

**ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ  
ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ  
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ  
АРМЕНИЯ**

Հայաստանի քիմիական հանդես **60, №4, 2007** Химический журнал Армении

УДК 541.128.13

**ХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ  
АНТИОКСИДАНТОВ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ**

**Л. А. ТАВАДЯН**

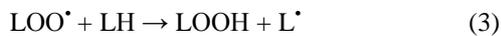
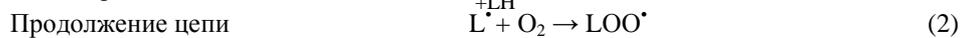
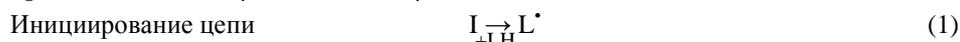
Институт химической физики им. А. Б. Налбандяна  
НАН Республики Армения, Ереван

Рассмотрены химические механизмы антирадикальной активности липидорастворимых антиоксидантов. Представлен новый механизм антирадикальной активации фенольных ОН- групп замещенных салицилат хелатов металлов. Рассмотрена антипероксирадикальная активность металлохелатов, действующих по механизму с переносом электрона. Обсуждены механизмы проявления антирадикальной емкости у полифенолов. Численным анализом многостадийных механизмов выявлены основные химические превращения, ответственные за анти- и прооксидантные свойства  $\alpha$ -токоферола в процессах пероксидного окисления липидов. Описаны новые проявления кинетического эффекта среды в реакции фенольных антиоксидантов с пероксильными радикалами.

Рис. 4, табл. 3, библиографические ссылки 54.

Образование высокорационноспособных компонентов (ВРК), включая свободные радикалы, является неотъемлемым атрибутом жизнедеятельности клеток биосистем. Регуляторами в процессах с участием ВРК являются антиоксиданты, сдерживающие «неконтролируемую» интенсификацию этих процессов, приводящих к патологиям «окислительного стресса» [1-6]. Антиоксиданты играют также ключевую роль в цепных свободно-радикальных процессах окисления липидов биомембран. Выявление химического механизма действия антиоксидантов является одной из важных задач при прогнозировании структур соединений и условий их использования с целью предотвращения или лечения патологий окислительного стресса. Одновременно решение этих задач тесно сопрягается с важной проблемой пищевой химии – прогнозированием оптимальных условий хранения и эксплуатации пищевых продуктов [7-9]. С вышеотмеченными задачами связан прогрессивно растущий интерес к химическим механизмам действия антиоксидантов биогенного и синтетического характера на реакции пероксидного окисления липидов.

Автоокисление молекулярным кислородом (пероксидация) липидов (LH) осуществляется посредством свободно-радикальной цепной реакции, которая может быть представлена совокупностью следующих основных стадий [5-9, 10-13]:

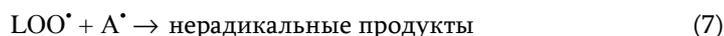


Цепная реакция пероксидного окисления липидов протекает достаточно интенсивно при сравнительно низких температурах из-за наличия слабых С-Н-связей метиленовой группы дивинилметанового фрагмента (-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH-) в составе молекул полиненасыщенных жирных кислот. Последние легко предоставляют атом водорода в реакции (3) продолжения цепи с пероксильными радикалами (LOO<sup>•</sup>).

Механизм действия большинства антиоксидантов (АН) пероксидного окисления липидов сводится к захвату носителей цепи – пероксильных радикалов, предоставлением лабильных атомов водорода, называемых «антиоксидантами, обрывающими цепи».



Образующийся радикал антиоксиданта А<sup>•</sup> в «классическом» представлении не способен продолжать цепь окисления и быстро взаимодействует со второй молекулой пероксильного радикала с образованием нерадикальных продуктов.



Детальные исследования механизма действия антиоксидантов, обрывающих цепи пероксидации липидов, позволили установить более сложную природу их антирадикального действия [5-13].

В настоящей статье приводится обзор работ, выполненных при участии автора, в которых представлены результаты исследований антипероксирадикальной активности соединений в зависимости от их структуры и особенностей реакционной среды. Приводятся также данные относительно механизма действия важнейшего биоантиоксиданта α-токоферола в реакции пероксидного окисления липидов, полученные с помощью численного кинетического метода анализа (ценностный анализ) сложных кинетических моделей реакций.

## Результаты и их обсуждение

### а) Активация антирадикальной реакционной способности 2-фенольных ОН-групп в хелатах переходных металлов.

Новый механизм активации 2-фенольной ОН-группы в металлохелатах выявлен при исследовании антипероксирадикальной активности хелатов 3,5-диизопропилсалицилатов (3,5-DIPS) с биогенными металлами (Cu, Fe и Zn). Эти липидорастворимые соединения обладают широким спектром биоактивности по отношению к различным патологиям окислительного стресса [14-16]. Салициловая кислота и ее замещенные производные не обладают измеряемой антипероксирадикальной активностью при температурах, близких к физиологическим, и ниже их ( $\leq 40^\circ\text{C}$ ) [14]. Это связано с наличием прочной внутримолекулярной водородной связи между фенольной и карбоксильной группами, представленной в схеме 1. Эта водородная связь препятствует участию фенольной ОН-группы в реакции с пероксильными радикалами. Между тем непосредственные измерения, проводимые на уровне элементарных реакций кинетическим методом ЭПР с импульсным введением реагентов [17], позволили обнаружить антитретбутилпероксирадикальную активность у хелатов металлов Cu(II), Zn(II) и Fe(III) с 3,5-DIPS [14]. Антипероксирадикальная активность, выраженная посредством величин констант скоростей реакций и аррениусовских параметров, представлена в табл. 1. Как и ожидалось, у 3,5-диизопропилсалициловой кислоты (3,5-DIPS кислота), как и у  $\text{Cu(II)}_2(\text{acetyl-3,5-DIPS})_4$ , где фенольный атом водорода замещен ацетильной группой, отсутствует измеряемая антипероксирадикальная активность.

Таблица 1

**Значения констант скоростей бимолекулярной реакции третбутилпероксильных (*t*-BuOO $\cdot$ ) радикалов с хелатами Cu(II), Fe(III) и Zn(II) с 3,5-DIPS в органической среде (гептан : толуол, 10 : 1). а – константы скорости измерены с точностью 7 $\pm$ 10%. б – коэффициент корреляции  $r^2$  при измерении аррениусовских параметров *E* и  $\lg A$  равен 0,94 $\pm$ 0,99. в – величины констант скорости реакций рассчитаны по уравнению Аррениуса. Руг – молекула пиридина**

Антиоксидант	$k, M^{-1} c^{-1}$		$E^6, \text{ кал/моль}$	$\lg A^6$
	Температура, $^\circ\text{C}$			
	-11	37 <sup>в</sup>		
3,5-DIPS кислота	< 0,1	< 0,1	–	–
Fe(III)(3,5-DIPS) <sub>3</sub>	41,21 <sup>а</sup>	66	1769	3,07
Zn(II)(3,5-DIPS) <sub>2</sub>	99,5	305	4510	5,66
Cu(II) <sub>2</sub> (3,5-DIPS) <sub>4</sub>	57,6	203	3890	5,05
Cu(II)(3,5-DIPS) <sub>2</sub> (Pyr) <sub>2</sub>	< 0,1	< 0,1	–	–
Cu(II) <sub>2</sub> (acetyl-3,5-DIPS) <sub>4</sub>	< 0,1	< 0,1	–	–

При взаимодействии хелатов Cu(II), Fe(III) и Zn(II) с 3,5-DIPS с пероксильными радикалами центральный атом металла непосредственно не участвует в химической реакции. Об этом свидетельствуют высокие отрицательные значения потенциалов окисления ( $E^0$ ) этих металлов. В частности, величины  $E^0_{\text{Cu(II)/Cu(III)}} = -2,6 \text{ V}$  при pH (7 (18),  $E^0_{\text{Fe(III)/Fe(IV)}} = -1,4 \text{ V}$  при pH (7 (19) (значительно меньше окислительного потенциала t-BuOO· радикалов,  $E^0_{\text{t-BuOO}^{\cdot}/\text{t-BuOO}^{\cdot}} = 0,7 \text{ V}$  (20). Однако центральный атом металла существенно повышает антипероксирадикальную активность этих хелатов, способствуя ослаблению внутримолекулярной водородной связи между фенольной OH и карбоксильной группами, тем самым повышая долю равновесной, антирадикально-активной формы хелатов со «свободной» фенольной OH-группой (схема 1).

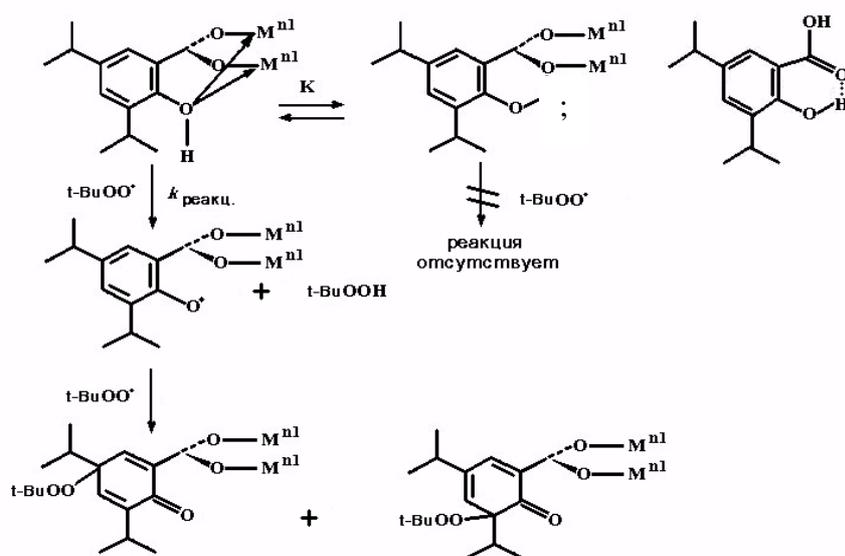


Схема 1. Схема, иллюстрирующая внутримолекулярную водородную связь в 3,5-DIPS кислоте и увеличение доли реакционноспособной «свободной» фенольной OH группы 3,5-DIPS лиганда в хелатах с атомами металлов (M со степенью окисления nI, где n = 2 или 3).

Образование «свободной» фенольной OH-группы сопровождается ее ковалентно-координированным связыванием атома кислорода фенольной OH-группы 3,5-DIPS лиганда с атомами металлов. Это также приводит к ослаблению энергии фенольной OH-связи, что дополнительно повышает ее реакционную способность по отношению к свободным радикалам.

Непосредственное участие фенольной OH-группы 3,5-DIPS лиганда в реакции с пероксильными радикалами показано методом FTIR. В продуктах реакций Cu(II)<sub>2</sub>(3,5-DIPS)<sub>4</sub> и Fe(III)(3,5-DIPS)<sub>3</sub> с цианизопропилпероксильными радикалами не обнаружен характерный для фенольной OH-группы пик поглощения ( $3275 \text{ см}^{-1}$ ), присутствующий в исходных

формах. В пользу повышения антирадикальной активности фенольной ОН-группы 3,5-DIPS лиганда дополнительно свидетельствуют следующие результаты.

1. Полоса FTIR поглощения фенольной ОН-группы в указанных металлохелатах находится в области 3400-3100  $\text{см}^{-1}$  с максимумом 3275  $\text{см}^{-1}$ . Эта величина ниже слабого пика поглощения фенольной ОН-группы, наблюдаемого в случае 3,5-DIPS кислоты (3650-3400  $\text{см}^{-1}$ ). Этот факт указывает на ослабление внутримолекулярной водородной связи между фенольной ОН и карбоксильными группами 3,5-DIPS лигандов. Об этом также свидетельствуют результаты рентгеноструктурного анализа монокристалла  $\text{Cu(II)}_2(3,5\text{-DIPS})_4$ , согласно которым, наблюдается увеличение расстояния между атомом водорода фенольной ОН-группы и атомами кислорода карбоксильных групп (21).

2. Методом дифференциальной импульсной вольтамперометрии (DPVA) в случае хелатов замещенных салицилатов с  $\text{Cu(II)}$  и  $\text{Zn(II)}(3,5\text{-DIPS})_2$  (рис. 1) непосредственно зарегистрированы как «свободная» (пик окисления 0,855 V отн.  $\text{Ag/Ag}^+$  н.в.), так и связанные внутримолекулярной водородной связью (пик окисления 1,100V отн.  $\text{Ag/Ag}^+$  н.в.) фенольные ОН-группы. Как и ожидалось, пик, относящийся к «свободной» фенольной ОН-группе, у 3,5-DIPS кислоты отсутствует.

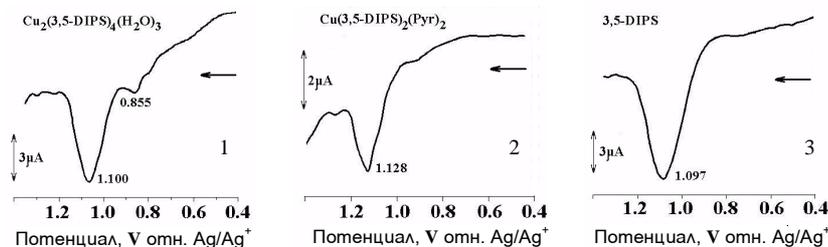
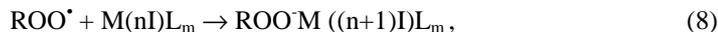


Рис. 1. Дифференциальные импульсные вольтамперограммы 0,1 mM  $\text{Cu(II)}_2(3,5\text{-DIPS})_4$  (1),  $\text{Cu(II)}_4(3,5\text{-DIPS})_2(\text{Pyridine})_2$  (2) и 3,5-DIPS кислоты (3) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .  $T=20^\circ\text{C}$ , вспомогательный электролит – тетрабутилперхлорат аммония.

*б) Антипероксирадикальная активность металлохелатов, действующих по механизму с переносом электрона*

В случае металлохелатов с выраженными восстановительными свойствами антипероксирадикальная активность проявляется в способности реагировать с пероксильными радикалами по механизму с переносом электрона:



где L – молекула лиганда.

Такие реакции свойственны, в частности, хелатам, где центральными металлами являются  $\text{Co(II)}$ ,  $\text{Mn(II)}$  и  $\text{Mn(III)}$  [14,22-24]. В табл. 2 приведены значения констант

скоростей реакций некоторых металлохелатов с *t*-BuOO<sup>•</sup> радикалами, измеренные кинетическим методом ЭПР с импульсным введением реагентов [14,23,24].

В табл. 2 приведены также количественные характеристики антипероксирадикальной активности представителей хелатов шиффовых оснований салицилидена (схема 2), которые проявляют высокую антиоксидантную *in vivo* биоактивность по отношению к различным патологиям, вызванным окислительным стрессом.

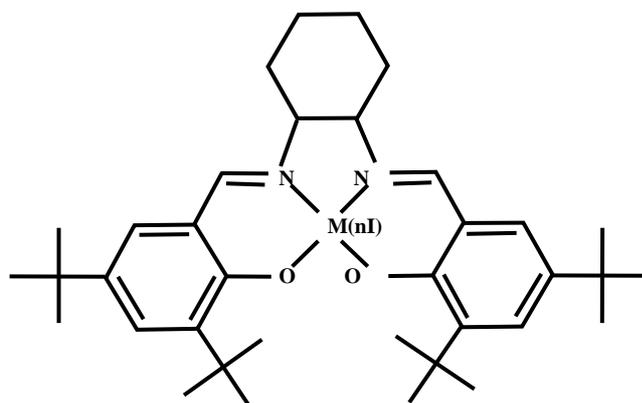


Схема 2. Структура (R<sub>1</sub>R)-(-)-N,N<sup>1</sup>-Bis(3,5-дитретбутилсалицилиден)-1,2-циклогександиамино M (nI), M (nI) (Co (II), Ni(II) и Mn(III))Cl (bschda M(nI)).

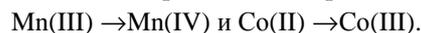
Таблица 2

**Значения констант скоростей реакций *t*-BuOO<sup>•</sup> радикалов с металлохелатами, протекающих по механизму с переносом электрона. Растворитель – гептан-толуол, 10:1. а – константы скоростей измерены с точностью 7±10%. б – коэффициент корреляции *r*<sup>2</sup> при измерении аррениусовских параметров *E* и lg*A* равен 0,94±0,98. в – величины констант скоростей реакций рассчитаны по уравнению Аррениуса. 1,10 - Phen - 1,10 – фенантролин. St – стеарат**

Антиоксидант	Константа скорости, <i>M</i> <sup>1</sup> <i>c</i> <sup>-1</sup>		<i>f</i>	<i>E</i> <sup>б</sup> , кал/моль	lg <i>A</i> <sup>б</sup>
	Температура, °C				
	-11	37 <sup>в</sup>			
Co(II)St <sub>2</sub> (1,10-Phen) <sub>2</sub>	6313 <sup>а</sup>	10633	0,20±0,03	1800	5,30
Mn(II)(3,5-DIPS) <sub>2</sub>	2302	3085	0,34±0,05	916	4,10
bschda Mn(III)	12560	22790	1,00±0,06	2085	5,87
bschda Co(II)	107800	479920	0,28±0,07	5142	9,31
bschda Ni(II)	< 0,1	< 0,1	–	–	–

В пользу механизма реакции, протекающей с переносом электрона, свидетельствует факт отсутствия измеряемой антипероксирадикальной активности у bschda Ni(II) со слабо выраженным восстановительным свойством: *E*<sup>0</sup><sub>Ni(II)/Ni(III)</sub> = -1,9 V [18]. Перенос электрона в

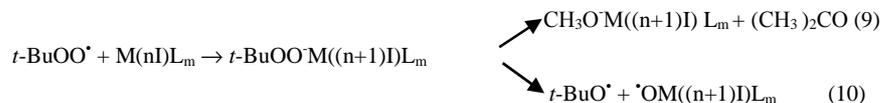
результате реакций исследованных металлохелатов с пероксильными радикалами установлен исследованиями ЭПР, УФ-Вид. спектроскопии и DPVA [14]. Так, в результате реакции  $Mn(II)(3,5-DIPS)_2$  с  $t-BuOO\cdot$  радикалами исчезает синглетный сигнал ЭПР  $Mn(II)$ , что обусловлено его окислением до  $Mn(III)$  [24]. У *bschda*  $Co(II)$  и  $Mn(III)$  в результате аналогичной реакции наблюдается существенное уменьшение интенсивности полосы поглощения, связанное с  $n-\pi^*$  переходом. Одновременно в результате реакций с пероксильными радикалами исчезают характерные пики окисления DPVA в области 0,7-1,25 V отн.  $Ag/Ag^+$  н.в. Эти факты свидетельствуют о протекании в результате реакций исследованных металлохелатов с пероксильными радикалами процессов окисления:



Кинетическим методом ЭПР с импульсным введением реагентов с использованием свободно-радикального титрования определены соотношения стехиометрических коэффициентов исходных компонентов реакции (8). Это соотношение характеризует свободно-радикальную емкость антиоксиданта ( $f$ ). Оно определяется количеством израсходованных пероксильных радикалов ( $\Delta[t-BuOO\cdot]$ ) на единицу количества антиоксиданта:

$$f_r = \Delta[t-BuOO\cdot]/[AO\cdot]_0 \quad (I)$$

Как следует из данных, приведенных в табл. 2, для  $Co(II)St_2(1,10-Phen)_2$  и  $Mn(II)(3,5-DIPS)_2$  значения  $f < 1$ . Это связано с тем, что образующийся в результате реакций металлохелатов с пероксильными радикалами комплекс с переносом заряда лабилен и распадается по двум каналам (9) и (10), образуя, в одном случае, нерадикальные продукты, а в другом – свободные радикалы. Последние в конечном итоге в реакционной среде генерируют заново пероксильные радикалы, обуславливая значения  $f < 1$ .



В случае хелатов шиффовых оснований салицилидена – *bschda*  $Co(II)$  и  $Mn(III)$ , значения  $f$  близки к единице. По существу у этих соединений отсутствует прооксидантное проявление (стадия (10)) в реакции с пероксильными радикалами. Предполагается, что этот факт связан с сильным электронодонорным влиянием лигандов на атом металла. Это, в свою очередь, приводит к образованию в реакции с пероксильными радикалами комплексов с выраженным ионным характером, что способствует преимущественному их распаду по стадии (9) с образованием нерадикальных продуктов.

