

Н. М. Сторожок¹, Н. В. Гуреева¹, А. П. Крысин², Е. Н. Дарюхина¹,
М. П. Долгих², Л. П. Попова²

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА АУРОЛА (ТИРОЗОЛА-С)

¹ Тюменская государственная медицинская академия;

² Институт органической химии СО РАН, Новосибирск

В литературе имеются данные о наличии антиоксидантной активности у суммы действующих веществ, выделенных из корневищ родиолы розовой (*Rodiola Rosea* L.) и родиолы ирмельской (*Rodiola Iremelica Boriss*) [1, 2].

В институте органической химии СО РАН из корневища золотого корня выделено индивидуальное соединение, которое было идентифицировано как 4-(2'-гидроксиэтил)фенол. Данное вещество, ранее известное как тирозол, снимает умственную и физическую усталость, усиливает способность к запоминанию и благотворно действует на общее физическое состояние [3, 4]. В промышленности тирозол используется в качестве промежуточного продукта синтеза β-холола, некоторых сердечно-сосудистых средств и биологически активных полимеров [8].

В РФ тирозол доступен в составе спиртовых экстрактов золотого корня или его таблетированных форм. Однако природные плантации золотого корня труднодоступны, растение до сбора растет 3–5 лет, при экстрагировании из него удается извлечь не более 0,1 % тирозола [9].

В связи с этим в Институте органической химии СО РАН была разработана схема синтеза и налажен выпуск соединения, получившего коммерческое название ауrol (аурум-золото). Установлены мембраностабилизирующие и адаптогенные свойства ауrolа [10].

В настоящей работе проведено изучение антиоксидантных свойств ауrolа в сравнении с активностью природных антиоксидантов (АО) (α-токоферола (ТФ), убихинона (Q₁₀), филлохинона, кверцетина) и синтетических фенолов, применяемых в качестве лекарственных средств (дibuнола, хроман-С₁).

Материалы и методы исследования

Антиоксидантную активность исследовали в системе инициированного окисления метилового эфира олеиновой кислоты (метилолеата) (МО). Использовали гомогенный раствор МО в хлорбензоле в соотношении 1:1, в который вводили исследуемые вещества в концентрациях (5×10^{-5} – 5×10^{-3}) М. За кинетикой окисления следили по поглощению кислорода в манометрических установках типа Варбурга. В качестве инициатора использовали азобизобутиродинитрил (АИБН) в концентрации 3×10^{-3} М при 60°C. Антиоксидантное действие количественно оценивали по величине периодов индукции (τ инд.), определяемых по кинетическим кривым поглощения кислорода модельным субстратом (МО) в присутствии ингибитора [11].

Феноксильные радикалы получали методом стационарного фотолиза [12], идентифицировали методом УФ-спектроскопии, исследовали возможность взаимодействия феноксилов с субстратами окисления разной степени ненасыщенности. Количество фенолов при регенерации феноксилов оценивали методом ИК-спектроскопии при длине волны 3600 см⁻¹.

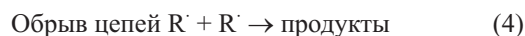
В работе использовали α-ТФ, убихинон, филлохинон, кверцетин фирмы “Serva”, США, ауrol (4-(2'-гидроксиэтил)фенол), 2,6-ди-*трет*-бутилфенол, 2-*трет*-бутил-4-(2'-гидроксиэтил)фенол и 2,6-ди-*трет*-бутил-4-(2'-гидроксиэтил)фенол, синтезированные в Институте органической химии СО РАН, хроман С₁ — в Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова, дibuнол — в институте биохимической физики РАН.

Результаты и их обсуждение

Общепринятая схема инициированного АИБН окисления модельного субстрата (RH) представлена совокупностью следующих реакций [13]:



Вырожденное разветвление цепей



В присутствии АО фенольного или оксифенольного типа возможны следующие реакции:



где RH — углеводород (липид); RO'₂ — пероксильный радикал; InH — ингибитор; In' — радикал ингибитора.

При инициированном окислении при условии достаточно большой концентрации кислорода, большой длине цепи, неизменности скорости инициирования

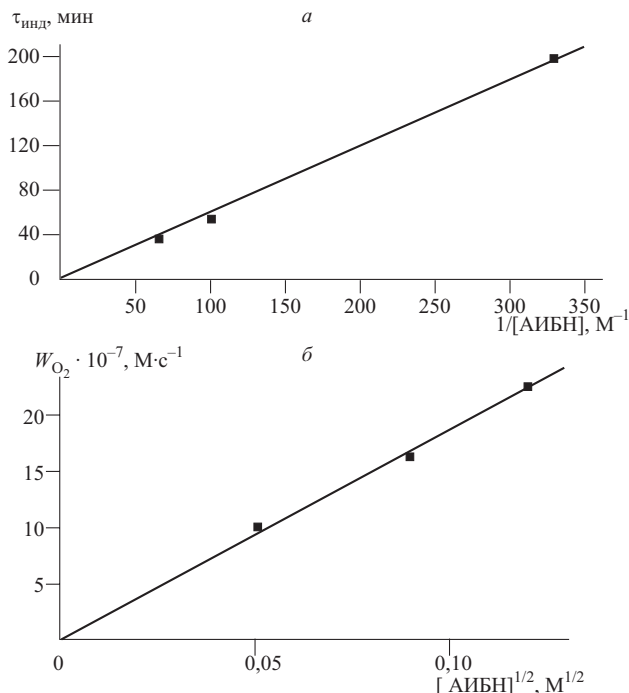


Рис. 1. Зависимость величины периодов индукции (а) и скорости окисления (б) от концентрации инициатора. Условия опыта: субстрат метилолеат, $T = 60^\circ\text{C}$.

W_i , определяемой концентрацией инициатора $[\text{RN}_2\text{R}]$ (АИБН), $W_i = K_i \times e[\text{RN}_2\text{R}]$, выполнении $W_i \gg W_3$ скорость поглощения кислорода ($W_{\text{O}_2} = -d\text{O}_2/dt$) определяется соотношением:

$$-d\text{O}_2/dt = K_2/K_6^{1/2} \times W_i^{1/2} \times [\text{RH}] \quad (\text{I} - \text{I})$$

В случае химической природы ингибирования, когда обрыв цепей преимущественно осуществляется по реакции 7, величина скорости иницирования имеет вид:

$$W_i = \varphi \times [\text{InH}]/\tau_i \quad (\text{I} - \text{II})$$

Отсюда значение периодов индукции представляется уравнением:

$$\tau_i = \varphi \times [\text{InH}]/W_i \quad (\text{I} - \text{III})$$

При ингибированном окислении, когда обрыв цепей преимущественно осуществляется на молекулах антиоксиданта, выполняется условие $\varphi \times K_7 \times [\text{InH}] \gg K_6 \times [\text{RO}_2]$, уравнение для скорости окисления имеет вид:

$$-d\text{O}_2/dt = K_2/K_7 \times [\text{RH}] \times W_i/\varphi[\text{InH}], \quad (\text{I} - \text{IV})$$

K_2, K_6, K_7 — константы соответствующих элементарных реакций (см. схему).

Из приведенных уравнений следует, что при реализации принятого механизма, скорость ингибированного окисления обратно пропорциональна, а периоды индукции — пропорциональны концентрации АО. В присутствии инициатора (АИБН), определяющего цепной характер процесса, скорость окисления про-

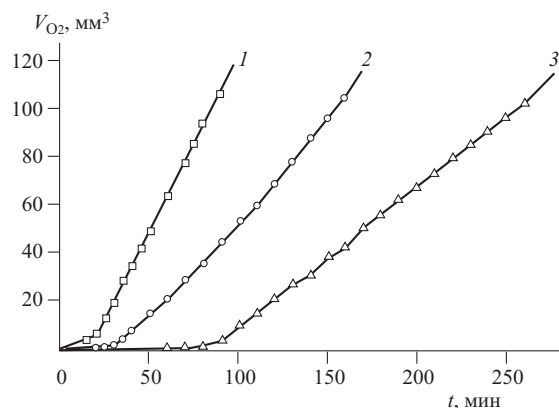


Рис. 2. Кинетические кривые поглощения кислорода при окислении метилолеата в присутствии аурула: 1 — при инициированном окислении МО; 2 — $\text{МО} + 0,7 \times 10^{-4} \text{ М}$ аурула; 3 — $\text{МО} + 1,4 \times 10^{-4} \text{ М}$ аурула. $T = 60^\circ\text{C}$, $C_{\text{АИБН}} = 3 \times 10^{-3} \text{ М}$.

порциональна $[\text{АИБН}]^{1/2}$, а периоды индукции — величине, обратной концентрации инициатора ($1/[\text{АИБН}]$) (рис. 1).

Как видно из рис. 2, на котором приведены кинетические кривые поглощения кислорода в серии опытов с различным содержанием аурула, в присутствии последнего происходит торможение окисления МО, что свидетельствует о антиоксидантной активности соединения. Упомянутые выше зависимости хорошо выполняются (рис. 1), что указывает на правильность выбранной кинетической схемы и служит доказательством химического характера взаимодействий аурула с пероксильными радикалами ($\text{RO}_2\cdot$) окисления.

Известно, что действие ряда природных АО — α -ТФ и каротиноидов — описывается экстремальной зависимостью, при высоких концентрациях происходит существенное снижение активности. Указанные эффекты инверсии действия АО наблюдались в экспериментах как *in vitro* [14, 15], так и *in vivo* [16].

При изучении концентрационной зависимости для аурула также выявляется кривая с экстремумом (рис. 3). В сравнении была воспроизведена концентрационная зависимость для α -ТФ [17], которая по форме соответствовала кривой для аурула. При этом положение точек экстремума находилось в разных диапазонах концентраций и составляло для α -ТФ и аурула: $2,5 \times 10^{-3}$ и $5,8 \times 10^{-4} \text{ М}$ соответственно (рис. 3).

Анализ показал, что для пространственно-затрудненного фенола дибунола характер упомянутой зависимости остается линейным и в тех концентрациях, при которых для нежкранированного аурула и α -ТФ наблюдается экстремум. Сопоставление периодов индукции для аурула и дибунола при равных концентрациях ($2,5 \times 10^{-4} \text{ М}$) показывает несколько большую эффективность последнего (табл. 1).

В связи с эффектом снижения эффективности АО в зависимости от увеличения их концентрации следует, что различные ингибиторы правомерно сравнивать между собой только в области положительной корреляции между ингибирующим действием и concentra-

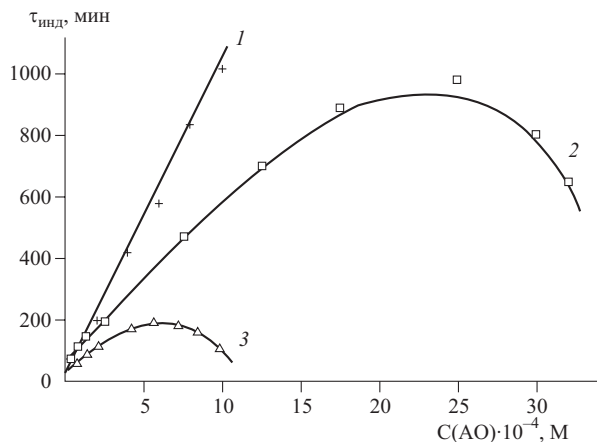


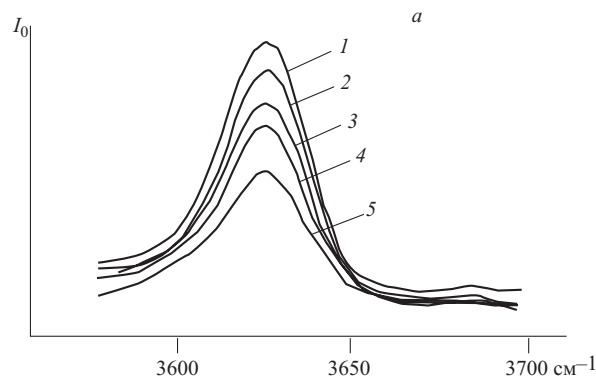
Рис. 3. Зависимость изменения периодов индукции от концентрации дигидрокувертина (1), α -токоферола (2), аурула (3).

