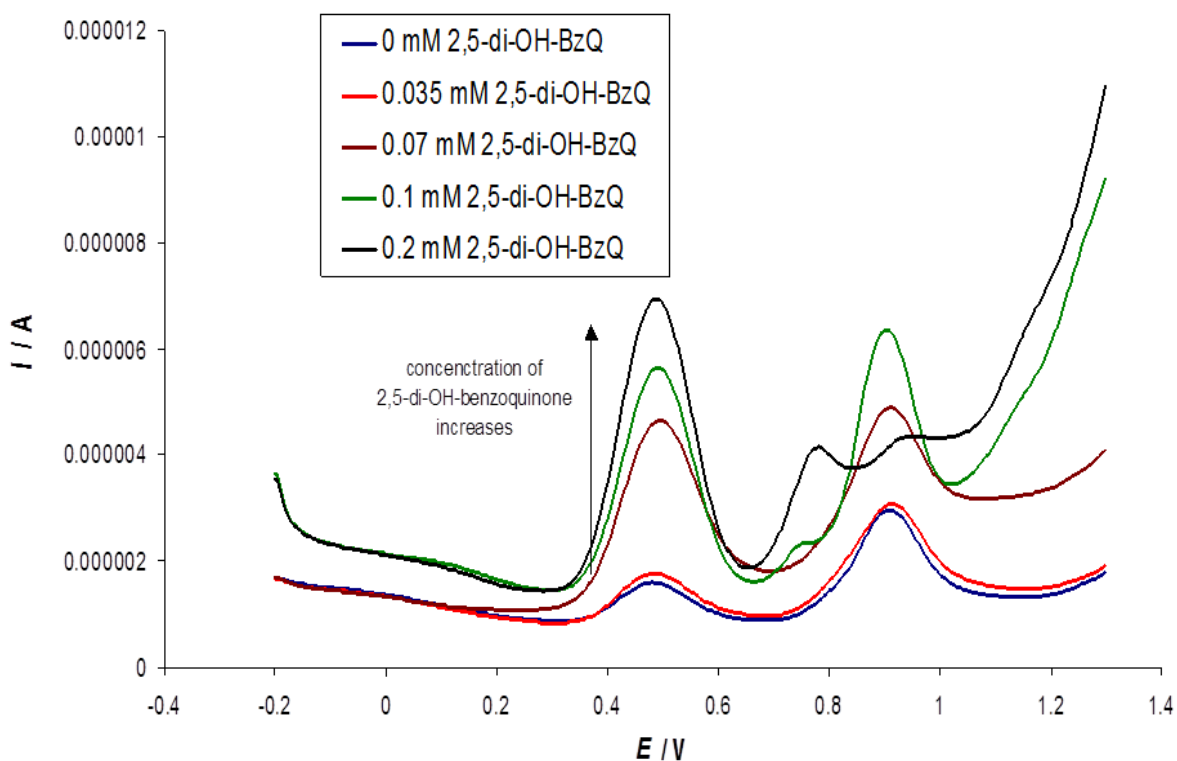
Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија



Слика 51. Квадратно-бранови волтамограми на ABTS (0.05 mmol/L) снимени во фосфатен пуфер со pH = 7.00 при фреквенција од 10 Hz и при различни концентрации на 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy-p-benzoquinone.

Figure 51. Square-wave voltammograms of ABTS (0.05 mmol/L) recorded in phosphate buffer with pH=7.00 at a frequency of 10 Hz and at different concentrations of 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy-p-benzoquinone

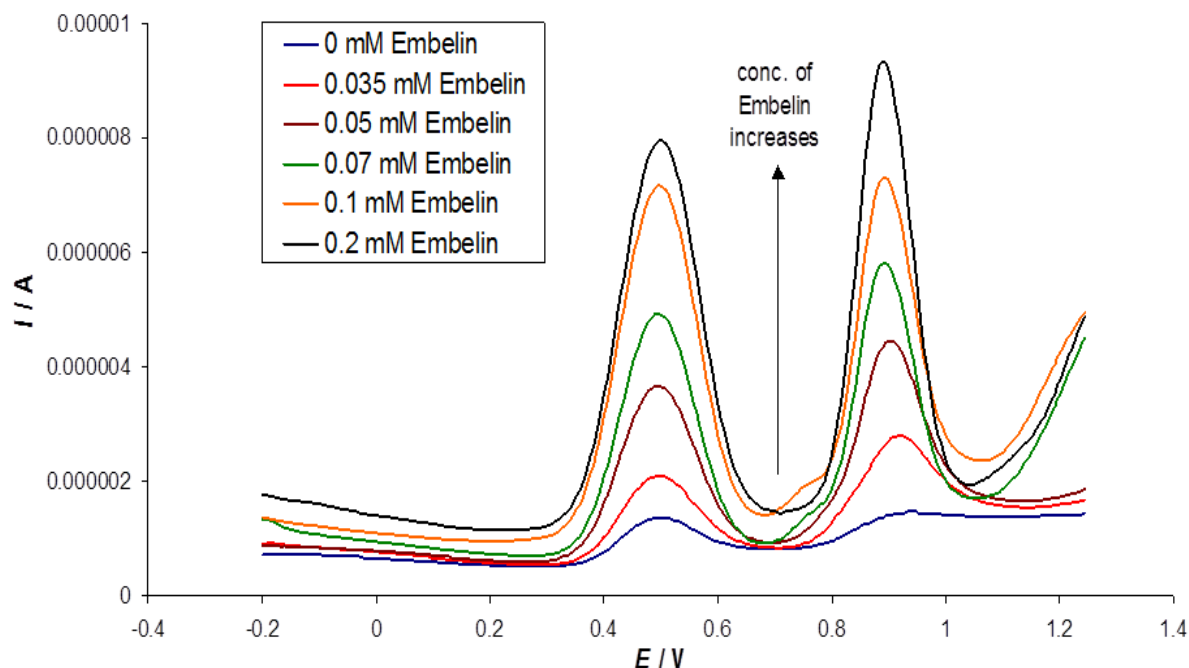
Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија



Слика 52. Квадратно-бранови волтамограми на ABTS (0.05 mmol/L) снимени во фосфатен пуфер со pH = 7.00 при фреквенција од 10 Hz и при различни концентрации на 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone (di-OH-BzQ).

Figure 52. Square-wave voltammograms of ABTS (0.05 mmol/L) recorded in phosphate buffer with pH=7.00 at a frequency of 10 Hz and at different concentrations of 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone (di-OH-BzQ).

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија



Слика 53. Квадратно-бранови волтамограми на ABTS (0.05 mmol/L) снимени во смеса (70:30 v/v) од метанол и фосфатен пуфер со pH = 7.00 при фреквенција од 10 Hz и при различни концентрации на Ембелин.

Figure 53. Square-wave voltammograms of ABTS (0.05 mmol/L) recorded in a mixture (70:30 v/v) of methanol and phosphate buffer with pH = 7.00 at a frequency of 10 Hz and at different concentrations Embelin.

На слика 54 е дадена споредба на бојата на растворите на радикалите на ABTS во отсуство и во присуство на 1 mmol/L 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy-p-benzoquinone. Како што може да се забележи, во присуство на 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy-p-benzoquinone зелената боја што потекнува од присуството на 2+ катјонскиот радикал на ABTS комплетно се губи и растворот станува безбоен, што е индикатор за способноста на 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy-p-benzoquinone да дејствува како антиоксидант и да ги неутрализира штетните радикални честички. Слични ситуации на промена на бојата на растворите на радикалите од ABTS беа потврдени и со другите две студирани компоненти (2,5-dihydroxy-p-benzoquinone и

5. ЗАКЛУЧОК

Во рамките на оваа магистерска работа беа испитувани електрохемиските, комплексобразувачките и антиоксидативните својства на три природни соединенија што по хемиски состав се хидрокси-р-бензокинони и тоа: 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy-p-benzoquinone, 2,5-dihydroxy-p-benzoquinone и Ембелин;

- Сите соединенија даваат хемиски реверзибилни процеси во водени раствори што се делумно осетливи на рН на средината;
- Електрохемиските процеси на сите испитувани соединенија беа контролирани од процесот на нивната дифузија, од растворите кон површината на работната електрода;
- Сите соединенија имаа способност да комплексираат земноалкални метални јони (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} и Ba^{2+}) со различен афинитет;
- Сите соединенија се умерено силни антиоксиданти и нивната антиоксидативна способност е споредлива со таа на витамин С;
- Сите испитувани соединенија имаат потенцијал да бидат употребени како антиоксиданти во хранливи продукти. Поради неговата добра растворливост во масти и масла, соединението Ембелин може да се употреби како антиоксидант (адитив) во масла од животинско потекло со висока содржина на масти;

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

- Соединението Ембелин има способност и да пренесува јони на калциум низ биолошки мембрани, што е од особена важност за преносот на овие физиолошки важни јони преку мембраните во живите системи;
- Покажано е дека соединението 2,3,5-trihydroxy-6-methoxy-p-benzoquinone има способност ефикасно да ги неутрализира штетните радикали произведени во живи клетки (моницити), (Gulaboski, Vogeski, Mirceski, et al., 2013). Овој ефект е доста важен за нивната употреба бидејќи испитуваните соединенија немаат штетни дејства по живите организми и може да имаат заштитна улога во живите системи.

6. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

1. Bentinger, M., Brismar, K., Dallner, G., (2007). "The antioxidant role of coenzyme Q", *Mitochondrion* 7 S41-S50.
1. Bogeski, I., Gulaboski, R., Kappl, R., Mirceski, V., Stefova, M., et al., (2011). "Calcium binding and transport by coenzyme Q". *J Am Chem Soc* 133, 9293-9303.
2. Crane, F. L., (2001). Biochemical Functions of Coenzyme Q10. *J. Am. Coll. Nutr.* 20591-598.
3. DeFord, D., and Hume, D. N., (1951). "Voltammetric determination of stability constants of metal-ligand complexes" *J. Am. Chem. Soc.* 73,5321–5322.
4. Gulaboski, R., Bogeski, I., Mirčeski, V., Saul, S., Pasička, B., Haeri, H. H., Stefova, M., Petreska Stanoeva, J., Mitrev, S., Hoth, M., Kappl, R., (2013). "Hydroxylated derivatives of dimethoxy-1,4-benzoquinone as redox switchable earth-alkaline metal ligands and radical scavengers" (submitted to *Free Radicals in Biology and Medicine*).
5. Gulaboski, R., Bogeski, I., Mirceski, V., et al., (2013). *Scientific Reports (Nature)* 3, 1-8
6. Gulaboski, R., Mirceski, V., Mitrev, S., (2013). "Development of a rapid and simple voltammetric method to determine the total antioxidative capacity of edible oils" *Food Chemistry* 138, 116–121.
7. Gulaboski, R., Kokoskarova, P., Mitrev, S., (2012). "Theoretical aspects of several successive two-step redox mechanisms in protein-film cyclic staircase voltammetry" *Electrochimica Acta* 69, 86-96.
8. Gulaboski, R., Bogeski, I., Kappl, R., Hoth, M., ((2011) "*Benzoquinone-based antioxidants*" (*European Union Patent*), EP 2 332 898 A1.
9. James, A. M., Smith, R. A. J., Murphy, M. P.,(2004). "Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q", *Arch. Biochem. Biophys.* 423, 47-56.

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

10. Joshi, R., Kamat, J. P., Mukherjee, T., (2007). "Free radical scavenging reactions and antioxidant activity of embelin: Biochemical and pulse radiolytic studies" *Chemico-Biological Interactions*, 167, 125-134.
11. Lester, R. L., Crane, F. L., (1958). "Natural Occurrence of Coenzyme-Q and Related Compounds", *J. Biol. Chem.* 234 2169-2175.
12. Lown, J. W., (1983), "The mechanism of action of quinone antibiotics", *Molecular and Cellular Biochemistry* 55, 17-40;
13. Miller, H. E., Rigelhof, F., Marquart, L., Prakash, A., Kanter, M., (2000). *Cereal Foods World* 45, 59-63.
14. Miller, H.E., Rigelhof, F., Marquart, L., Prakash, A., Kanter, M., (2000). *J. Am. Coll. Nutr.* 19, 312S-319S.
15. Morton, R. A., (1965). *Biochemistry of quinones*, Academic Press, London.
16. Mostafa, S. I., (1999). "Complexes of 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone and chloranilic acid with second and third row transition elements", *Transition Met. Chem.* 24, 306-310.
17. Powis, G., (1989). "Free radical formation by antitumor quinones" *Free Radical in Biology and Medicine* 6, 63-101.
18. Quan, M., Sanchez, D., Wasylkiw, M. F., Smith, D. K., (2007). "Voltammetry of quinones in unbuffered aqueous solution: reassessing the roles of proton transfer and hydrogen bonding in the aqueous electrochemistry of quinones" *J Am Chem Soc* 129, 12847-12856.
19. Rich, P. R., (1981). "Electron transfer reactions between quinols and quinones in aqueous and aprotic media", *Bba-Bioenergetics*, 637, 28-33.
20. Radhakrishnan, N., Gnanamani, A., Mandal, A. B., (2011). "A potential antibacterial agent Embelin, a natural benzoquinone extracted from *Embelia ribes*" *Biology and Medicine*, 3, 1-7;

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

21. Singh, D., Singh, R., Singh, P., Gupta, R. S., (2009). "Effects of Embelin on Lipid Peroxidation and Free Radical Scavenging Activity against Liver Damage in Rats", *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, (105), 243–248.
22. Singh, O., Singh, K., Bajju, G. D., (2002). *International journal of nature and science* 3, 646-650.
23. Thomson, R. H., (1985). *Naturally occurring quinones III: Recent Advances*, Chapman and Hall.
24. Turnen, M., "Biosynthesis of Coenzyme Q10", (2004). *Biochimica et Biophysica Acta* 1660, 171-199.
25. Wanasundara, P. K., Shahidi, F., (2005). *Antioxidants, Science, Technology and Applications*, Wiley & Sons.
26. Xu, M., Cui, J., Fu, H., Proksch, P., Lin, W., Li, M., (2005). "Embelin derivatives and their anticancer activity through microtubule disassembly", *Planta Medica* 71, 944-948.

Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија

Елеонора Арсевска

**Антиоксидативни и металокомплексирачки својства на некои природни
хидрокси бензокинонски соединенија**

Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип