

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 547.943.7/541.127/128.24/577.161.6

©Коллектив авторов

СОВМЕСТНОЕ ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ С α -ТОКОФЕРОЛОМ ПРИ ОКИСЛЕНИИ МЕТИЛОЛЕАТА

М.Г. Перевозкина^{1}, А.А. Кудрявцев², Н.Ю. Третьяков², Н.М. Сторожок¹*

¹ГОУ ВПО "Тюменская государственная медицинская академия" Росздрава,
625023 Тюмень, ул. Одесская, 54, факс: (3452) 20-62-00;
эл. почта: mgperevozkina@mail.ru

²ГОУ ВПО "Тюменский государственный университет" МО России", 625003
Тюмень, ул. Семакова 10.

Изучены особенности ингибирующего действия композиций α -токоферола (α -ТФ) с производными салициловой кислоты в процессе инициированного окисления растворов метилолеата (МО), установлен эффект синергизма методами УФ-спектроскопии и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), изучена кинетика расходования α -ТФ в процессе окисления МО при использовании его порознь и в составе бинарной смеси с синтетическими антиоксидантами (АО).

Ключевые слова: антиоксиданты, синергисты, α -токоферол, пероксидное окисление, антирадикальная активность, производные салициловой кислоты.

ВВЕДЕНИЕ. В современной литературе достаточно широко обсуждается патогенетическое значение окислительного стресса и эффективность ряда природных и синтетических антиоксидантов (АО), используемых в качестве медикаментозного средства коррекции процессов свободнорадикального окисления. Синтетические фенолы в силу относительно высокой токсичности ограниченно применяются для стабилизации процессов окисления субстратов пищевого и медицинского назначения. Исключение составляют производные салициловой и *пара*-аминобензойной кислот [1]. Возможность дополнительного усиления ингибирующего действия связана с использованием синергических композиций. Эффективность действия синергической смеси может быть значительной при малых концентрациях АО, что особенно важно при длительном использовании стабилизаторов окисления. Наибольший интерес представляют смеси с основным природным АО - α -токоферолом (α -ТФ).

В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование антирадикальной активности, брутто-ингибирующего действия новых синтетических производных салициловой кислоты, установления взаимосвязи между их строением и антиоксидантной активностью, а также поиск высокоэффективных синергических композиций при сочетании производных салициловой кислоты с α -ТФ.

*Адресат для переписки

МЕТОДИКА. Антирадикальную активность АО тестировали в системе инициированного окисления этилбензола хемиллюминесцентным (ХЛ) методом [2]. Основной кинетической характеристикой ХЛ кривых является величина тангенса угла наклона касательной, проведенной в точке перегиба, пропорциональная максимальной скорости расщепления антиоксиданта $[d(I_0/I)/dt]_{\max}$. Указанную величину использовали для расчетов значения k_7 с учетом уравнения

$$[d(I_0/I)/dt]_{\max} = (0,22 \pm 0,02) \times k_7 \times \sqrt{W_i} / \sqrt{k_6},$$

где k_6 - константа скорости рекомбинации перекисных радикалов, W_i - скорость зарождения свободных радикалов в системе окисления [3]. Из семейства кинетических кривых ХЛ определяли стехиометрический коэффициент ингибирования f :

$$f = W_i t \frac{\int_0^{\infty} (1 - I/I_0) dt}{[InH]_0},$$

где $[InH]_0$ - начальная концентрация ингибитора, $\int_0^{\infty} (1 - I/I_0) dt$ - величина, пропорциональная площади, ограниченной кинетической кривой свечения и прямой, проведенной через точку $I/I_0 = 1$ и параллельной оси абсцисс.

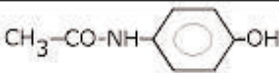
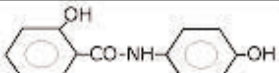
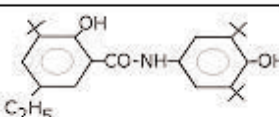
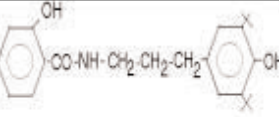
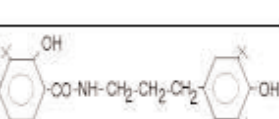

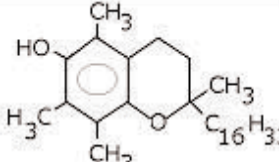
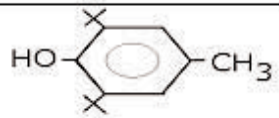
Кинетику окисления изучали манометрическим методом в установках типа Варбурга с использованием модельного субстрата - метилолеата (МО) [3]. Процесс инициировали за счет термического разложения при 60°C азобисизобутиронитрила (АИБН), скорость инициирования в условиях экспериментов составляла $4,2 \times 10^{-8} \text{ M} \times \text{с}^{-1}$. Графическим методом определяли величину периода индукции (τ_i) [4]. Действие ингибиторов оценивали величиной антиоксидантной активности (АОА), количественно определяемой по формуле $\text{АОА} = \tau_i - \tau_s / \tau_s$, где τ_s и τ_i - периоды индукции окисления субстрата в отсутствие и в присутствии исследуемого АО соответственно; сравнивали с действием ингибитора, принятого за стандарт, используя отношение $\tau_i / \tau_{\text{реп}}$, где $\tau_{\text{реп}}$ - период индукции реперного ингибитора. Кинетику накопления гидропероксидов изучали методом обратной йодометрии при аутоокислении линолевой кислоты при 60°C в среде хлорбензола [5].

Эффективность совместного ингибирующего действия смеси количественно характеризовали абсолютным значением разности $\Delta\tau = \tau_s - \Sigma\tau_i$ периодов индукции окисления МО в присутствии композиции АО и простой суммы индивидуальных компонентов $\Sigma\tau_i$ (аддитивное действие), либо выражали в относительных единицах - $(\Delta\tau / \Sigma\tau_i) \times 100\%$. Выполнение неравенства $\tau_s > \Sigma\tau_i$ свидетельствовало о проявлении синергизма в совместном действии компонентов, а $\tau_s < \Sigma\tau_i$ - об эффекте антагонизма.