цией. Показано, что при сравнимых концентрациях α -ТФ значительно эффективнее аурула и среди исследуемых фенолов уступает лишь дигидрокувертину. Так, при введении в модельный субстрат равных концентраций ($2,5 \times 10^{-4}$ М) каждого из АО величина периодов индукции для α -ТФ превосходит действие аурула на 70%. При концентрациях свыше 1×10^{-3} М аурул как ингибитор окисления неэффективен (рис. 3), тогда как действие α -ТФ нарастает до концентрации $2,5 \times 10^{-3}$ М, при которой величина периодов индукции в 5 раз превышает действие наиболее эффективных концентраций аурула (рис. 3). Известно, что при введении в организм происходит гидроксилирование этого соединения с образованием катехолоподобной структуры [18], действующей на адренорецепторы.

Целесообразно было сопоставить действие аурула с эффективностью таких природных АО как кверцетин и аналог α -ТФ хроман-С₁ (6-гидрокси-2,2,5,7,8-пентаметилхроман). Анализ показал, что аурул уступает по своему действию кверцетину и хроману-С (табл. 1), однако, по сравнению с ингибиторами хиноидного строения (убихиноном и филлохиноном), взаимодействующими преимущественно с алкильными радикалами [19, 20], аурул более эффективен (табл. 1). Так,

Кинетические параметры окисления метилолеата в присутствии различных природных ингибиторов окисления ($C_{либн} = 3 \times 10^{-3}$ М; $T = 60$ °С; $C_{АО} = 2,5 \times 10^{-4}$ М)

№ п/п	Антиоксидант	τ_{max} , мин	Антиоксидантная активность
			$\tau_i - \tau_0/\tau_0$ $P < 0,01$
1	Кверцетин	230	7,9
2	Фенозан-К	216	7,64
3	Дигидрокувертин	356	8,2
4	Хроман С ₁	191	6,3
5	α -Токоферол	140	1,6
6	Аурул (Тирозол-С)	130	1,4
7	Убихинон (коэнзим Q ₁₀)	40	0,5
8	Филлохинон (Витамин К ₁)	36	0,4



Содержание дигидрокувертина, %

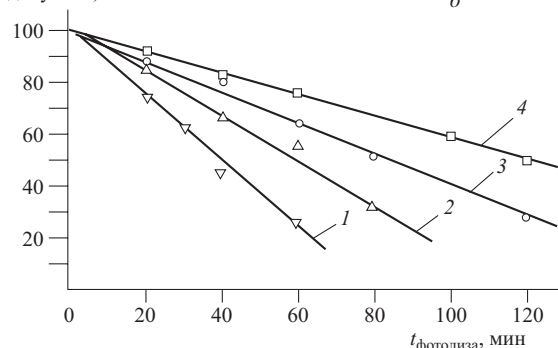


Рис. 4 а: ИК-спектры поглощения растворов дигидрокувертина (8×10^{-3} М). Условия опыта и обозначения: СС1₄ в смеси с равной концентрацией линолевой кислоты до фотолиза (1) и после фотооблучения (260–380 нм) в течение соответственно 20 с (2), 40 с (3), 60 с (4), 80 с (4), 120 с (5); б: Зависимость расходования дигидрокувертина от времени фотолиза и присутствия субстратов окисления. Условные обозначения: 1 — дигидрокувертин (8×10^{-3} М); 2 — дигидрокувертин + метилолеат; 3 — дигидрокувертин + линолевая кислота; 4 — дигидрокувертин + арахидоновая кислота

при концентрации, соответствующей максимальной эффективности аурула его ингибирующий эффект превосходит действие природных хинонов в 5,0 и 4,5 раза соответственно.

Из приведенных выше данных следует, что особенности ингибирующего действия АО связаны с их химическим строением. По всей вероятности, проявление экстремальной зависимости в действии незранированных АО (рис. 3) является кинетическим отражением образования в ходе окисления феноксильных радикалов, достаточно активных в реакциях диспропорционирования (9) и реакциях продолжения цепи (10) (см. схему) [20].

Активность феноксилов, как можно полагать, существенно зависит от природы заместителей, экранирующих фенольную группу АО.

