

«Остеомед» при переломах способствует уменьшению сроков иммобилизации. Это позволяет проводить раньше реабилитацию при перело-

мах, т.е. раньше реабилитироваться и приступить к работе, что, вне всякого сомнения, имеет важное народнохозяйственное значение.

### Химические науки

#### КИНЕТИКА ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДНЫХ СУБСТРАТОВ В ПРИСУТСТВИИ КАПОТЕНА В БЕЗВОДНОЙ И ВОДНО-ЭМУЛЬСИОННОЙ СРЕДАХ

Перевозкина М.Г.

ФГБОУ ВПО «Государственный аграрный университет Северного Зауралья», Тюмень,  
e-mail: mgperevozkina@mail.ru

Исследована антиоксидантная активность капотена(1-[(2S)]-3-меркапто-2-метилпропионил]-L-пролина) в сравнении со стандартными антиоксидантами дибунолом (ионолом) и а-токоферолом в безводных инициированных и водно-липидных катализируемых субстратах. Установлена высокая антиоксидантная активность капотена в водно-эмульсионной среде. Показано участие капотена в процессе разрушения гидропероксидов молекулярным путем.

В настоящее время развитие гипертонической и ишемической болезней связывают с изменением интенсивности свободно-радикального окисления липидов биомембран [1, 2, 3]. Поэтому, при сердечно-сосудистой патологии применяют антиоксидантотерапию. В связи с этим, актуальной является проблема предварительного тестирования антиоксидантных свойств гипотензивных препаратов.

**Целью работы** являлось тестирование антиоксидантной активности капотенапри различных способах инициирования в безводных и водно-эмульсионных средах в сравнении с реперными антиоксидантами дибунолом и а-токоферолом.

#### Экспериментальная часть

Антиоксидантную активность (АОА) изучали манометрическим методом поглощения кислорода в модифицированной установке типа Варбурга при окислении метиллинолеата (МЛИ) в присутствии триметилцетиламмоний бромида (ЦТМАБ) в качестве поверхностно-активного вещества (ПАВ) при концентрации  $1 \cdot 10^{-3}$  М, с добавками растворов хлорида меди (II) в количестве  $2 \cdot 10^{-3}$  М при  $t = (60 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ . Соотношение воды и эфира составляло 3:1, а общий объем пробы 4 мл [4, 5]. Кинетику поглощения кислорода в безводной среде изучали в среде инертного растворителя хлорбензола, процесс инициировали за счет термического разложения азо-бис-изо-бутиронитрила (АИБН) в концентрации  $6 \cdot 10^{-3}$  М. В качестве критериев оценки антиоксидантных свойств соединений использовали – периоды индукции, начальные и максимальные скорости окисления. Графи-

ческим методом определяли величину периода индукции ( $t_i$ ), представляющей собой отрезок оси абсцисс, отсекаемый перпендикуляром, опущенным из точки пересечения касательных, проведенных к кинетической кривой. Эффективность торможения процесса окисления липидного субстрата определяется совокупностью реакций ингибитора и обозначает его антиоксидантную активность, количественно определяемой по формуле  $AOA = t_i - t_s/t_s$ , где  $t_s$  и  $t_i$  – периоды индукции окисления субстрата в отсутствие и в присутствии исследуемого антиоксиданта (АО) соответственно. Кинетику накопления гидропероксидов изучали при аутоокислении метиллолеата (МО) методом обратного йодометрического титрования в среде хлорбензола при  $t = (60 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ . В качестве реперных ингибиторов использовали а-токоферол (а-ТФ) и дибунол, при этом концентрации АО были сравнимыми. Критическую концентрацию мицеллообразования ЦТМАБ изучали методами Ребиндера и рефрактометрическим.