в) Орто-влияние в кинетическом эффекте среды в реакциях пероксильных радикалов с фенольными антиоксидантами

В основе кинетического эффекта среды [25-28], именованного таким образом К.У. Ингольдом [27], лежат результаты, относящиеся к понижению реакционной способности фенолов и ароматических аминов по отношению к свободным радикалам в присутствии в реакционной среде электронодонорных соединений. Последние образуют межмолекулярные водородные связи с фенольными ОН и аминными N(R)H-группами, тем самым блокируя реакционные центры. При этом антирадикальная активность этих соединений обусловлена участием в реакции равновесной формы, где фенольная ОН-группа не связана межмолекулярной водородной связью. Как это представлено в схеме 3 на примере пара-метилфенола [14] (гидрокситолуол, НТ), связанная межмолекулярной водородной связью с молекулой среды (этилацетат) молекула НТ не реагирует с пероксильными радикалами. Кинетический эффект среды выявлен и подробно рассмотрен также на уровне исследований элементарных реакций с участием фенольных соединений и пероксильных [14,26], а также алкоксильных радикалов [27].

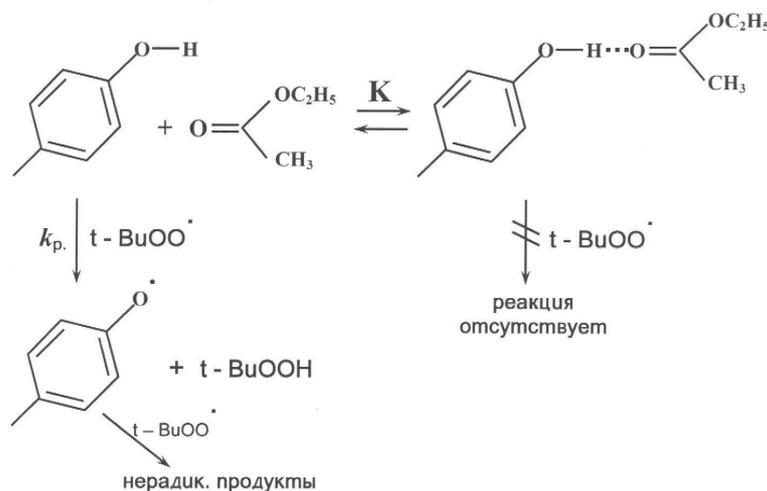


Схема 3. Влияние межмолекулярной водородной связи между молекулами НТ и этилацетата на реакцию НТ с  $t\text{-BuOO}^\bullet$  радикалами.

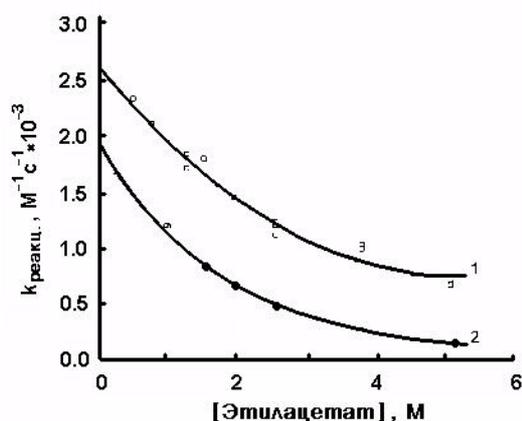


Рис. 2. Влияние добавок этилацетата в гептан на значение константы скорости реакции  $t\text{-BuOO}\cdot$  радикалов с ВНТ(1) и НТ(2) при  $-31,5^\circ\text{C}$ .

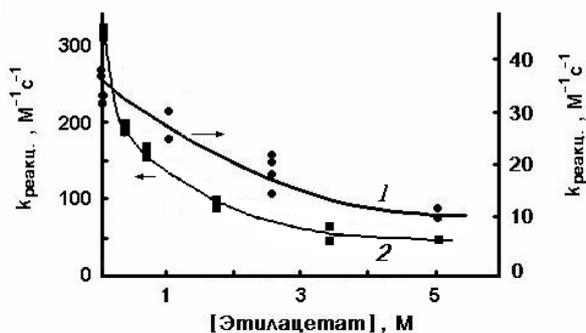


Рис. 3. Влияние добавок этилацетата в гептан на значение константы скорости реакции  $t\text{-BuOO}\cdot$  радикалов с  $\text{Cu}(\text{II})_2(3,5\text{-DIPS})_4$  (1) и ванилином (2) при  $-31,5^\circ\text{C}$ .

Из данных рис. 2 и 3 [14] видно, что присутствие 5 М этилацетата в гептане снижает значение эффективной константы скорости ( $k_{\text{эф}} = 2k_p/(1+K)$ ) реакции НТ с  $t\text{-BuOO}\cdot$  радикалами более чем в 20 раз. Между тем, при наличии такой же концентрации этилацетата в гептане значения эффективных констант скоростей реакций  $t\text{-BuOO}\cdot$  радикалов с 2,6-третбутил-4-метилфенолом (бутилированный гидрокситолуол, ВНТ) и с  $\text{Cu}(\text{II})_2(3,5\text{-DIPS})_4$  уменьшаются всего лишь в 3-4 раза. Это, главным образом, связано с проявлением стерического орто-эффекта. Наличие громоздких групп в 2 и 6 положениях по отношению к фенольной ОН-группе создает стерические затруднения при образовании межмолекулярной водородной связи, что понижает кинетический эффект среды, где присутствуют электронодонорные соединения.

Орто-метоксизамещенные фенолы представляют достаточно обширный класс природных биоантиоксидантов, таких, как убихинол-10, большое число флавоноидов и пр. К таким соединениям относится также 4-окси-3-метоксибензальдегид – ванилин. Измеренная кинетическим методом ЭПР с импульсным введением реагентов константа скорости бимолекулярной реакции  $t\text{-BuOO}\cdot$  радикалов с ванилином при  $-31,5^\circ\text{C}$  равна  $k = 317 \text{ M}^1\text{c}^1$ . Измеренная константа скорости реакции обусловлена реакцией  $t\text{-BuOO}\cdot$  радикалов с более реакционноспособной, чем альдегидная группа, фенольной ОН-группой ванилина, поскольку величина константы скорости реакции  $t\text{-BuOO}\cdot$  радикалов с 4-метоксибензальдегидом при  $-31,5^\circ\text{C}$  значительно ниже:  $k = 0,71 \text{ M}^1\text{c}^1$  [17]. Данная величина константы скорости реакции  $t\text{-BuOO}\cdot$  радикалов с ванилином в 26 раз меньше значения константы скорости реакции  $t\text{-BuOO}\cdot$  радикалов с пара-метоксифенолом ( $k = 8,32 \cdot 10^3 \text{ M}^1\text{c}^1$ ) [29]. Это обусловлено наличием внутримолекулярной водородной связи между атомом водорода фенольной ОН-группы и атомом кислорода орто-метоксильной группы (схема 4). При этом внутримолекулярная водородная связь в молекуле ванилина сравнительно слабая ( $D_{\text{H}\cdots\text{O}} = 3,8 \text{ ккал/моль}$  [30-33]) из-за нелинейной трехатомной структуры  $\text{O}\cdots\text{H}-\text{O}$  и создаваемых ограничений при образовании внутримолекулярной водородной связи и соответственно при сближении атомов Н и О. Этим объясняется достаточно высокая антирадикальная активность ванилина. По той же причине, согласно расчетам, в реакции с пероксильными радикалами одновременно участвуют находящиеся в равновесии как «свободные», так и связанные внутримолекулярной водородной связью фенольные ОН-группы (схема 4).