Для экспериментального подтверждения этой гипотезы исследовали активность феноксильных радикалов АО разной степени экранированности. В качестве модельных соединений были использованы фенол, α -ТФ, 2,6-ди-*трет*-бутилфенол, дигидрокувертин, 2-*трет*-бутил-4-(2'-гидроксиэтил)фенол и 2,6-ди-*трет*-бутил-4-(2'-гидроксиэтил)фенол. В указанном ряду приведены незранированный гидроксибензол и фенолы, имеющие в *орто*- и *пара*-положениях к оксигруппе один

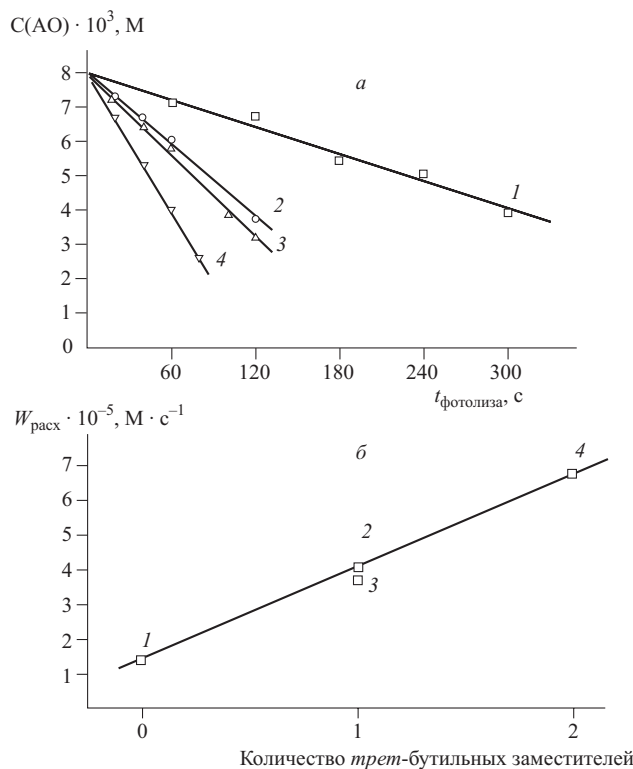


Рис. 5. *a*: Кинетические кривые расходования различных антиоксидантов в зависимости от времени их фотолиза. Условные обозначения: 1 — гидрохинон; 2 — α -токоферол; 3 — 2-*tert*-бутил-4-(2'-гидроксиэтил)фенол; 4 — дибутанол. $C(\text{AO}) = \text{const} = 8 \times 10^{-3} \text{M}$; *б*: Зависимость скорости расходования антиоксидантов от степени их экранированности. Обозначения АО те же, что на рис. 5, *a*.

или несколько объемных (*tert*-бутильных) заместителей. Среди перечисленных соединений α -ТФ занимает особое положение; он относится к другому гомологическому ряду, поскольку имеет в соседних с оксигруппой положениях две метильные группы. Активность феноксилов аурыла, к сожалению, не удалось исследовать, т.к. соединение не растворяется во всех известных растворителях, оптически прозрачных в области (3500 – 3700) см^{-1} .

Феноксильные радикалы получали методом стационарного фотолиза. Были идентифицированы α -токофероксильные радикалы по соответствию их дифференциального спектра ($\lambda_{\text{max}} = 425 \text{nm}$) с описанным в литературе [21, 22]. Спектры радикалов упомянутых выше фенолов получены впервые, максимум поглощения их феноксилов соответствовал диапазону: $\lambda_{\text{max}} = (407 - 412) \text{nm}$.

При фотооблучении растворов следили за изменением концентрации фенолов в области поглощений оксигруппы (3620cm^{-1}) (рис. 4, *a*), а также исследовали кинетику в отсутствие и в присутствии субстратов окисления (рис. 4, *б*). Таким образом, использованный нами методический прием позволял прямым методом оценивать количество фенолов, образующихся при реакции их радикалов с субстратом окисления [12]. Из рис. 4, *б*, видно, что в присутствии МО, линолевой и арахидоновой кислот происходит существенное уменьшение скорости расходования фенолов, пропорциональное степени ненасыщенности липидов.