Кинетику расщепления α -ТФ изучали методами УФ-спектроскопии (Specord M 40, Shimadzu UV-160 1 PS) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (Милихром А-02, колонка ProntoSil 120-5 C18AQ).

В работе были использованы 4-ацетаминифенол (парацетамол) (I), амид 1-(N-4'-гидроксифенил) салициловой кислоты (осалмид) (II), амид 1-(N-4'-гидроксифенил-3,3',5'-трет.бутил)-5-этил салициловой кислоты (III), амид 1-(N-4'-гидроксифенилпропил-3,3',5'-дитрет.бутил)-5-этил салициловой кислоты (IV), амид 1-(N-4'-гидроксифенилпропил-3,3',5'-трет.бутил)-5-этил салициловой кислоты (V), сульфид 1-(N-4'-гидроксифенилпропил-3,3',5'-трет.бутил)-5-этил салициловой кислоты (VI), α -токоферол (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметил-2-фитилхроман) (VII) ("Serva", Германия), дибунол (1-гидрокси-2,6-дитрет.бутил-4-метил-бензол) ("Serva") (VIII) (см. табл. 1). В качестве субстрата окисления использовали метилолеат, линолеовую кислоту, синтезированные в НИОХ СО РАН, дважды очищенные путем вакуумной перегонки в токе аргона при 105°C .

Таблица 1. Кинетические характеристики АО различного химического строения.

№	Соединение	Структурная формула	$k \times 10^4$, $M^{-1} \times c^{-1} \times s^{-1}$	t_{max} , мин**	АОА**		
					$(t_f - t_g)$, t_g	t_f/t_g , ТФ	t_f/t , ДРБ
I	4-гидрокси-фенил (Парагидрокси)		$4,00 \pm 0,13$	1030 ± 8	38,6	1,7	1,1
II	Амид 1-(N'-гидрокси-фенил) салициловой кислоты (Осаламид)		$6,86 \pm 0,15$	500 ± 6	18,2	0,8	0,6
III	Амид 1-(N'-гидрокси-фенил-3,3',5'-триэтилбутил)-5-этил салициловой кислоты		$1,69 \pm 0,04$	620 ± 5	22,9	1,0	0,7
IV	Амид 1-(N'-гидрокси-фенил-3,3',5'-диэтилбутил)-5-этил салициловой кислоты		$0,52 \pm 0,02$	890 ± 8	33,2	1,5	0,9
V	Амид 1-(N'-гидрокси-фенил-3,3',5'-диэтилбутил)-5-этил салициловой кислоты		$0,85 \pm 0,03$	900 ± 7	33,6	1,5	1,0
VI	Сульфид 1-(S'-гидрокси-фенил-3,3',5'-диэтилбутил)-5-этил салициловой кислоты		$0,74 \pm 0,02$	910 ± 5	34,0	1,5	1,0
VII	α-хирофенил (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметил-2-фенилхроман)		$360,0 \pm 0,12$	600 ± 5	22,1	-	0,6
VIII	2,6-диэтилбутил-4-метилфенил (дубутил)		$1,40 \pm 0,02$	950 ± 6	35,5	1,6	-

Примечание: * - k_7 - константа скорости реакции, полученная из кинетических измерений ХЛ этилбензола; $W_i = 2,3 \times 10^{-8} M \times c^{-1}$, $t = 60^\circ$. ** - условия окисления метилолеата: $W_i = 4,2 \times 10^{-8} M \times c^{-1}$, $t = 60^\circ$, $CAO = 1 \times 10^{-3} M$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Синтезированные в Институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН амидные или сульфидные производные салициловой кислоты содержат *орто-трет*-бутильные заместители и являются пространственно затрудненными фенолами. Практически важным является изучение активности новых АО, сравнение их ингибирующего действия и антирадикальной активности с известными ингибиторами окисления α -ТФ и дибунолом.

В группе исследуемых АО методом хемилюминесценции оценена величина константы скорости реакции АО с пероксильными радикалами (реакция 7, согласно общепринятой схемы):



где InH – ингибитор окисления, In^\bullet – радикал ингибитора, RO_2^\bullet – пероксильный радикал.

При исследовании кинетики изменения интенсивности ХЛ в присутствии исследуемых соединений (табл. 1) было установлено, что все АО оказывают ингибирующее действие на процесс окисления модельного субстрата (этилбензола). Наибольшую активность в реакции с пероксильными радикалами из производных салициловой кислоты проявляет осалмид, аномально высокая константа скорости реакции k_7 которого обусловлена наличием π -р-сопряжения между аминогруппой и фенолом. Анализ значений констант скорости реакций k_7 структур, отличающихся степенью экранированности ОН-группы, показывает, что введение экранирующих заместителей приводит к существенному снижению антирадикальной активности АО (табл. 1).

Наиболее тесная взаимосвязь существует между значением константы скорости реакции k_7 и природой заместителя в *пара*-положении. Полученные данные о характере влияния заместителей разной природы согласуются со сведениями [6-11]. Сравнение значений k_7 исследуемых фенолов и α -ТФ показывает, что основной природный АО α -токоферол более активен в реакции с пероксильными радикалами. Стехиометрический фактор ингибирования f для большинства соединений близок к 3. Таким образом, основной механизм действия исследуемых АО связан с уничтожением пероксильных радикалов.

Более полное представление об участии ингибитора в сложном многостадийном процессе окисления можно получить на основании данных об антиокислительной активности соединения (АОА). Известно, что для большинства синтетических АО имеет место корреляционная связь между концентрацией АО и величиной периодов индукции. В литературе [5, 12, 13] показано, что для ряда природных АО эта зависимость может отклоняться от прямолинейности в области высоких концентраций. Поэтому для исследуемых АО необходимо изучить характер изменения брутто-эффективности от их содержания в субстрате.