#### Результаты и их обсуждение

Капотен представляет собой 1-[(2S)]-3-меркапто-2-метилпропионил]-L-пролин и является тиолом. Препарат применяют при лечении легкой и умеренной гипертонии, а также при тяжелых формах сердечно-сосудистых заболеваний. Химическая структура капотена позволяет прогнозировать его ингибирующую активность за счет восстановления гидропероксидов меркаптогруппой или хелатирования катализатора. Впервые антиоксидантные свойства капотена были показаны в нашей работе [6]. Представляло интерес исследовать антиоксидантную активность капотена в процессе окисления метиллинолеата в условиях инициирования в среде хлорбензола и катализа в водно-эмульсионной среде.

Была изучена кинетика окисления МЛ в растворе хлорбензола в присутствии широкого диапазона концентраций капотена ( $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-1}$ ) М. Показано, что капотен в безводной среде проявляет сложный механизм действия, обусловленный его вероятным участием в реакциях обрыва, продолжения и зарождения цепей. Влияние капотена заключается в том, что при одних концентрациях происходит уменьшение максимальной скорости, при других – наблюдается промотирование процесса окисления. Из табл. 1. видно, что начальные и максимальные скорости процесса меняются экстремально: снижаются с увеличением концентрации до  $1 \cdot 10^{-4}$  М (соответствует соотношению инициатора и капотена 60:1) и увеличиваются при дальнейшем её повышении.

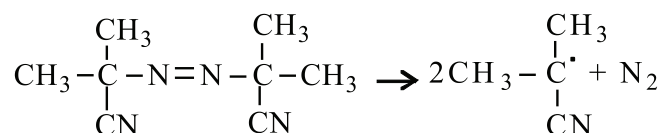
Таблица 1

Кинетические параметры окисления метиллинолеата в безводной среде в присутствии  $6 \cdot 10^{-3}$  М АИБН в зависимости от концентрации капотена,  $t = 60^\circ\text{C}$

№ п/п	[InH], М·с	t, мин	$W_{\text{нач}} \cdot 10^{-8}$ , М·с <sup>-1</sup>	$W_{\text{max}} \cdot 10^{-7}$ , М·с	$\frac{[\text{АИБН}]}{[\text{InH}]}$
1	Контроль МЛ	20	6,0	2,2	—
2	$1 \cdot 10^{-6}$	42	5,0	1,9	6000:1
3	$5 \cdot 10^{-6}$	36	4,7	1,8	1200:1
4	$5 \cdot 10^{-5}$	90	4,5	1,7	120:1
5	$1 \cdot 10^{-4}$	44	4,5	1,7	60:1
6	$5 \cdot 10^{-4}$	36	4,9	2,0	12:1
7	$1 \cdot 10^{-3}$	20	6,0	2,2	6:1
8	$1 \cdot 10^{-2}$	30	7,2	2,4	1:1,7
9	$1 \cdot 10^{-1}$	22	8,0	2,8	1:17

Характер воздействия капотена на процесс инициированного окисления МЛ может быть объяснен его участием в радикальном

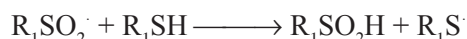
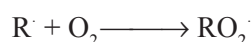
процессе. Известно [7], что инициатор распадается с образованием радикалов по реакции:



Радикал инициатора ( $R_1\cdot$ ) конкурентно взаимодействует с метиллинолеатом (RH) или с меркаптогруппой капотена ( $R_1\text{SH}$ ) по реакциям:



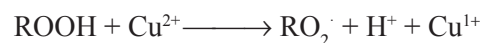
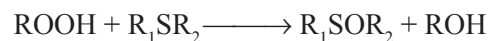
Далее радикалы метиллинолеата ( $R\cdot$ ) и тиола ( $R_1\text{S}\cdot$ ) взаимодействуют с кислородом по реакциям:



Наблюдаемое увеличение суммарной скорости процесса при высоких концентрациях тиола, вероятно, происходит за счет вклада более быстрого окисления тиола по сравнению с окислением жирно-кислотных компонентов липидов. Снижение максимальной скорости без торможения начальных стадий окисления при небольших добавках капотена может быть связано с участием соединения в реакциях продолжения цепей.