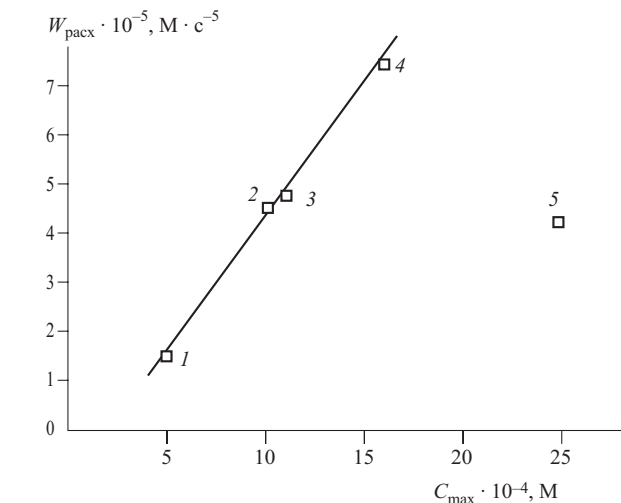


Рис. 6. Взаимосвязь между скоростью расходования феноксильных радикалов антиоксидантов и значением C_{max} АО. Условные обозначения: 1 — фенол; 2 — 2-*tert*-бутил-4-(2'-гидроксиэтил)фенол; 3 — 2,6-ди-*tert*-бутилфенол; 4 — дибутанол; 5 — α -токоферол.

Снижение скорости расходования фенолов, пропорциональное степени ненасыщенности липидов. Снижение скорости расходования однозначно свидетельствует о регенерации активной фенольной формы АО (за счет реакции 10, см. схему).

Была изучена кинетика расходования АО различного строения при фотооблучении растворов в присутствии МО. Как видно из рис. 5, *a*, наклон кривых, а следовательно скорость расходования АО, зависит от его химической структуры и возрастает по мере увеличения экранированности оксигруппы ингибитора. Сравнение показывает, что скорость расходования пространственно затрудненного дибутанола значительно выше, чем для неэкранированного фенола (более чем в 4 раза). Эти данные свидетельствуют о том, что феноксилы пространственно затрудненных АО менее активно взаимодействуют с ненасыщенными липидами. Действительно, при анализе данных рис. 5, *a*, выявлена линейная зависимость между количеством заместителей в положениях, соседних с оксигруппой, и увеличением скорости расходования ингибиторов (рис. 5, *б*). Таким образом, активность феноксильных радикалов закономерно связана с их строением.

Необходимо отметить, что количественные оценки активности феноксильных радикалов в реакции 10 немногочисленны. Известные работы касаются в основном α -ТФ [12, 21 – 24]. Использование модельных фенолов возрастающей степени экранированности позволяет установить взаимосвязь между активностью феноксильных радикалов и значением C_{max} , характеризующим положение точки экстремума на концентрационной кривой (рис. 6). Видно, что скорость расходования АО связана со значением C_{max} прямо пропорциональной зависимостью. На прямую удовлетворительно укладываются феноксилы с заместителями одинакового строения (*tert*-бутильными заместителями). Точка для α -ТФ выпадает из этой за-

висимости, что, вероятно, связано с тем, что соединение относится к другому гомологическому ряду.

В свете полученной нами корреляции (рис. 6) величину C_{\max} можно рекомендовать в качестве косвенной характеристики активности радикалов ингибиторов разного химического строения.

Следует отметить, что относительно высокая активность феноксилов отмечается для АО природного происхождения (α -ТФ, ауrola). Можно полагать, что возможность концентрационной инверсии в действии АО имеет важное регуляторное значение и может рассматриваться в качестве кинетического механизма обеспечения антиоксидантного гомеостаза организма. Так, можно ожидать, что при введении высоких доз АО (например, при длительных курсах антиоксидантотерапии) их ингибирующее действие может не возрастать, а, напротив, снижаться за счет участия феноксилов в реакциях продолжения цепи (10) и диспропорционирования, приводящего к образованию димеров (9). При малых дозах АО из димеров вновь могут образовываться феноксилы, способные регенерироваться до активной фенольной формы в реакции с субстратом (липидами биологических мембран). Таким образом, поддержание пула эндогенных ингибиторов, обеспечение стационарности уровня свободно радикальных процессов окисления может осуществляться в соответствии с принципом обратной связи.