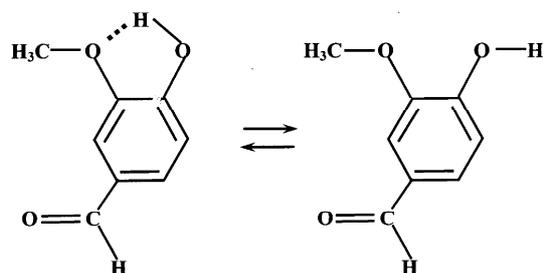


Схема 4. Структурная формула ванилина, иллюстрирующая образование внутримолекулярной водородной связи.

Между тем, что очень важно, внутримолекулярная водородная связь в молекуле ванилина защищает реакционный центр антиоксиданта – фенольную ОН-группу от блокирования электронодонорной молекулой среды. Как следует из рис. 4, при введении в гептан 5М этилацетата величина константы скорости реакции  $t\text{-BuOO}\cdot$  радикалов с ванилином понижается в 3,3 раза, тогда как в случае пара-метилфенола, как отмечалось выше, она понижается более чем в 20 раз.

### г) Опосредственный кинетический эффект среды

Как упоминалось, одним из проявлений кинетического эффекта среды является снижение антирадикальной активности фенольных соединений в результате образования межмолекулярной водородной связи между фенольной ОН-группой и электронодонорной молекулой среды. Между тем, нами обнаружен *опосредственный кинетический эффект среды* в реакции  $t\text{-BuOO}\cdot$  радикалов с  $\text{Cu(II)}_2(3,5\text{-DIPS})_4$ . В данном случае электронодонорные молекулы среды (пиридин, Pyr) при их низких концентрациях непосредственно не связываются с реакционным центром – фенольной ОН-группой. Напротив, молекулы пиридина аксиально координируются с центральным атома металла хелата, способствуя внутримолекулярной пространственной переориентации фенольной ОН-группы с образованием прочной внутримолекулярной водородной связи между атомами водорода фенольных ОН-групп и атомами кислорода карбоксильных групп (схема 5).

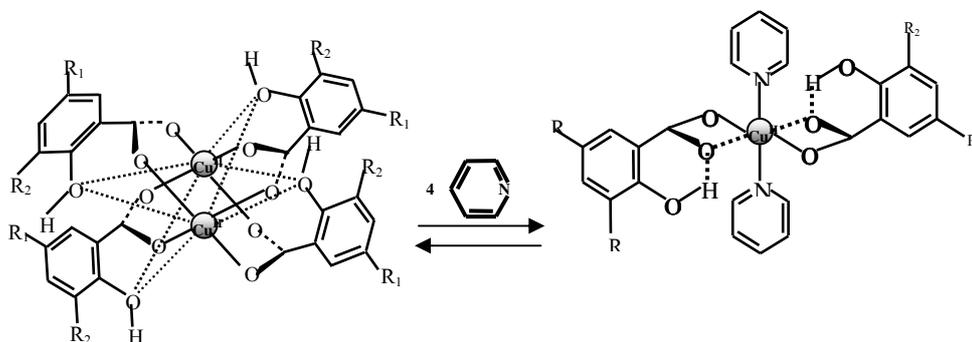


Схема 5. Механизм образования внутримолекулярной водородной связи в молекуле  $\text{M(II)}(3,5\text{-DIPS})_2$  при аксиальном координировании двух молекул пиридина.

В пользу этого свидетельствует практическое отсутствие пика окисления в дифференциальных импульсных вольтамперограммах у  $\text{Cu(II)}(3,5\text{-DIPS})_2(\text{Pyr})_2$  (рис. 1), отнесенного к «свободным» от внутримолекулярной водородной связи фенольным ОН-группам. При этом не обнаруживается антипероксирадикальная активность у  $\text{Cu(II)}(3,5\text{-DIPS})_2(\text{Pyr})_2$ . По существу атомы металлов в хелатах выступают в качестве «посредников» при проявлении кинетического эффекта среды в реакции лигандов металлохелатов с пероксильными радикалами.

### д) Антирадикальная емкость 2 и/или 6 полифенолов

Наличие нескольких гидроксильных групп в бензольном кольце реализовано в структурах большого класса природных антиоксидантов, таких, как флавоноиды, [8,34-39], содержащиеся в фруктах, овощах, чае, кофе и пр. Установлена их высокая реакционная

способность по отношению к свободным радикалам, в некоторых случаях превышающая таковую для  $\alpha$ -токоферола.

Нами посредством свободно-радикального титрования, осуществляемого кинетическим методом ЭПР с импульсным введением реагентов, определены антипероксирадикальные емкости некоторых полифенолов (катехол, флавоноид-катехин и пропилгалат) (схема 6 и табл. 3).

Таблица 3

**Антипероксирадикальные емкости ( $f$ ) катехола, катехина и пропилгалата. Растворитель – бутанол-гептан, 2:1. а – измерены титрованием  $t$ -BuOO $\cdot$  радикалами. б – определены кинетическими исследованиями цепных реакций окисления липидов [38,39]**

Антиоксидант	$f_r^a$	$f_r^b$ [38,39]
катехол	2,1	2,3
катехин	–	5,7
пропилгалат	2,5	1,87

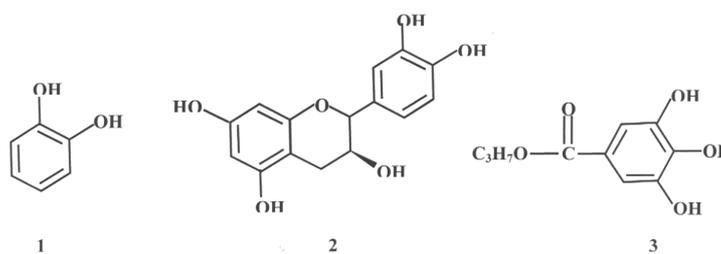


Схема 6. Структурные формулы катехола (1), катехина (2) и пропилгалата (3).