Антиоксидантное действие указанных в таблице 1 соединений определяли в диапазоне концентраций ($1,0 \times 10^{-5}$ – $5,0 \times 10^{-3}$ М) и сравнивали с действием реперных ингибиторов – дибунолом, α -ТФ. Найдено, что исследуемые АО увеличивают периоды индукции окисления модельного субстрата МО. Для всех синтетических антиоксидантов наблюдается линейная зависимость между периодом индукции и концентрацией АО (рис. 1). Действие α -ТФ описывается экстремальной зависимостью (линия 7, рис. 1), характер которой ранее был описан в литературе [5] и воспроизведен в нашей работе. Периоды индукции при ингибировании α -ТФ нарастают до концентрации $2,5 \times 10^{-3}$ М, свыше которой происходит постепенное снижение эффективности торможения процесса. Это объясняется различиями в активности феноксильных радикалов АО разного строения. Известно, что пространственно незатрудненные феноксилы проявляют высокую активность в побочных реакциях продолжения цепей, приводящих к снижению действия АО [9].

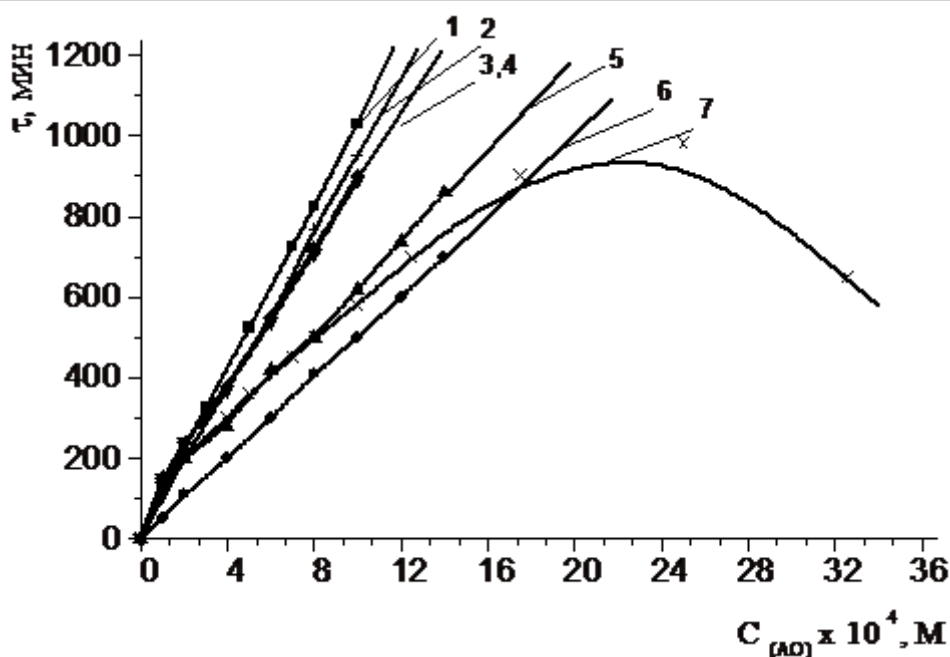


Рисунок 1.

Зависимость периодов индукции от концентрации АО:

1 – парацетамол; 2-дибунол; 3- амид салициловой кислоты (V); 4 - амид салициловой кислоты (IV); 5 - амид салициловой кислоты (III); 6- осалмид; 7 - α-ТФ.

$W_i = 4,2 \times 10^{-8} \text{ М} \times \text{с}^{-1}$, $t = 60^\circ \text{C}$.

Сопоставление различных амидов салициловой кислоты (III, IV, V) (табл. 1) показывает, что разделение между собой тремя метиленовыми группами амидного и фенольного фрагментов молекулы приводит к повышению брутто-ингибирующего действия АО. Очевидно, этот эффект связан с отсутствием π -р-сопряжения между аминогруппой и бензольным ядром. В литературе были получены аналогичные закономерности для других групп соединений [11, 14]. Было установлено, что структуры (V, VI) близки по своему антиоксидантному действию (табл. 1).

Особо необходимо отметить, что ОН-группа, расположенная по соседству в орто-положении к карбоксильной –COOH-группе, независимо от степени ее экранирования, не вносит существенного вклада в эффективность ингибирования - периоды индукции сравнимы (табл. 1). На основе этого можно рекомендовать использование АО, у которых экранированная фенольная –ОН-группа должна находиться в пара-положении к амидной группировке, что исключит возможность образования внутримолекулярной водородной связи. Направленный синтез указанных соединений позволит создать новую группу высокоэффективных ингибиторов окисления.

Для подтверждения гипотезы о возможном разрушении гидропероксидов (ROOH) под действием АО было проведено экспериментальное изучение кинетики накопления гидропероксидов после введения в частично окисленную линолевую кислоту (ЛК) каждого из исследуемых АО (рис. 2). Влияние всех АО было однотипным в течение всего периода наблюдений, в контроле пероксиды продолжали накапливаться. Среди новых синтетических АО эффективным разрушителем гидропероксидов являются структуры – (V, VI). Следовательно, исследуемые соединения в процессе окисления способны как эффективно уничтожать пероксильные радикалы, так и разрушать гидропероксиды молекулярным путем. Пероксидазная активность указанных соединений позволит при использовании их *in vivo* усилить ферментативную антиоксидантную систему организма. Антирадикальная активность ингибиторов обусловлена присутствием в их химической структуре фенольного гидроксила, а способность разрушения гидропероксидов связана с наличием amino-, амидной или сульфидной группы.