В сравнении была изучена кинетика каталитического окисления МЛ в водно-эмульсионной среде в присутствии ( $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-1}$ ) М капотена. Показано, что все добавки тормозят процесс окисления, хотя степень и характер влияния зависит от концентрации. Низкие концентрации капотена ( $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-3}$ ) М пропорционально уменьшают начальную и максимальную скорости процесса. При концентрациях  $1 \cdot 10^{-3}$  М

и выше происходит торможение начальных стадий процесса, увеличение периода индукции и достижение максимальной скорости процесса после выхода из периода индукции (табл. 2). Характер влияния капотена на кинетику каталитического окисления МЛ может быть объяснен следующим образом. Капотен может участвовать в реакциях обрыва цепей, обеспечивая ингибирования процесса окисления. Снижение скорости окисления под влиянием капотена может быть обусловлено его конкурентным участием с катализатором в молекулярном распаде гидропероксидов, что сказывается на снижении скорости разветвления цепей и скорости процесса в целом.



Значимое торможение с последующим достижением максимальной скорости процесса начинается при соотношениях катализатора и капотена 1:1 и усиливается при соотношениях 1:5 и 1:50. Очевидно, что в этих условиях происходит нейтрализация катализатора за счет его восстановления в  $\text{Cu}^{1+}$ . При большом избытке тиола восстановление  $\text{Cu}^{2+}$  в  $\text{Cu}^{1+}$  происходит быстрее, наблюдается эффективное торможение процесса окисления.

Для подтверждения гипотезы о возможном разрушении гидропероксидов под действием капотена, был проведен эксперимент по прямому тестированию кинетики накопления

гидропероксидов (ROOH) после введения капотена в частично окисленный субстрат (время эксперимента 8 часов). В течение первого часа наблюдалось снижение концентрации гидро-

пероксидов, в контрольном опыте ROOH продолжали накапливаться. Установлено, что все исследуемые добавки капотена способствовали разрушению гидропероксидов на 50–75%.

Таблица 2

Кинетические параметры окисления метиллинолеата в водно-эмульсионной среде в присутствии  $2 \cdot 10^{-3}$  М  $\text{CuCl}_2$  в зависимости от концентрации капотена,  $t = 60^\circ\text{C}$

№ п/п	[InH], М	t, мин	$W_{\text{н}} \cdot 10^{-5}$ , М·с	$W_{\text{мак}} \cdot 10^{-4}$ , М·с	$\frac{[\text{CuCl}_2]}{[\text{InH}]}$
1	Контроль	5	14,4	2,6	–
2	$1 \cdot 10^{-6}$	8	7,6	1,6	2000:1
3	$1 \cdot 10^{-5}$	15	6,9	1,0	200:1
4	$1 \cdot 10^{-4}$	26	6,2	1,6	20:1
5	$1 \cdot 10^{-3}$	45	3,6	1,7	2:1
6	$1 \cdot 10^{-2}$	95	2,1	1,7	1:5
7	$1 \cdot 10^{-1}$	395	0,6	1,7	1:50

Сопоставление результатов двух методов (манометрического, йодометрического) показывает, что максимальное снижение начальной и максимальной скорости окисления происходило в присутствии капотена при концентрации  $(1-10) \cdot 10^{-4}$  М. Таким образом, указанные методы

адекватно оценивают свойства исследуемого соединения и позволяют полагать, что разрушение гидропероксидов под действием капотена осуществлялось нерадикальным путем, поскольку вторичного инициирования процесса не наблюдалось.

Таблица 3

Кинетические параметры окисления метиллинолеата в растворе хлорбензола в присутствии  $6 \cdot 10^{-3}$  М АИБН в зависимости от концентрации а-токоферола и дибунула,  $t = 60^\circ\text{C}$