Как видно из данных, величины антипероксирадикальной емкости  $f$  существенно меньше их максимально возможных значений, равных удвоенному числу фенольных ОН-групп в молекулах полифенолов. По-видимому, причина в том, что в молекулах, образующихся в результате реакции с пероксильными радикалами хилолидных пероксидов, атом водорода гидроксильной группы сравнительно инертен по отношению к свободно-радикальной атаке из-за наличия прочной внутримолекулярной водородной связи (схема 7). Такое предположение обосновано, поскольку теоретическими исследованиями установлено значительное упрочнение внутримолекулярной водородной связи в образующемся феноксильном радикале вследствие вклада орто-семихинонного радикала в его структуру (схема 7) [30-32]. Именно этим объясняются высокие значения констант скоростей реакций полифенолов со свободными радикалами. Рассчитанные значения энергий внутримолекулярных водородных связей в исходной молекуле катехола и образующемся радикале составляют 3,8 и 9,1 ккал/моль, соответственно. И тем не менее, строгое выявление механизмов антирадикальной активности полифенолов требует проведения более детальных

кинетических исследований, в частности, с идентификацией промежуточных и конечных продуктов реакций.

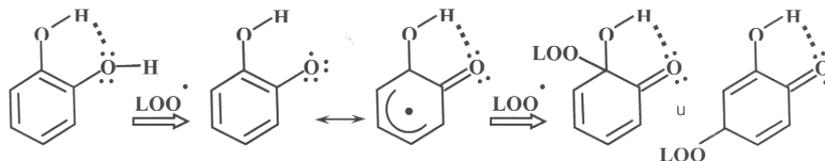


Схема 7. Образование хинолидных пероксидов в реакции катехола с пероксильными радикалами.

*е) Анти- и прооксидантные активности  $\alpha$ -токоферола в реакции пероксидного окисления липидов*

$\alpha$ -Токоферол (ТН) (схема 8) признан важнейшим антиоксидантом, регулирующим процессы пероксидного окисления и окислительной деструкции полиненасыщенных жирных кислот в пище, биологических мембранах и других липидсодержащих структурах [5,6,9,12,13,40-43].

В простейшем толковании  $\alpha$ -токоферол действует как антиоксидант по механизму обрыва цепей реакций окисления липидов, предоставляя водород фенольной гидроксильной группы носителям цепи  $LOO\cdot$  радикалам, в результате чего образуется менее реакционноспособный  $\alpha$ -токофероксильный радикал ( $T\cdot$ ) (реакция (5)). Далее  $T\cdot$  радикалы быстро реагируют с  $LOO\cdot$  или же с  $T\cdot$  радикалами, образуя нерадикальные продукты (реакции (6), (7)). Однако кинетические исследования выявили намного более сложную картину механизма антиоксидантного действия  $\alpha$ -токоферола в процессах пероксидного окисления липидов.  $\alpha$ -Токоферол в этих реакциях проявляет как анти-, так и прооксидантные свойства. Одним из свидетельств одновременного проявления этих свойств является сложная зависимость периода торможения реакции пероксидного окисления липидов от исходной концентрации  $\alpha$ -токоферола. Период торможения реакции вначале растет с увеличением концентрации  $\alpha$ -токоферола, а далее практически не изменяется или же падает [6,9,40-43]. Пример такой зависимости периода торможения реакции от исходной концентрации  $\alpha$ -токоферола представлен на рис. 4.

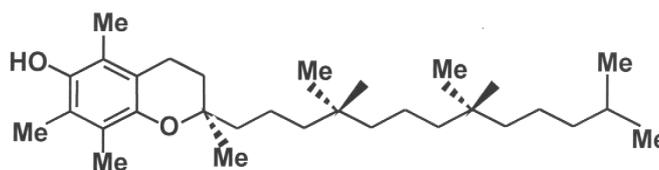


Схема 8. Структура  $\alpha$ -токоферола (5,7,8-триметилтокол).

Строгое выявление химических причин сложного механизма действия  $\alpha$ -токоферола стало возможным при численном исследовании реакции окисления модельного липида – метиллинолеата, в присутствии  $\alpha$ -токоферола [42]. Расширенная кинетическая модель данной реакции включала 53 элементарные стадии, описывающие химию окислительных превращений  $\alpha$ -токоферола. Одновременно реакционный механизм численно анализировался ценностным методом. Данный метод, основанный на гамильтоновой систематизации многостадийных механизмов реакций, позволяет в динамике численно выявлять ценностные вклады – кинетические значимости отдельных стадий и компонентов сложных реакций [42,44-49].

Детальный анализ механизма реакции окисления метиллинолеата выявил базовый механизм, состоящий из 27 стадий, включая 17 стадий окисления  $\alpha$ -токоферола. Базовый механизм количественно описывает большой массив экспериментальных кинетических данных, представленных в работах [40, 50] (рис. 4).

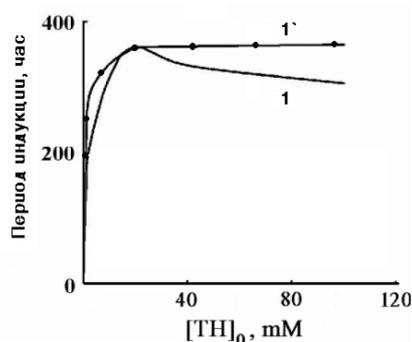
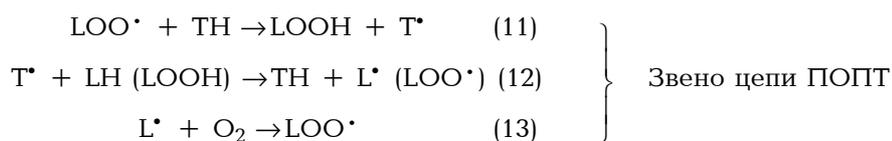


Рис. 4. Зависимость периода индукции реакции пероксидного окисления метиллинолеата от исходной концентрации  $\alpha$ -токоферола при 50°C. 1,1' – расчетные и экспериментальные [40] данные, соответственно.

Ценностный анализ механизма реакции позволил также выявить основные реакции с участием  $\alpha$ -токоферола и радикалов  $T^{\cdot}$ . Реакция окисления липидов в присутствии  $\alpha$ -токоферола является цепной, где в качестве носителей цепей наряду с  $LOO^{\cdot}$  выступают и  $T^{\cdot}$  радикалы (пероксидное окисление посредством  $\alpha$ -токоферола (ПОПТ)) [51, 52].



Обрыв цепи осуществляется в реакции между  $T^{\cdot}$  и  $LOO^{\cdot}$  радикалами:



Одновременно существенную роль играет реакция автоиницирования с участием молекул  $TH$  и  $LOOH$ .



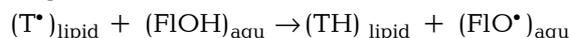
Реализация цепного процесса ПОПТ обусловлена наличием слабых метиленовых СН-связей дивинилметанового фрагмента молекул липидов.  $D_{\text{с-н}} = 76 \text{ ккал/моль}$ , тогда как энергия фенольной ОН связи в молекуле  $\alpha$ -токоферола составляет  $D_{\text{т-н}} = 79 \text{ ккал/моль}$  [10], т.е. лимитирующая стадия (12) ПОПТ экзотермична –  $\Delta H^\circ = -3 \text{ ккал/моль}$ . Ингибирование цепной реакции окисления липидов в присутствии  $\alpha$ -токоферола обусловлено образованием namного бoльшей концентрации  $\text{T}^\bullet$  радикалов, чем концентрация  $\text{LOO}^\bullet$  радикалов, в результате чего радикалы  $\text{T}^\bullet$  с бoльшей вероятностью вступают в реакции с другими радикалами, приводящие к обрыву цепи и соответственно к уменьшению длины цепи реакции.