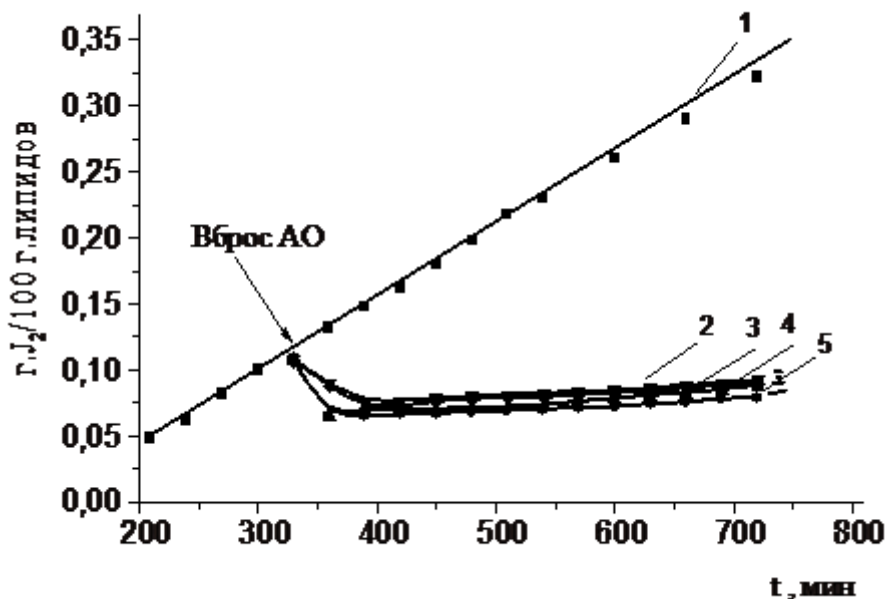


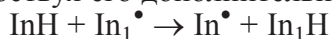
Рисунок 2.

Кинетика разрушения гидропероксидов при автоокислении линолевой кислоты (ЛК) в присутствии равных концентраций АО: 1- контроль, 2 - амид салициловой кислоты (III), 3 - амид салициловой кислоты (IV), амид салициловой кислоты (V), 4 – осалмид, 5 – парацетамол. Стрелкой показан вброс АО, $C_{(AO)} = 2 \times 10^{-4}$ M, $t = 60^\circ\text{C}$.

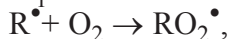
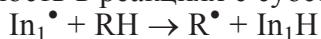
В настоящей работе кроме простого скрининга активных антиоксидантов среди новых структур предпринят поиск синергических композиций с природным ингибитором α -ТФ. Была исследована кинетика радикальных реакций в системах, одним из компонентов которых был α -ТФ, а вторым – незкранированный (I, II) или пространственно затрудненный фенол (V). Совместное действие α -ТФ и фенолов сравнивалось с прогнозируемым аддитивным эффектом составляющих, определяемым как простая сумма периодов торможения при использовании ингибиторов порознь (табл. 2). Величина антагонизма в действии α -ТФ с парацетамолом и осалмидом достигает 70 и 60%, соответственно.

Антагонизм в действии α -ТФ в смеси с указанными незкранированными АО, возможно, обусловлен несколькими причинами:

1. При окислении незкранированных АО образуются достаточно активные феноксины, которые участвуют в обменной реакции с активным ингибитором, способствуя его дополнительному расходованию:



2. Незкранированный феноксиновый радикал проявляет достаточно высокую активность в реакциях с субстратом окисления:



что приводит к образованию относительно малоактивного АО и дополнительному иницированию процесса.

3. Оксо-группа изучаемых нами АО может образовывать водородную связь с ОН-группой α -ТФ, что исключает ее участие в реакции с пероксильными радикалами, ведущими окисление.

Таблица 2. Зависимость величины синергического эффекта от концентрации α -ТФ и АО.

$C(AO) \times 10^{-4}, M$	$\tau_{инг} AO, мин$	$\Sigma \tau_i, мин$	$\tau_{\Sigma}, мин$	$\Delta \tau, мин$	$(\Delta \tau / \Sigma \tau_i) \times 100\%$
а $AO (V)^* + C (\alpha\text{-ТФ}) = const = 2,5 \times 10^{-4} M, \tau_{инг} = 190 мин$					
1,0	150 \pm 2	340	435 \pm 4	95	27,9
2,0	240 \pm 4	430	610 \pm 5	180	41,9
4,0	380 \pm 5	570	855 \pm 6	285	50
6,0	550 \pm 4	740	815 \pm 7	75	10,1
8,0	720 \pm 6	910	770 \pm 6	-140	-15,4
10,0	900 \pm 7	1090	900 \pm 11	-190	-17,4
б $\alpha\text{-ТФ} + C (AO) (V)^* = const = 2 \times 10^{-4} M, \tau_{инг} = 240 мин$					
2,5	190 \pm 3	430	610 \pm 4	180	41,9
5,0	300 \pm 5	540	830 \pm 6	290	53,7
12,5	650 \pm 6	890	1370 \pm 12	480	53,9
в $AO (II)^* + C (\alpha\text{-ТФ}) = const = 2,5 \times 10^{-4} M, \tau_{инг} = 190 мин$					
1,0	130 \pm 3	320	245 \pm 3	-75	-30,6
2,0	220 \pm 4	410	280 \pm 5	-130	-46,4
4,0	425 \pm 5	15	380 \pm 6	-235	-61,8
6,0	625 \pm 6	815	480 \pm 6	-335	-70,0
8,0	820 \pm 7	1010	575 \pm 7	-435	-75,7
10,0	1030 \pm 8	1220	720 \pm 8	-500	-69,4
г $\alpha\text{-ТФ} + C (AO) (II)^* = const = 1 \times 10^{-4} M, \tau_{инг} = 130 мин$					
2,5	190 \pm 2	320	250 \pm 3	-70	-28,0
5,0	300 \pm 4	430	280 \pm 5	-150	-53,6
12,5	650 \pm 5	780	470 \pm 6	310	-66,0
д $AO (III)^* + C (\alpha\text{-ТФ}) = const = 2,5 \times 10^{-4} M, \tau_{инг} = 190 мин$					
1,0	50 \pm 2	240	165 \pm 3	-75	-45,5
2,0	110 \pm 3	300	195 \pm 4	-105	-53,8
4,0	200 \pm 3	390	250 \pm 4	-140	-56,0
6,0	300 \pm 4	490	300 \pm 5	-190	-63,3
8,0	410 \pm 4	600	365 \pm 5	-235	-64,4
10,0	500 \pm 6	690	410 \pm 6	-280	-68,3
е $\alpha\text{-ТФ} + C (AO) (III)^* = const = 1 \times 10^{-4} M, \tau_{инг} = 50 мин$					
2,5	190 \pm 3	240	165 \pm 3	-75	-45,5
5,0	300 \pm 3	350	220 \pm 3	-130	-59,1
12,5	650 \pm 4	700	410 \pm 4	-290	-70,7