№ п/п	[InH], М	t, мин	$W_{\text{нач}} \cdot 10^{-8}$ , М·с <sup>-1</sup>	$W_{\text{мак}} \cdot 10^{-7}$ , М·с <sup>-1</sup>
I	Контроль МЛ	15	4,3	2,6
II	а-токоферол			
1	$1 \cdot 10^{-8}$	17	4,3	2,3
2	$1 \cdot 10^{-7}$	20	3,6	2,0
3	$1 \cdot 10^{-6}$	35	2,5	1,9
4	$1 \cdot 10^{-5}$	44	2,3	1,8
5	$1 \cdot 10^{-4}$	67	1,1	1,8
6	$5 \cdot 10^{-4}$	120	0,5	2,0
7	$1 \cdot 10^{-3}$	350	0,6	1,7
8	$1 \cdot 10^{-2}$	405	0,5	1,8
9	$1 \cdot 10^{-1}$	420	0,2	1,8
III	дибунол			
1	$1 \cdot 10^{-6}$	35	4,3	2,5
2	$1 \cdot 10^{-5}$	45	3,4	2,4
3	$2 \cdot 10^{-5}$	80	2,8	2,2
4	$5 \cdot 10^{-5}$	140	2,4	2,2
5	$1 \cdot 10^{-4}$	170	2,1	2,1
6	$2 \cdot 10^{-4}$	190	1,9	2,0
7	$5 \cdot 10^{-4}$	280	1,7	1,9
8	$8 \cdot 10^{-4}$	590	1,6	1,9
9	$1 \cdot 10^{-3}$	650	1,6	1,8

Для доказательства свободно-радикального механизма каталитического окисления липидного субстрата использован метод ингибиторов. Прове-

дено исследование закономерностей окисления метиллинолеата в присутствии добавок стационарных ингибиторов окисления дибунула и а-токоферола.

По результатам эксперимента рассчитаны кинетические параметры окисления субстратов.

В нашем исследовании показан идентичный характер кинетических кривых окисления метиллинолеата в растворе хлорбензола в присутствии  $6 \cdot 10^{-3}$  М инициатора и водно-эмульсионной системе в присутствии  $2 \cdot 10^{-3}$  М хлорида меди при равных концентрациях дибунола. Показано, что в водно-эмульсионной среде дибунол проявляет себя как сильный ингибитор: наблюдается период полного торможения, период аутоускорения и достижение максимальной скорости окисления. Периоды индукции увеличиваются пропорционально увеличению концентрации дибунола (табл. 3, 4). Наличие торможения в присутствии добавок дибунола является признаком радикально-цепного механизма процесса, а отсутствие комплексообразующей способности с катионами меди из-за экранированности двумя трет.бутильными заместителями его донорно-акцепторного центра.

По наклону прямой в координатах  $t$ , [InH] была рассчитана скорость инициирования в обеих системах, получены значения  $4,8 \cdot 10^{-8}$  и  $1,9 \cdot 10^{-5}$  М·с<sup>-1</sup> в безводной и водно-эмульсионной среде соответственно. Сравнение максимальных скоростей окисления МЛ в безводной

и водно-эмульсионной средах равных  $1,3 \cdot 10^{-7}$  и  $2,6 \cdot 10^{-4}$  М·с<sup>-1</sup> соответствует различию скоростей инициирования ~ в 1000 раз.

Известно, что а-токоферол характеризуется чрезвычайно высокой константой скорости реакции с пероксильными радикалами  $k_7 = (3,3-3,5) \cdot 10^6$  М<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup>, что на два порядка превышает аналогичные константы скорости для дибунола  $k_7 = 2,6 \cdot 10^4$  М<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup> [8]. Между тем вопрос о роли а-токоферола в биомембранах далек от своего решения. Известен сложный механизм действия а-токоферола в безводных углеводородных и липидных субстратах, его участие не только в реакциях обрыва цепей, но и реакциях продолжения цепей и распаде гидропероксидов. Последние реакции приводят к снижению антиоксидантной активности а-токоферола. Антиоксидантную активность а-токоферола в нашем эксперименте оценивали по характеру изменения кинетических параметров по сравнению с дибунолом, для которого установлен механизм ингибирования процесса окисления в углеводородах за счет только реакций обрыва цепей [9, 10]. Анализ кинетических кривых окисления метиллинолеата показал существенные отличия механизма действия а-токоферола от дибунола в зависимости от концентрации.