Запределивающие, порой проходящие через максимум зависимости периода индукции реакции окисления липидов от исходной концентрации ТН обусловлены двумя причинами.

1. С ростом начальной концентрации ТН растет отношение  $[\text{T}^\bullet] / [\text{LOO}^\bullet]$  и соответственно увеличивается отношение скоростей реакций продолжения цепи ПОПТ ( $t_{\text{попт}}$ ) (стадии 11-13) и обрыва цепи ( $t_{\text{обр}}$ ), т.е. повышается длина цепи ПОПТ ( $(t_{\text{попт}} = t_{\text{попт}} / t_{\text{обр}})$ ). Это приводит к компенсации антиоксидантного действия ТН.

2. С увеличением исходной концентрации ТН одновременно растет скорость реакции автоиницирования с участием молекул ТН и LOOH, также сдерживающей антиоксидантное проявление ТН.

Следует отметить, что в биосистемах прооксидантное действие ТН за счет протекания ПОПТ контролируется другими соантиоксидантами, такими, как аскорбиновая, мочевая кислоты, убихинол-10, флавоноиды (FLOH) и др.[53,54]. В большинстве случаев реакция между  $\text{T}^\bullet$  радикалом и соантиоксидантом, приводящая к регенерации ТН, протекает на границе раздела фаз липид-вода. В случае соантиоксидантов-флавоноидов имеет место следующая реакция [36,37]:



Флавоноидный феноксильный радикал FLO $\cdot$  чаще всего вне липидной фазы реагирует с другими радикалами, образуя нерадикальные продукты.

На основании приведенных данных можно заключить, что выявление химических механизмов проявления антиоксидантных свойств, включая антирадикальные, липидорастворимых соединений в значительной степени способствует осуществлению сознательного выбора биоантиоксидантов, предохраняющих биомембраны от патологий окислительного стресса. Такая задача актуальна и при окислительной стабилизации пищевых продуктов. В этой области интересны работы, направленные на выявление зависимостей антиоксидантных свойств соединений от их молекулярной структуры. Представляется важным выявление на уровне исследований элементарных реакций новых особенностей кинетического эффекта среды.

Актуальными являются также работы, направленные на изучение химических механизмов синергизма и/или антогонизма совместного действия двух и более антиоксидантов в зависимости от их молекулярного строения и состава композиций. В этом

случае становится неизбежным использование численных методов анализа многостадийных механизмов реакций с привлечением компьютеров.

В заключение пользуюсь возможностью выразить благодарность моим коллегам Дж.Соренсон, Ф.Гринавей, Р.Валкер, А.Камал-Элдин, С.Г.Минасяну, А.Г.Тоникяну, М.З.Мусаеляну А.А.Хачояну и Л.А.Арутюнян, плодотворное сотрудничество с которыми сделало возможным написание данного обзора.

## **ԼԻՊԻԴՆԵՐԻ ՊԵՐՕՔՍԻԴԱՑՄԱՆ ՀԱՎԱՕՔՍԻԴՆԵՐԻ ՀԱՎԱՌԱԴԻՎԱԼԱՑԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՔԻՄԻԱԿԱՆ ՄԵԽԱՆԻԶՄՆԵՐԸ**

**Լ. Ա. ԹԱՎԱԴՅԱՆ**

Դիտարկվում են լիպիդալուծ հակաօքսիդիչների հակառադիկալային ակտիվության քիմիական մեխանիզմները; ներկայացվում է մետաղական տարրերի տեղակալված սալիցիլատ խելատների ֆենոլային OH-խմբերի հակառադիկալային ակտիվության աճի նոր մեխանիզմը; դիտարկվում է էլեկտրոնի փոխանցման մեխանիզմով գործող մետաղախելատների հակապերօքսիռադիկալային ակտիվությունը; քննարկվում են պոլիֆենոլների հակառադիկալային տարողունակության արտահայտման մեխանիզմները; բազմափուլ մեխանիզմների թվային վերլուծությամբ բացահայտվել են այն հիմնական քիմիական փոխարկումները, որոնցով պայմանավորված են լիպիդների պերօքսիդացման պրոցեսներում  $\alpha$ -տոկոֆերոլի հակաօքսիդիչ և օքսիդացման նպաստող հատկությունները; նկարագրվում են պերօքսիլ ռադիկալների հետ ֆենոլային հակաօքսիդիչների ռեակցիայում միջավայրի կինետիկական էֆեկտի նոր արտահայտությունները:

## **THE CHEMICAL MECHANISMS OF THE ANTIRADICAL ACTIVITY OF ANTIOXIDANTS OF LIPIDS PEROXIDATION**

**L. A. TAVADYAN**

The chemical mechanisms of the antiradical activity of lipido-soluble antioxidants were considered: a new mechanism of antiradical activation of phenolic OH-groups of the substituted salicylate chelates of the metals is given; the antiperoxyradical activity of the metallochelates was considered acting according to the mechanism of electron transfer; the mechanisms of the manifestation of the antiradical capacity by the polyphenols were discussed; the main chemical conversions responsible for anti- and prooxidant properties of  $\alpha$ -tocopherol in the processes of lipid peroxidation were revealed by the numerical value analysis of multistep mechanisms; the new manifestations of the kinetic media effect among the reactions of phenolic antioxidants with peroxy radicals were described.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Haliwell B., Gutteridge J.M.C.* Free Radical in Biology and Medicine. // Oxford University Press, Oxford, 1998.
- [2] *Эмануэль Н.М.* Кинетика экспериментальных опухолевых процессов. М., Наука, 1977.
- [3] *Togokuni S.* // Pathology International, 1999, v.49, p.91.
- [4] *Finkel T., Holbrook N.J.* // Nature, 2000, v.408, p. 239.
- [5] *Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньшикова Е.Б.* Окислительный стресс. Маик, Наука, Интерпериодика, 2001.
- [6] *Бурлакова Е.Б., Каршаков С.А., Храпова Н.Г.* // Биол. мембраны, 1998, т.15, с.137.
- [7] Autooxidation in food and biological systems. Eds Simic M.G., Karel M. Plenum Press, New-York-London, 1980.
- [8] *Rice-Evans C.A., Packer L.* Flavonoids in health and disease. Marcel Dekker, Inc., New-York, 1998.
- [9] *Kamal-Eldin A. Appelqvist L.-A.* // Lipids, 1996, v.31, p.671.
- [10] *Denisov E.T., Denisova T.G.* Handbook of antioxidants: bond dissociation energies, rate constants, activation energies and enthalpies of reactions. CRC Press, Boca Bation, 2<sup>nd</sup> ed, 2000.
- [11] *Денисов Е.Т., Азатян В.В.* Ингибирование цепных реакций. ИПХФ РАН, Черноголовка, 1997.
- [12] *Burton G.W., Ingold K.U.* // J.Amer.Chem.Soc., 1981, v.103, p.6472.
- [13] *Burton G.W., Doba T., Gabe E., Hughes L., Lee F.L., Prasad L., Ingold K.U.* // J.Amer.Chem.Soc., 1985, v.107, p.7053.
- [14] *Tavadyan L.A., Tonikyan H.G., Minasyan S.H., Harutyunyan L.A., Greenaway F.T., W.Cliams S., Gray-Kaufman R.A., Sorenson J.R.J.* // Inorg.Chim.Acta, 2002, v.328, p.1.
- [15] *Tavadyan L.A., Sedrakyan G.Z., Minasyan S.H., Greenaway F.T., Sorenson J.R.J.* // Trans. Metal. Chem., 2004, v.29, p.684.
- [16] *Tavadyan L.A., Tonikyan A.G., Minasyan S.H., Harutyunyan L.A., Greenaway F.T., Sorenson J.R.J.* // Labell. Cpd. Radiopharm., 2001, v.44, p.787.
- [17] *Tavadyan L.A., Mardoyan V.A., Musaelyan A.B.* // Int. J. Chem.Kinet., 1996, v.28, p.555.
- [18] *Buckingham D.A., Sargeson A.M.* Oxidation – reduction potentials as functions of donor atom and ligand, in Dwyer F.P., Mellor D.P.(Eds) Chelating Agents and Metal Chelates, Acad.Press, New York, 1964, p.237.
- [19] *Bossmann S.H., Oliveros E., Go B.S., Siegwart S., Dahlen E.P., Payawan L., Straub J.M., Worner M., Braun A.M.* // J.Phys. Chem. A, 1998, v.102, p.5542.
- [20] *Brinck T., Lee H., Jonsson M.* // J.Phys. Chem. A., 1999, v.103, p.7094.
- [21] *Morgant G., Dung N.-H., Daran J.-C., Viostat B., Labouze X., Roch-Arveiller M., Greenaway F.T., Cordes W., Sorenson J.R.J.* // Inorg. Biochem., 2000, v.81, p.11.
- [22] *Howard J.A., Tait J.C., Yamada J.H.B.* // Can.J.Chem., 1981, v.59, p.2184.
- [23] *Тавадян Л.А., Мардоян В.А., Налбандян А.Б.* // Арм. хим. ж., 1986, т. 39, №3, с. 137.
- [24] *Tavadyan L.A., Tonikyan H.G., Musaelyan M.V., Barsegyan A.E., Sorenson J.R.J.* // Int. J. Chem. Kinet., 2007, v.39, N8, p.431.
- [25] *Эмануэль Н.М., Заиков Г.Е., Майзуз З.К.* Роль среды в радикально-цепных реакциях окисления органических соединений. М., Наука, 1973.
- [26] *Тавадян Л.А., Мардоян В.А., Налбандян А.Б.* // Химическая физика, 1986, т.5, N 10, с.1377.
- [27] *Avila D.V., Ingold K.U., Lusztuk J.* // J. Amer. Chem.Soc., 1995, v.117, p.2929.
- [28] *Barclay I.R.C., Edwards C.E., Vinqvist M.R.* // J. Amer. Chem.Soc., 1999, v.121, p.6226.
- [29] *Тавадян Л.А., Мардоян В.А., Налбандян А.Б.* // Химическая физика, 1985, т.4, N8, с.1107.
- [30] *Wright J.S., Johnson E.R., Dilabio G.A.* // J. Amer. Chem.Soc., 2001, v.123, p.1173.

- [31] Foti M.C., Johnson E.R., Vinqvist M.R., Wright J.S., Barclay L.R.C., Ingold K.U. // J.Org.Chem., 2002, v.67, p.5190.
- [32] Korth H.G., de Heer M.I., Mulder P. // J. Phys. Chem. A, 2002, v.106, p.8779.
- [33] Wang L.-F., Zhang H.-Y. // Biorg. Chem., 2005, v.33, p.108.
- [34] Cao G., Sofic E., Prior R.L. // Free Radic. Biol. And Medic., 1997, v.22, p.749.
- [35] Hanasaki Y., Ogawa S., Fukui S. // Free Radic. Biol. And Medic., 1994, v.16, p.845.
- [36] Zhou B., Wu L.-M., Yang L., Liu Z.-L. // Free Radic. Biol. And Medic., 2005, v.38, p.408.
- [37] Mukai K., Mitani S., Ohara K., Nagaoka S.-I. // Free Radic. Biol. And Medic., 2005, v.38, p.1243.
- [38] Roginsky V., Lissi E.A. // Food Chem., 2005, v.92, p.235.
- [39] Roginsky V. // Archives of Biochem. And Biophys., 2003, v.414, p. 261.
- [40] Mukai K., Noborio S., Nagaoka S.I. // Int. J. Chem. Kinet., 2005, v.37, p.605.
- [41] Наумов В.В., Васильев Р.Ф. // Кинетика и катализ, 2003, т.44, с.111.
- [42] Tavadyan L.A., Khachoyan A.A., Martoyan G.A., Kamal-Eldin A. // Chem. Phys. Lipids, 2007, v.147, p.30.
- [43] Kasaikina O.T., Kashkay A.M., Maximova T.V. // Oxid. Comm., 2000, v.23, N3, p.383.
- [44] Тавадян Л.А., Мартоян Г.А. Анализ кинетических моделей химических реакционных систем. Ценностный подход. Ереван, Изд. Гитутюн НАН РА, 2005.
- [45] Martoyan G.A., Tavadyan L.A. // Lecture Notes in Computer Science, Springer-Verlag, 2003, v.2658, p.600.
- [46] Tavadyan L.A. , Martoyan G.A. // Lecture Notes in Computer Science, Springer-Verlag, 2003, v.2658, p.593.
- [47] Тавадян Л.А., Мартоян Г.А., Минасян С.Г. // Кинетика и катализ, 2003, т.44, с.100.
- [48] Тавадян Л.А., Мартоян Г.А., Минасян С.Г. // Кинетика и катализ, 2003, т.44, с.490.
- [49] Tavadyan L.A., Khachoyan A.A., Martoyan G.A., Minasyan S.H. // Lecture Notes in Computer Science, Springer-Verlag, 2005, v.3485, p.1012.
- [50] Kamal-Eldin A., Makinen M., Lampi A., Hopia A. // Eur. Food Res. Technol., 2002, v.214, p.52.
- [51] Bowry V.W., Stocker R. // J. Amer. Chem. Soc., 1993, v.115, p. 6029.
- [52] Bowry V.W., Ingold K.U. // Acc. Chem. Res., 1999, v.90, p.45.
- [53] Niki E., Saito T., Kawakami A., Kamiya Y. // J. Biol. Chem., 1984, v.259, p.4177.
- [54] Thomas S.R., Neuzil J., Mohr D., Stoker R. // Amer. J. Clin. Nutr., 1995, v.62, p.13578.