У пространственно затрудненных фенолов возможность регуляции процесса за счет варьирования концентрации АО существенно снижена. Введение их в организм в высоких дозах может привести к неконтролируемо длительному ингибированию окисления, подавлению фагоцитоза, биосинтеза простаноидов. Вместе с тем из данных работы видно, что действие синтетических фенолов, сравнимое с максимальным эффектом природных АО, достигается при более низких концентрациях. Можно рекомендовать применение высоких концентраций синтетических АО для стабилизации процессов окисления технических масел, топлива, полимеров, а более низких — для ингибирования пищевых масел, косметических и лекарственных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Я. Герчиков, Г. Г. Гарифуллина, М. М. Ишмурагова, в сб.: *Тез. докл. V международн. конф. "Биоантиоксидант"*, 18 – 20 ноября 1998, Москва (1998), с. 33.
2. В. А. Быков, Г. Г. Запесочная, В. А. Куркин, *Хим.-фарм журн.*, **33**(1), 28 – 39 (1999).
3. А. С. Саратиков, Е. А. Краснов, *Родиола розовая — ценное лекарственное растение (золотой корень)*, Изд-во Томск. ун-та, Томск (1987).
4. В. А. Куркин, Г. Г. Запесочная, А. Г. Дубичев и др., *Химия природ. соедин.*, № 4, 481 – 490 (1991).
5. Патент Канады 1265523; *Chem. Abstr.*, **113**, 77902e (1990).
6. Европейский патент 339006; *Chem. Abstr.*, **112**, 197822e (1990).
7. Патент Франции 2568249; *Chem. Abstr.*, **105**, 172046v (1986).
8. Патент Японии 01131451; *Chem. Abstr.*, **112**, 138735x (1993).
9. А. П. Трощенко, Г. А. Кутикова, *Химия природ. соедин.*, № 14, 244 – 249 (1967).
10. Л. П. Попова, В. А. Оленева, О. Н. Григорьян, Л. П. Федорцова, в сб.: *"Биологически активные добавки - нутрицевтики и их использование с профилактической и лечебной целью при наиболее распространенных заболеваниях"*, Из-во ТГУ, Тюмень (1997), сс. 90 – 91.
11. Л. Н. Шишкина, *Исследование синтетических и природных антиоксидантов in vitro и in vivo*, Наука, Москва (1992), сс. 28 – 30.
12. Н. М. Сторожок, Н. Г. Храпова, Е. Б. Бурлакова, *Химическая кинетика*, **14**(11), 29 – 46 (1995).
13. Н. М. Эмануэль, *Успехи химии*, **50**(10), 1721 – 1809 (1981).
14. Н. М. Сторожок, И. В. Кутузова, *Хим.-фарм. журн.*, **29**(12), 37 – 41 (1995).
15. Н. М. Сторожок, И. В. Кутузова, *Вопр. мед. химии*, **42**(1), 15 – 21 (1996).
16. В. З. Ланкин, А. К. Тихазе, Г. Г. Коновалова и др., *Бюл. экп. биол. мед.*, **128**(9), 314 – 316 (1999).
17. Н. Г. Храпова, *Тез. докл. II Всесоюзн. конф. "Биоантиоксидант"*, Черногловка (1983), сс. 12 – 13.
18. N. Pras, K. J. Wichers, A. P. Bruins, et al., *Plant cell. Tissue organ. Celt.*, **13**(1), 15 – 26 (1988).
19. Е. Б. Бурлакова, Н. Г. Храпова, *Успехи химии*, **54**(9), 1540 – 1558 (1985).
20. Е. Б. Бурлакова, С. А. Крашаков, Н. Г. Храпова, *Биологические мембраны*, **15**(2), 137 – 167 (1998).
21. K. Mukai and Y. Okauchi, *Lipids*, **24**(11), 936 – 939 (1989).
22. K. Mukai, K. Fukuda, K. Tajima, et al., *J. Org. Chem.*, **53**(2), 430 – 432 (1988).
23. S. Nagaoka, Y. Okauchi, S. Urano, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **112**(24), 8921 – 8924 (1990).
24. А. А. Реморова, В. А. Рогинский, *Кинетика и катализ*, **32**(4), 808 – 813 (1991).

Поступила 23.02.99.