Примечание: субстрат окисления MO , $W_i = 4,2 \times 10^{-8} M \times c^{-1}$, $t = 60^\circ C$, *- номер антиоксиданта соответствует табл. 1.

Из рисунка 3 видно, что смесь α -ТФ с пространственно затрудненным фенолом (V) значительно более эффективна в области низких концентраций, с её увеличением действие компонентов приобретает антагонистический характер. Так, оптимальная область концентраций АО соответствует интервалу $(1,0-5,0) \times 10^{-4} M$ (рис. 3), для α -ТФ концентрации $(2,5-5,0) \times 10^{-4} M$ (табл. 2). При этом АО обеспечивается наибольший синергический эффект (50-55%). Необходимо отметить, что сопоставимые эффекты ингибирования, сравнимые с максимальным действием синергической композиции, могут быть достигнуты при использовании индивидуального АО в концентрациях в 2-5 раза больших, чем в синергической смеси.

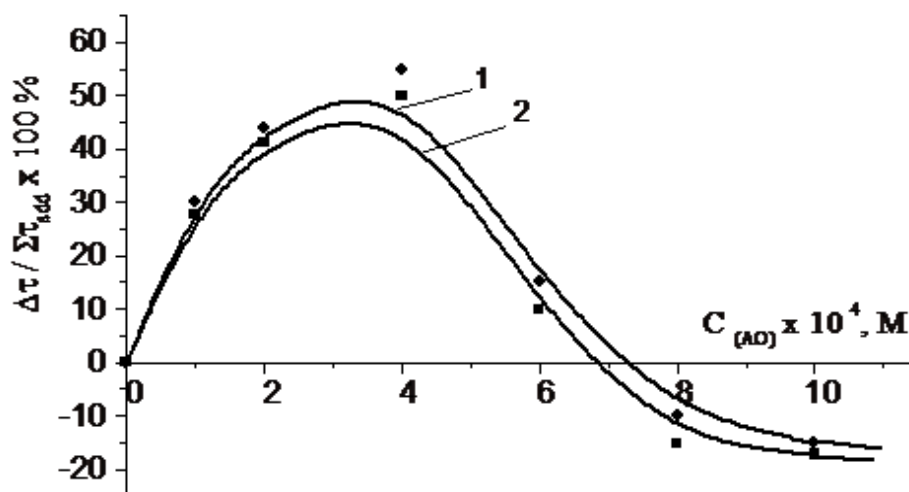
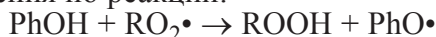


Рисунок 3.

Зависимость эффекта синергизма в композиции α -ТФ + соединение (V) при постоянных концентрациях -ТФ 5×10^{-4} М (1) и $2,5 \times 10^{-4}$ М (2).
 $W_i = 4,2 \times 10^{-8} \text{ М} \times \text{с}^{-1}$, $t = 60^\circ \text{C}$.

Механизм эффектов синергизма заключается в том, что в состав композиции входит α -ТФ, представляющий собой фенол с высоким значением k_7 (PhOH I), и пространственно затрудненный АО (PhOH II) (V), антирадикальная активность которых существенно ниже. Однако, при окислении α -ТФ образуются достаточно активные токофероксильные радикалы [15-17], а при окислении экранированных фенолов - неактивные феноксины [9, 18, 19]. На начальных стадиях окисления преимущественно расходуется более активный АО, но образующиеся при его окислении токофероксильные способствуют быстрому обмену атома водорода с экранированным фенолом по реакции, равновесие которой сильно смещено вправо: $\text{PhO}^\bullet \text{ I} + \text{PhOH II} \leftrightarrow \text{PhOH I} + \text{PhO}^\bullet \text{ II}$.

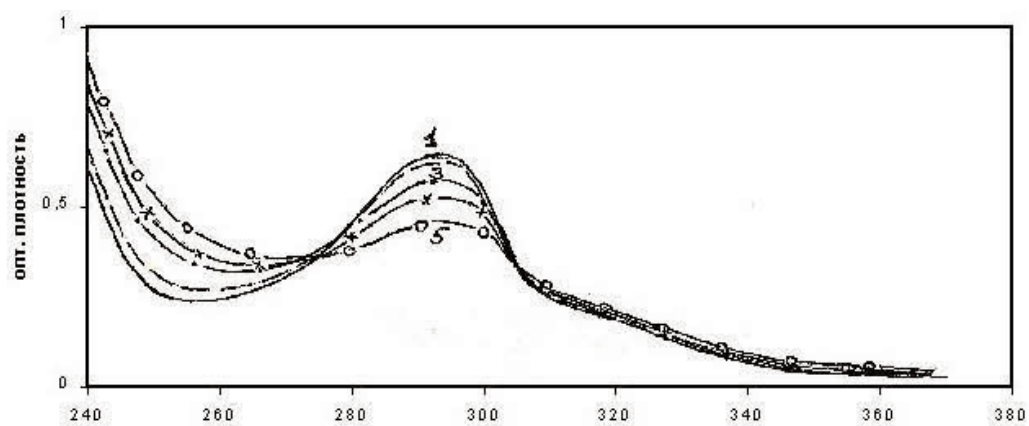
Таким образом, происходит регенерация активной фенольной формы α -ТФ. Восстановленная форма более активного АО способна вновь обрывать цепи окисления по реакции:



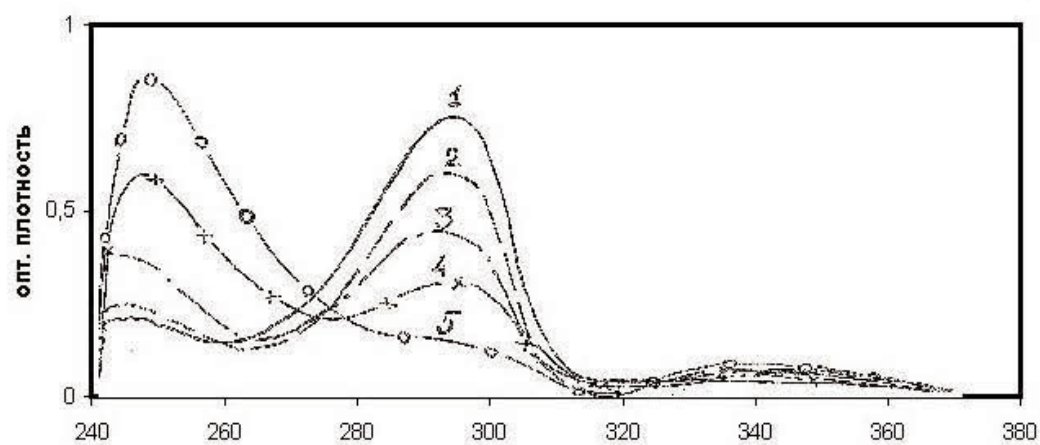
Феноксины $\text{PhO}^\bullet \text{ II}$ вследствие своей малой активности в дальнейшем практически не участвуют в цепном процессе.

Закономерности изменения скорости расходования α -ТФ изучали методом УФ-спектроскопии. α -ТФ имеет полосу поглощения при 295 нм, которая в дальнейшем будет использоваться для фотометрического определения его концентрации ($\epsilon = 2900 \text{ дм}^3/\text{М} \times \text{см}$, ацетонитрил). Присутствие МО, антиоксидантов и инициатора в выбранных концентрациях практически не мешает определению α -ТФ, если в канал сравнения спектрофотометра помещается кювета с раствором МО и антиоксиданта в той же концентрации, что и в реакционной смеси. Концентрации компонентов соответствовали манометрическим исследованиям, что позволит сопоставить между собой картину происходящих в системе изменений.

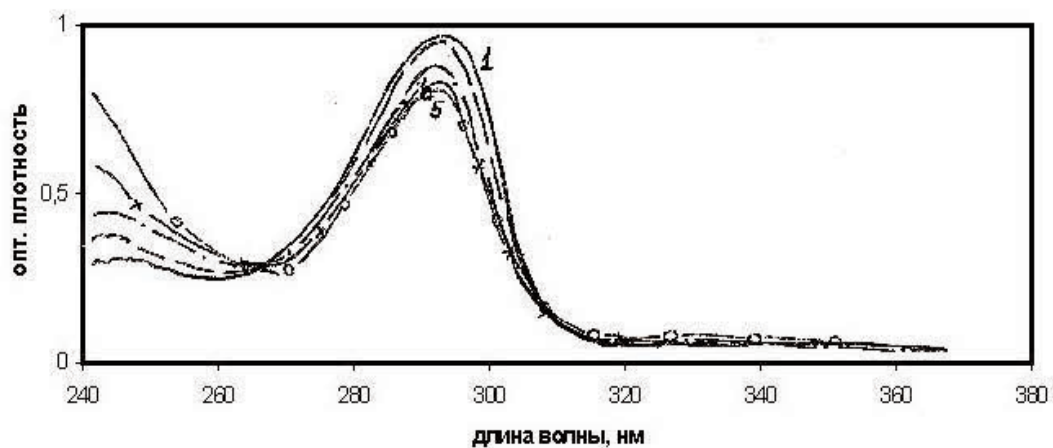
Рисунок 4 показывает, что интенсивность полосы α -ТФ с течением реакции уменьшается и увеличивается оптическая плотность поглощения продуктов окисления в коротковолновой (230 нм) и длинноволновой (340 нм) частях спектра. При использовании в реакционной смеси соединений (I, II) концентрация α -ТФ быстро снижается, а в присутствии соединения (V) расходование α -ТФ замедляется, результаты кинетического исследования приведены в таблице 3. Для выбранных концентраций реагентов изменение содержания α -ТФ в композиции с соединением (V) оказалось меньшим по сравнению с композицией, где его добавки отсутствовали. Полученные результаты свидетельствуют о том, что эффект синергизма обусловлен снижением расходования α -ТФ в присутствии пространственно затрудненных фенолов (рис. 5).



а



б



в

Рисунок 4.

Спектры оптической плотности смеси α -ТФ ($2,5 \times 10^{-4}$ М) + метилолеат ($2,0 \times 10^{-2}$ М) + АИБН ($3,0 \times 10^{-3}$ М) + соединение (I-a, II-6, V-в) ($2,5 \times 10^{-5}$ М) в ацетонитриле в процессе окисления $t=60^\circ\text{C}$, слой 0,1 см, промежуток между регистрацией спектров (1-5) 60 мин. Раствор сравнения: метилолеат ($2,0 \times 10^{-2}$ М) + соединение (I-a, II-6, V-в) ($2,5 \times 10^{-5}$ М) в ацетонитриле.

СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ НОВЫХ САЛИЦИЛАТОВ И α -ТОКОФЕРОЛА

Таблица 3. Кинетические характеристики расходования α -токоферола (исходная концентрация $2,5 \times 10^{-4}$ М) и антиоксидантов в процессе окисления, субстрат окисления - МО, $W_i = 4,2 \times 10^{-8} \text{ М} \times \text{с}^{-1}$, $t = 60^\circ\text{C}$

Состав	$C(\text{АО}) \times 10^{-4}, \text{ М}$	Скорость расходования антиоксиданта, $W_{\text{расх}}, \times 10^{-8} \text{ М} \times \text{с}^{-1}$	
		α -токоферол*	АО**
Контроль, без добавок АО	0	$0,93 \pm 0,03$	-
Осалмид (II)	0,50	$1,04 \pm 0,04$	$0,15 \pm 0,02$
	1,00	$1,28 \pm 0,05$	$0,24 \pm 0,02$
	2,50	$1,67 \pm 0,06$	$0,40 \pm 0,01$
	5,00	$1,86 \pm 0,06$	$0,79 \pm 0,02$
	7,50	$2,17 \pm 0,06$	$1,59 \pm 0,03$
Парацетамол (I)	0,25	$1,39 \pm 0,05$	$0,10 \pm 0,02$
	0,50	$2,08 \pm 0,06$	$0,14 \pm 0,02$
Амид салициловой кислоты (V)	2,50	$0,71 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,01$

Примечание: *-данные УФ-спектроскопии, **-данные ВЭЖХ.

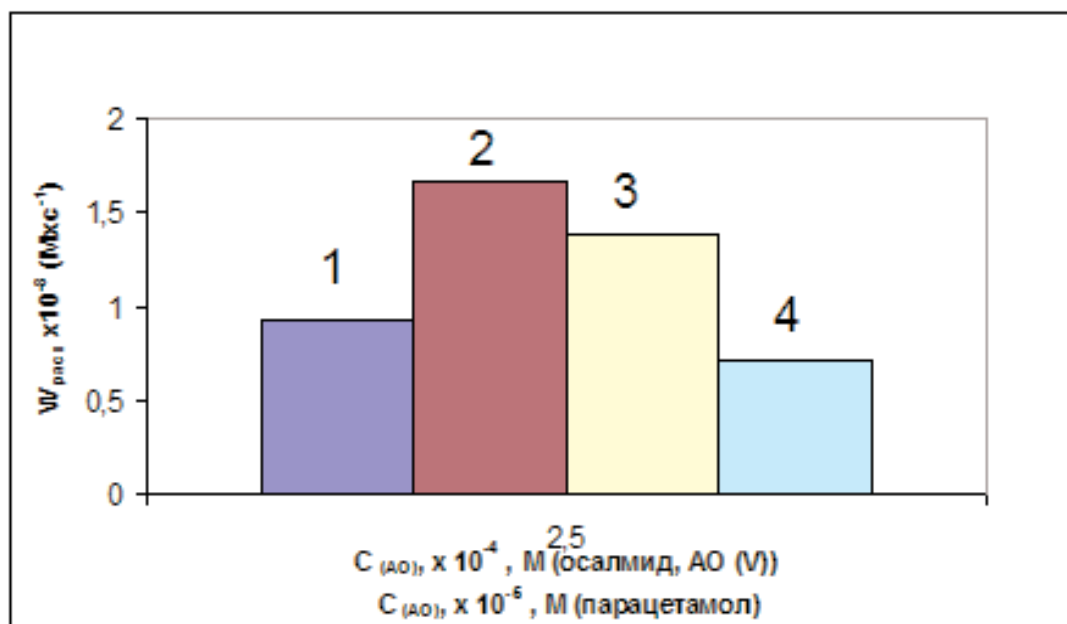


Рисунок 5.

Скорость расходования α -ТФ ($2,5 \times 10^{-4}$ М) в композициях с АО при окислении метилолеата, $t = 60^\circ\text{C}$. 1-контроль, без добавок АО, 2,3,4-с добавками осалмида, парацетамола и амида салициловой кислоты (V).

Методом ВЭЖХ (градиентное элюирование, ацетонитрил + вода) при разных длинах волн детектирования исследована динамика концентраций антиоксидантов в реакционных смесях в процессе окисления субстрата (рис. 6). Хроматографический пик α -ТФ с течением реакции уменьшается, а рядом с ним увеличивается интенсивность пиков продуктов окисления, что однозначно подтверждает выводы спектрофотометрических исследований (рис. 4, табл. 3). На хроматограмме можно выделить пик другого АО, снижение его концентрации в процессе окисления композиции идет медленно и составляет всего лишь 10-15%. Кинетические зависимости расходования α -ТФ и АО показывают, что скорость расходования α -ТФ уменьшается с ростом количества пространственно затрудненных фенолов (табл. 3). Так, при концентрации АО (V) $2,5 \times 10^{-4}$ М в системе окисления α -ТФ расходуется полностью за 8 часов, а при концентрации АО (V) $2,5 \times 10^{-5}$ всего за 3 часа.

