

ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET ANTRAHINONA IZ BILJKE *RUBIA CORDIFOLIA LINN*

Žiko Milanović^{1,2}, Marko Antonijević^{1,2}, Ana Kesić¹, Dušan Dimić³, Jelena Dorović Jovanović¹

Izvod: U ovoj studiji je korišćenjem DFT metode procenjen antioksidativni i antiradikalni kapacitet antrahinona iz biljke *Rubia cordifolia Linn.* Određeni su termodinamički najpovoljniji reakcioni putevi antioksidativnih mehanizama, kao i najpovoljniji antiradikalni reakcioni mehanizmi za deaktivaciju metilperoksilnog i metoksi radikala. Izračunavanja su urađena u gasnoj fazi. Pokazano je da je HAT termodinamički najpovoljniji mehanizam antioksidativnog delovanja ispitivanih antrahinona, dok je najverovatniji mehanizam deaktivacije metilperoksilnog i metoksi radikala u gasnoj fazi SPLET mehanizam.

Ključne reči: antrahinoni, DFT, antioksidativna aktivnost, antiradikalna aktivnost

Uvod

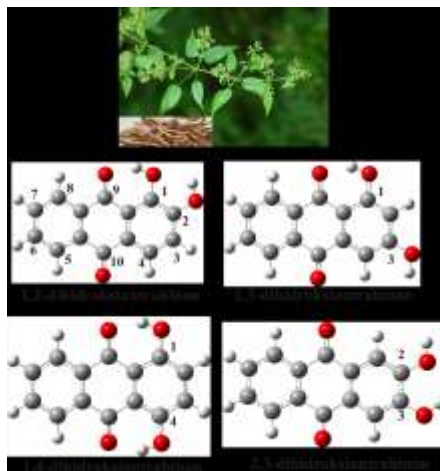
Antioksidanati su jedinjenja koja su našla primenu u mnogim oblastima, pa i u prehrambenoj tehnologiji. Glavni zadatak antioksidanata u prehrambenoj tehnologiji je zaustavljanje lančanog procesa kvarenja hrane izazvanog prisustvom slobodno-radikalnih vrsta. Iako sintetički antioksidanti okupiraju tržište, dosta pažnje se posvećuje testiranju i upotrebi prirodnih antioksidanata. U grupi jedinjenja koja pokazuju antioksidativnu i antiradikalnu aktivnost mnogo je onih sa antrahinonskim jezgrom u svojoj strukturi. Veliki broj prirodnih antrahinona izolovan je upravo iz biljnih ekstrakata. Primena ovih biljnih ekstrakata zastupljena je u tradicionalnoj medicini nekih naroda (Cai i sar., 2004). *Rubia cordifolia Linn*, biljka u narodu poznata kao indijski broć, je višegodišnja zeljasta biljka iz porodice kafa, vrlo dugačkih korena, tanke kora crvene boje (Singh, 2005). Poznato je da biljke iz ove porodice sadrže značajne količine antrahinona, posebno u korenu biljke (Thomson, 1971; Williams 2002). Antrahinoni iz porodice *Rubiaceae* pokazuju neke zanimljive biološke aktivnosti poput antimikrobnih, antimikotičkih, hipotenzivnih, analgetskih, antimalarijskih, antioksidativnih, itd (Singh, 2005). Pored svoje lekovite vrednosti, ova biljka je našla primenu kao prirodna boja za hranu i kao prirodna boja za kosu (Samatha i Vasudevan, 1996). U ovom radu opisano je teorijsko ispitivanje antioksidativne i antiradikalne aktivnosti četiri antrahinona identifikovana u biljci *Rubia cordifolia Linn*: 1,2-dihidroksiantrahinon (alizarin, 1,2-DHA), 1,3-dihidroksiantrahinon

¹Univerzitet u Kragujevcu, Institut za informacione tehnologije, Jovana Cvijića bb, Kragujevac, Srbija (ziko.milanovic@pmf.kg.ac.rs);

²Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Srbija.

³Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju, Studentski trg 12, Beograd, Srbija.

(ksantopurpurin, 1,3-DHA), 1,4-dihidroksiantrahinon (kvinizarin, 1,4-DHA) i 2,3-dihidroksiantrahinon (2,3- DHA)(Slika 1).