Таблица 4

Кинетические параметры окисления метиллинолеата в водно-эмульсионной среде в присутствии  $2 \cdot 10^{-3}$  М CuCl<sub>2</sub> в зависимости от концентрации а-токоферола и дибунола,  $t = 60^\circ\text{C}$

№ п/п	[InH], М	$t$ , мин	$W_{\text{нач}} \cdot 10^{-5}$ , М·с <sup>-1</sup>	$W_{\text{max}} \cdot 10^{-4}$ , М·с <sup>-1</sup>
I	Контроль МЛ	5	14,4	2,6
II	а-токоферол			
1	$1 \cdot 10^{-8}$	10	14,0	2,1
2	$1 \cdot 10^{-7}$	15	11,0	2,1
3	$1 \cdot 10^{-6}$	20	9,7	1,9
4	$1 \cdot 10^{-5}$	25	6,8	1,8
5	$1 \cdot 10^{-4}$	35	5,2	1,4
6	$1 \cdot 10^{-3}$	15	14,6	3,2
7	$1 \cdot 10^{-2}$	6	15,7	3,4
8	$1 \cdot 10^{-1}$	5	16,8	5,7
III	дибунол			
1	$1 \cdot 10^{-6}$	30	13,8	2,5
2	$1 \cdot 10^{-5}$	40	12,7	2,3
3	$2 \cdot 10^{-5}$	75	9,8	2,1
4	$5 \cdot 10^{-5}$	130	5,0	1,9
5	$1 \cdot 10^{-4}$	160	4,1	1,8
6	$2 \cdot 10^{-4}$	180	3,8	1,7
7	$5 \cdot 10^{-4}$	270	3,1	1,6
8	$8 \cdot 10^{-4}$	430	2,3	1,6
9	$1 \cdot 10^{-3}$	590	1,9	1,5

Кинетические кривые окисления метиллинолеата в безводной среде в присутствии ( $1 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-5}$ ) М а-токоферола имеют аутоускоренный характер без периода полного тормо-

жения. В этом интервале концентраций начальные скорости тем меньше, чем больше добавки а-токоферола, при всех концентрациях достигается одинаковая максимальная скорость. Пери-

од полного торможения появляется только при концентрациях  $1 \cdot 10^{-4}$  и  $5 \cdot 10^{-4}$  М и меняется пропорционально концентрации. При дальнейшем повышении концентрации а-токоферола увеличивается начальная скорость окисления, сокращается период полного торможения, максимальная скорость достигается тем позже и при более высоких концентрациях поглощенного кислорода, чем выше концентрация а-токоферола. Результаты расчета начальной  $W_{нач}$  максимальной  $W_{max}$  скоростей и периода индукции приведены в табл. 3. Из табл. 3 видно сохранение близких  $W_{max}$  при концентрациях а-токоферола от  $1 \cdot 10^{-7}$  до  $1 \cdot 10^{-1}$  М и десятикратное снижение  $W_{нач}$ . Представленные результаты свидетельствуют о сложном механизме действия а-ТФ в безводном растворе МЛ, об его участии не только в реакциях обрыва, но и реакциях продолжения цепей.

Было показано, что а-токоферол в ВЭС проявлял слабые антиоксидантные свойства, в концентрациях свыше  $1 \cdot 10^{-3}$  М промотировал процесс окисления липидных субстратов, при концентрации  $1 \cdot 10^{-8}$  М а-ТФ только незначительно уменьшал максимальную скорость, без заметного влияния на начальные стадии окисления. Таким же образом влияли добавки  $1 \cdot 10^{-7}$  и  $1 \cdot 10^{-6}$  М а-ТФ. В присутствии  $1 \cdot 10^{-5}$  и  $1 \cdot 10^{-4}$  М а-ТФ наблюдалось замедление начальных стадий окисления и уменьшение максимальной скорости (табл. 4). Причиной ускорения процесса может быть комплексообразование ОН-группы а-токоферола с катионами меди. В процессе окисления а-токоферол образует достаточно активные токофероксильные радикалы ( $In^{\cdot}$ ), способные участвовать в побочных реакциях продолжения цепей с молекулами субстрата (RH) [8]:



В результате этой реакции восстанавливается активная фенольная форма антиоксиданта, взаимодействующая в дальнейшем с пероксильными радикалами, ведущими цепи окисления:



Полученные данные могут представлять интерес с точки зрения расширения спектра фармакологического действия капотена и быть методологической основой для разработки новых

подходов оценки взаимодействия антиоксидантов с компонентами клетки.