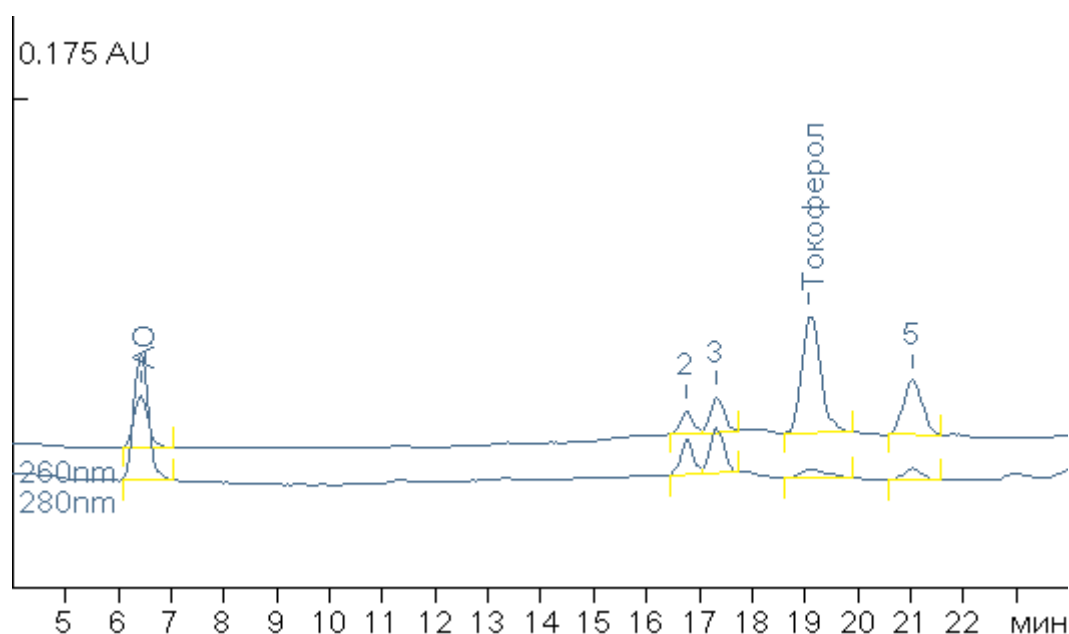


Рисунок 6.

Хроматограмма реакционной смеси в процессе окисления α -ТФ ($2,5 \times 10^{-4}$ М) + метилолеат ($2,0 \times 10^{-2}$ М) + АИБН ($3,0 \times 10^{-3}$ М) + соединение (II) ($1,25 \times 10^{-3}$ М) при фотометрическом детектировании на двух длинах волн (260, 280 нм). Градиентное элюирование, вода + ацетонитрил.

Таким образом, проведенное исследование показывает перспективность совместного применения экранированных фенолов и α -ТФ с целью разработки на основе данной синергической композиции новых высокоэффективных способов стабилизации процессов окисления. Полученные результаты могут служить методологической основой для оценки комплексного действия смесей для стабилизации окисления пищевых и биологически активных липидов, лекарственных препаратов, косметических средств.

Исследования поддержаны грантом РФФИ 02-04-49452 и грантом Интеграция высшего образования и фундаментальной науки И 0566/1653.

ЛИТЕРАТУРА

1. Машковский М.Д. (2000) Лекарственные средства. Новая волна, Москва.
2. Шляпинтох В.Я. Карпунин О.Н., Постников Л.М. (1966) Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов. Наука, Москва.
3. Храпова Н.Г. (1992) В сб.: Исследование синтетических и природных антиоксидантов *in vivo* и *in vitro*. Наука, Москва, с. 8-15.
4. Цепалов В.Ф. (1992) В сб.: Исследование синтетических и природных антиоксидантов *in vivo* и *in vitro*. Наука, Москва, с. 16-26.
5. Стороожок Н.М. (1996) Межмолекулярные взаимодействия компонентов природных липидов в процессе окисления. Дисс. докт. наук, Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва.
6. Бурлакова Е.Б., Алексеенко А.В., Молочкина А.М. (1975) Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. Наука, Москва.
7. Денисов Е.Т. (1971) Константы скорости гомолитических жидкофазных реакций. Наука, Москва.
8. Рогинский В.А. (1990) Кинетика и катализ, **31**, 546-549.
9. Рогинский В.А. (1988) Фенольные антиоксиданты. Наука, Москва.
10. Эмануэль Н.М., Денисов Е.Т., Майзус З.К. (1966) Цепные реакции окисления углеводородов в жидкой фазе. Наука, Москва.
11. Зенков Н.К., Кандалинцева Н.В., Ланкин В.З. (2003) Фенольные биоантиоксиданты. Изд-во СО РАМН, Новосибирск.
12. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Коновалова Г.Г. (1999) Бюлл. эксп. биологии и медицины, **128**, 314-316.
13. Храпова Н.Г. (1988) Система природных антиоксидантов и возможность направленного воздействия на нее синтетическими ингибиторами. Автореф. дисс. докт. наук, Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва.
14. Кандалинцева Н.В. (2002) Синтез, свойства и исследование антиокислительной активности галогенидов S-[ω -(4-гидроксиарил)алкил]изотиурония. Автореф. дисс. канд. наук. Новосибирский государственный педагогический университет, Новосибирск.
15. Бурлакова Е.Б., Крашаков С.А., Храпова Н.Г. (1998) Биол. мембраны, **15**, 137-167.
16. Nagaoka S., Okauchi Y., Urano S. (1990) J. Am. Chem. Soc., **112**, 8921-8924.
17. Mukai K., Okauchi Y. (1989) Lipids, **24**, 936-939.
18. Денисов Е.Т. (1973) Успехи химии, **42**, 361-390.
19. Денисов Е.Т., Азатян В.В. (1997) Ингибирование цепных реакций, Наука, Черноголовка.

Поступила: 27. 06. 2006.

**COMBINED INHIBITING ACTION OF NEW SALICYLIC ACID DERIVATIVES WITH
 α -TOCOPHEROL OF THE OXIDATION OF METHYL OLEATE**

M.G. Perevozkina¹, A.A. Kudryavzev², N.U. Tretyakov², N.M. Storozhok¹

¹Tyumen State Medical Academy, Odesskaya ul., 52, Tyumen, 625023 Russia; fax: (3452) 20-62-00;
e-mail: mgperevozkina@mail.ru,

²Tyumen State University, Semakova ul., 10, Tyumen, 625003 Russia

The inhibitory action of compositions of α -tocopherol (α -TP) and salicylic acid derivatives on the process of initiated oxidation of methyl oleate (MO), α -TP and the salicylic acid derivatives exhibited the synergistic effect, which was demonstrated by the methods of UV-spectroscopy and high-performance liquid chromatography (HPLC).

Key words: antioxidants, synergists, α -tocopherol, peroxide oxidation, antiradical activity, salicylic acid derivatives.