Slika 1. Biljka *Rubia cordifolia* Linn ; Optimizovana strukture ispitivanih jedinjenja i njihova numeracija
 Figure 1. The plant *Rubia cordifolia* Linn; Optimized structure of examined compounds and their labelling

Postoji veliki broj antioksidativnih mehanizama putem kojih jedinjenja mogu iskazati svoj antioksidativni kapacitet (Galano i sar., 2016). U ovoj studiji ispitana su tri mehanizma antioksidativnog delovanja, kao i mogućnost inaktivacije slobodno-radikalskih vrsta. Kao model sistemi slobodno-radikalskih vrsta upotrebljeni su metilperoksilni (1) i metoksi (2) radikal. Prvi od ispitivanih antioksidativnih mehanizama je kao HAT mehanizam (Hydrogen Atom Transfer), i on je okarakterisan homolitičkim raskidanje O-H veze.



Sledeći mehanizam antioksidativnog delovanja koji je ispitivan je SET-PT (Single-Electron Transfer followed by Proton Transfer). U prvom koraku dolazi do prenosa elektrona, čime nastaje nestabilna vrsta radikal-katjon. Drugi korak ovog mehanizma podrazumeva stabilizaciju radikal-katjona odlaskom protona.



Treći antioksidativni mehanizam koji je ispitivan je SPLET (Sequential Proton Loss Electron Transfer). On se kao i SET-PT sastoji od reakcije koja se dešava u dva

koraka. U prvom koraku ovog mehanizma dolazi do gubitka protona i nastanka anjona, dok se u drugom koraku iz anjona formira radikal prenosom elektrona.



Materijal i metode rada

Za procenu antioksidativne i antiradikalne aktivnosti neophodno je bilo uraditi optimizaciju potrebnih vrsta, a to su: neutralni molekul, odgovarajući radikal katjon, radikali i anjoni. Svi proračuni su urađeni korišćenjem Gaussian 09 (Frisch i sar., 2010) primenom B3LYP-D3BJ/6-311++G(d,p) teorijskog modela. Sve entalpije reakcija korišćene u jednačinama izračunate su u gasnoj fazi na 298 K. Vrednosti entalpija protona i elektrona uzete su iz literature (Bartmess, 1994). Antioksidativni mehanizmi okarakterisani su sledećim termodinamičkim parametrima: entalpija disocijacije veze (BDE) koja se odnosi na reakciju (1), jonizacioni potencijal (IP) koja se odnosi na reakciju (2), entalpija protonske disocijacije (PDE) koja se odnosi na reakciju (3), afinitet prema protonu (PA) koja se odnosi na reakciju (4), i entalpija prenosa elektrona (ETE) koja se odnosi na reakciju (5). Opisani parametri izračunavaju se osnovu jednačina (6-10):

$$BDE = H(A-O^\bullet) + H(H^\bullet) - H(A-OH) \quad (6)$$

$$IP = H(A-OH^{*\bullet}) + H(e^-) - H(A-OH) \quad (7)$$

$$PDE = H(A-O^\bullet) + H(H^\bullet) - H(A-OH^{*\bullet}) \quad (8)$$

$$PA = H(A-O^-) + H(H^+) - H(A-OH) \quad (9)$$

$$ETE = H(A-O^\bullet) + H(e^-) - H(A-O^-) \quad (10)$$

U jednačinama (6-10) $H(A-OH)$, $H(A-O^\bullet)$, $H(A-OH^{*\bullet})$ i $H(A-O^-)$, predstavljaju entalpije molekula, radikala, radikal-katjona i anjona, dok $H(H^\bullet)$, $H(e^-)$ i $H(H^+)$ predstavljaju entalpije atoma vodonika, zatim entalpiju elektrona, i protona. Entalpije reakcija antioksidativnih mehanizama u prisustvu slobodnih radikala izračunate su na sledeći način:

$$\Delta_r H_{BDE} = H(AO^\bullet) + H(ROH) - H(A-OH) - H(RO^\bullet) \quad (11)$$

$$\Delta_r H_{IP} = H(A-OH^{*\bullet}) + H(RO^-) - H(A-OH) - H(RO^\bullet) \quad (12)$$

$$\Delta_r H_{PDE} = H(A-O^\bullet) + H(ROH) - H(A-OH^{*\bullet}) - H(RO^-) \quad (13)$$

$$\Delta_r H_{PA} = H(A-O^-) + H(ROH) - H(A-OH) - H(RO^-) \quad (14)$$

$$\Delta_r H_{ETE} = H(A-O^\bullet) + H(RO^-) - H(A-O^-) - H(RO^\bullet) \quad (15)$$