#### Выводы

1. Установлено, что синтетический ингибитор окисления дибунол в двух кинетических моделях в безводной и водно-липидной средах превосходит по своему действию природный антиоксидант а-токоферол.

2. Выявлена высокая антиоксидантная активность капотена в водно-липидных катализируемых субстратах, превышающая ингибирующие свойства а-токоферола и уступающая активности дибунола.

3. Установлено, что капотен в процессе окисления разрушает гидропероксиды молекулярным путем. Вероятно, что способность разрушения гидропероксидов капотеном связана с наличием меркаптогруппы.

#### Список литературы

1. Бурлакова Е.Б. Молекулярные механизмы действия антиоксидантов при лечении сердечно-сосудистых заболеваний // Кардиология. – 1980. – № 8. – С. 48–52.
2. Владимиров Ю.А., Сулова Т.Б., Оленев В.И. Митохондрии. Транспорт электронов и преобразование энергии. – М.: Наука, 1976. – 109 с.
3. Сулова Т.Б., Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах // Биологические мембраны. – М., 1973. – С. 75–93.
4. Ушкалова В.Н., Первозкина М.Г., Барышников Э.В. Разработка способа тестирования средств антиоксидантной терапии // Свободно-радикальное окисление липидов в эксперименте и клинике. – Тюмень: Из-во Тюм. ГУ, 1997. – С. 77–82.
5. Первозкина М.Г. Каталитическое окисление липидов в водных растворах в присутствии солей металлов переменной валентности // Актуальные проблемы теоретической, экспериментальной, клинической медицины и фармации: матер. 35-й Всерос. науч. конф. – Тюмень, 2001. – С. 55–57.
6. Физико-химические закономерности окисления липидных субстратов под действием гипотензивных препаратов / М.Г. Первозкина, В.В. Тихонова, Г.Д. Кадочникова, Н.В. Иоанидис, И.Р. Киршинбаум, М.Ж. Шафер, В.Н. Ушкалова // В сб.: Свободно-радикальное окисление липидов в эксперименте и клинике. – Тюмень, Из-во Тюм.ГУ, 1997. – С. 104–113.
7. Van Hook I.P., Tobolsky A.U. The thermal decomposition of 2,2'-azo-bis-iso-buthironitril // J. Amer. Chem. Soc. – 1958. – Vol. 80. – № 4. – P. 779–782.
8. Бурлакова Е.Б., Крашаков С.А., Храпова Н.Г. Кинетические особенности токоферолов как антиоксидантов. – Черногловка, 1992. – 56 с.
9. Денисов Е.Т. Элементарные реакции ингибиторов окисления // Успехи химии. – 1973. – Т. 42. – № 3. – С. 361–390.
10. Денисов Е.Т. Константы скорости гомолитических жидкофазных реакций. – М.: Наука, 1971. – 711 с.

#### Биологические науки

#### ГИПОБИОЛОГИЯ. К ВОПРОСУ ОБ ОБЕЗВОЖИВАНИИ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ЕСТЕСТВЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ

Угаров Г.С., Алексеев Р.З.

Северо-Восточный федеральный университет  
имени М.К.Аммосова, Якутск

Гипобиология это наука, изучающая особое состояние у живых организмов, известного под названием *гипобиоз*, наступающего

под действием холода и других неблагоприятных факторов среды, так или иначе, вызывающие снижение функциональной активности на фоне общего обезвоживания организма [1]. Основным механизмом наступления состояния гипобиоза у живых организмов является обезвоживание организма, которое способствует к повышению устойчивости организма к неблагоприятным факторам среды. Обезвоживание может быть физическим и физиологическим.