U jednačinama (11-15) $H(ROH)$, $H(RO^\bullet)$, i $H(RO^-)$, predstavljaju entalpije molekula, radikala, anjona, korišćenih slobodnih-radikalnih vrsta.

Rezultati istraživanja i diskusija

Operativan mehanizam antioksidativnog delovanja ispitivanih antrahinona može biti procenjen na osnovu vrednosti termodinamičkih parametara BDE, IP i PA (Tabela 1). Najniže vrednosti ukazuju na najpovoljniji mehanizam antioksidativnog delovanja.

Tabela 1. Termodinamički parametri antioksidativnih mehanizama ispitivanih antrahinona (u kJ mol⁻¹)

Table 1. The calculated parameters of antioxidant mechanisms of examined anthraquinones (in kJ mol⁻¹)


gas	HAT		SET-PT		SPLET	
	BDE	IP	PDE	PA	ETE	
1,2-DHA		782				
1-OH	382		921	1386	317	
2-OH	359		898	1371	309	
1,3-DHA		805				
1-OH	425		942	1431	316	
3-OH	282		799	1352	252	
1,4-DHA		762				
1(4)-OH	397		956	1424	295	
2,3-DHA		799				
2(3)-OH	331		855	1329	324	

Analiza rezultata prikazanih u Tabeli 1 pokazuje da su najniže vrednosti dobijene za BDE, što ističe HAT kao najpovoljniji antioksidativni mehanizam u gasnoj fazi. Treba istaći da najnižu vrednost ostvaruje radikal nastao na hidroksilnoj grupi 3-OH jedinjenja 1,3-DHA. Što se tiče ostalih ispitivanih jedinjenja, BDE vrednosti su slične. Na Slici 1 prikazane su optimizovane strukture svih ispitivanih antrahinona, i uočava se da su jedinjenja 1,4-DHA i 2,3-DHA simetrična, pa su isti rezultati u različitim položajima ovih jedinjenja bili i očekivani. Sa druge strane, izračunate IP i PA vrednosti su dosta veće u odnosu na prikazane BDE vrednosti, što isključuje SET-PT i SPLET kao moguće antioksidativne mehanizame u gasnoj fazi.

Procena antiradikalnog kapaciteta ispitivanih antrahinona urađena je upoređivanjem vrednosti $\Delta_r H_{BDE}$, $\Delta_r H_{IP}$ i $\Delta_r H_{PA}$ reakcionih entalpija. Ove vrednosti su izračunate primenom jednačina 11-15, i prikazane su u Tabeli 2. Negativne vrednosti $\Delta_r H_{PA}$ ukazuju na egzotermne reakcije po SPLET mehanizmu u slučaju svih ispitivanih jedinjenja i sa oba ispitivana radikala. Na osnovu tih rezultata, može se reći da je SPLET dominantan mehanizam antiradikalnog delovanja u gasnoj fazi. Takođe, niske pozitivne i negativne vrednosti $\Delta_r H_{BDE}$ endotermnih i egzotermnih reakcija HAT mehanizma, ukazuju da je moguća deaktivacija metilperoksilnog i metoksi radikala i u reakciji HAT mehanizma. Visoke pozitivne $\Delta_r H_{IP}$ vrednosti, koje karakterišu prvi korak SET-PT mehanizma, čine ovaj

mehanizam nepovoljnim za deaktivaciju metilperoksilnog i metoksi radikala sa ispitivanim antrahinonima.

Tabela 2. Termodinamički parametri koji opisuju antiradikalsku aktivnost ispitivanih antrahinona (u kJ mol⁻¹)
 Table 2. Thermodynamical parameters of antiradical activity of examined anthraquinones (in kJ mol⁻¹)

	HAT	SET-PT		SPLET	
	$\Delta_f H_{BDE}$	$\Delta_f H_{IP}$	$\Delta_f H_{PDE}$	$\Delta_f H_{PA}$	$\Delta_f H_{ETE}$
1,2-DHA		670			
1-OH+1	42		-627	-162	204
2-OH+1	20		-650	-177	196
		634			
1-OH+2	-31		-665	-200	169
2-OH+2	-54		-688	-215	161
1,3-DHA		692			
1-OH+1	86		-606	-117	203
3-OH+1	-57		-749	-196	139
		657			
1-OH+2	12		-645	-155	168
3-OH+2	-131		-788	-234	104
1,4-DHA		649			
1(4)-OH+1	58		-592	-124	182
		614			
1(4)-OH+2	-16		-630	-162	147
2,3-DHA		686			
2(3)-OH+1	-8		-694	-219	212
		651			
2(3)-OH+2	-81		-732	-257	176

Zaključak

U ovoj studiji urađeno je ispitivanje antioksidativne i antiradikalske aktivnosti antrahinona identifikovanih u biljci *Rubia cordifolia* Linn. Vrednosti termodinamičkih parametara i reakcione entalpije HAT, SET-PT i SPLET mehanizma izračunate su kako bi se utvrdili najpovoljniji reakcioni putevi antioksidativnog i antiradikalskog delovanja. Procenjene vrednosti ukazuju da je HAT termodinamički najpovoljniji mehanizam antioksidativnog delovanja ispitivanih antrahinona, dok je SPLET najverovatniji mehanizam deaktivacije metilperoksilnog i metoksi radikala u gasnoj fazi.

Napomena

Istraživanje u ovom radu podržano je od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja (Sporazumi broj: 451-03-68/2020-14/200146 i 451-03-68/2020-14/200378).

Literatura

- Bartmess JE (1994). Thermodynamics of the electron and the proton, *The Journal of Physical Chemistry*. 98 (25) 6420-6424.
- Cai Y., Luo Q., Sun M., Corke H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer, *Life Science*. 74 (17) 2157-2184.
- Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., et al. (2010). Gaussian 09, Revision C.01, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA.
- Galano, A., Mazzone, G., Alvarez-Diduk, R., Marino, T., Alvarez-Idaboy, J. R., & Russo, N. (2016). Food antioxidants: chemical insights at the molecular level. *Annual review of food science and technology*, 7, 335-352.
- Samatha S., Vasudevan T. N. (1996) Natural hair dyes, *Journal of Scientific & Industrial Research*. 55(11), 885-887.
- Singh R. (2005). Isolation and synthesis of anthraquinones and related compounds of *Rubia cordifolia*, *Journal of the Serbian Chemical Society*. 70(7) 937-42.
- Thomson R. H., (1971). *Naturally Occurring Quinones*, 2nd Ed., Academic Press, London.
- Williams E. M., (2002). *Major Herbs of Ayurveda*, Churchill Livingstone, Elsevier Science Ltd.

ANTIOXIDANT CAPACITY OF ANTRAQUINONES FROM PLANT *RUBIA CORDIFOLIA* LINN

Žiko Milanović^{1,2}, Marko Antonijević^{1,2}, Ana Kesić¹, Dušan Dimić³, Jelena Đorović Jovanović¹

Abstract

In this study, the antioxidant and antiradical capacities of anthraquinones from *Rubia cordifolia* Linn were determined using the DFT method. The thermodynamically most favorable reaction pathways of antioxidant mechanisms were defined, as well as the most favorable antiradical reaction mechanisms for the deactivation of methylperoxyl and methoxy radicals. The calculations were done in the gas phase. HAT is thermodynamically the most favorable mechanism of antioxidant action of the studied anthraquinones, while the most probable mechanism of deactivation of methylperoxyl and methoxy radicals is the SPLET mechanism.

Key words: anthraquinones, DFT, antioxidant activity, antiradical activity

¹University of Kragujevac, Institute for Information Technologies, Department of Science, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia (ziko.milanovic@pmf.kg.ac.rs);

²University of Kragujevac, Faculty of Science, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Serbia.

³Univerzitet u Beogradu, Faculty of Physical Chemistry, Studentski trg 12, Beograd, Serbia.