

УДК 543.2:542.943:544.773.32

**КИНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПРОБЛЕМЕ ТЕСТИРОВАНИЯ
АНТИОКСИДАНТОВ.****С. 2. ВОДНО-ЛИПИДНАЯ МОДЕЛЬ**

Журавлева Л.А., Крайник В.В., Ушкалова В.Н.

Сургутский государственный университет ХМАО – Югры, Сургут

Подробная информация об авторах размещена на сайте

«Учёные России» - <http://www.famous-scientists.ru>

В настоящей работе приведены результаты разработки и оценки эффективности водно-липидной кинетической модели тестирования антиоксидантов. Путем исследования мицеллообразования в двух- и трехкомпонентных системах (метиллинолеат : вода; этилолеат : вода; этилолеат : вода : ПАВ) разработан оптимальный состав водно-липидного субстрата, исследована эффективность стандартных подходов и оригинального математического метода расчета кинетических параметров тестирования антиоксидантов. Модель апробирована на примере стандартного, синтетического и природного ингибиторов – ионола, α -токоферола и капотена. Для качественной оценки эффективности тестируемых антиоксидантов предложен метод внешнего стандарта (ионол как внешний стандарт). Для количественной оценки – математические критерии: w_n , w_{max} , τ_1 , τ_2 , a .

В последние 30 лет получила признание гипотеза свободнорадикального механизма развития многих патологий путем нарушения проницаемости биомембран за счет изменения интенсивности свободнорадикального окисления липидов и полярности биомембран [4, 8]. Поэтому в медицине развивается метод антиоксидантотерапии для профилактики и лечения различных патологий [6, 7]. Очевидно, что прогресс в антиоксидантотерапии возможен на основе разработки способов тестирования эффективности водорастворимых антиоксидантов.

Как показано в предыдущем сообщении, большинство известных способов тестирования антиоксидантов рассчитано на безводную среду, применение в качестве субстратов этилбензола, кумола или их растворов в хлорбензоле [5, 9]. Приведены результаты тестирования природных и синтетических липидрастворимых антиоксидантов с помощью кинетической метиллинолеатной модели.

Для тестирования водорастворимых биоантиоксидантов известно применение биологических субстратов: микросом, суспензий митохондрий или желточных про-

теинов, модельных системы липосом, сформированных из раствора яичного лецитина в глициновом буфере [11, 12]. Однако, эти способы имеют качественный характер и не позволяют получать количественные, воспроизводимые результаты из-за нестандартности субстратов, а также невозможности оценивать механизм действия антиоксидантов из-за неизвестного механизма окисления субстратов.

В настоящей работе приведены результаты разработки и оценки эффективности кинетической водно-липидной модели тестирования антиоксидантов. С этой целью разработан оптимальный состав водно-липидного субстрата, исследована эффективность стандартных подходов при тестировании антиоксидантов в безводных растворах, а также оригинального кинетического подхода. Модель апробирована на примере стандартного, синтетического и природного ингибиторов – ионола, α -токоферола и капотена.

Методы эксперимента

Условия окисления и волюмометрических измерений, получение метиллинолеата, очистка ионола (2, 6-дитретбутил-4-метилфенола), капотена (1-[(2S)-3-

метилпропионил]-L-пролина), α -токоферола (2, 5, 7, 8-тетраметил-2-(4, 8, 12-триметилтридецил)-6-оксихроман) описаны в предыдущем сообщении (сообщ. 1). Этилолеат получали из олеиновой кислоты марки «ч.» путем реакции этерификации пятикратным избытком абсолютного спирта в кислой среде с последующей экстракцией эфиром и вакуумной перегонкой [3]. Цетилтриметиламмоний бромид марки «х.ч.» используют без дополнительной очистки. Хлорид меди очищают кристаллизацией, используют бидистиллированную воду.

Результаты исследования

Для разработки способа тестирования водорастворимых антиоксидантов исследовано мицеллообразование в двух- и трехкомпонентных системах: вода – эти-

лолеат или метиллинолеат, вода – ПАВ, вода – ПАВ – эфир. В качестве ПАВ исследуют цетилтриметиламмоний бромид, додецилсульфонат натрия. По наименьшей величине критической концентрации мицеллообразования $(1-3) \cdot 10^{-3}$ моль/л в качестве эмульгатора выбран цетилтриметиламмоний бромид. Большинство последующих экспериментов проведено с этилолеатом, как более доступным субстратом. Поскольку большинство промышленных инициаторов не совместимы с водой, то для ускорения процесса окисления использованы катализаторы. Для оценки их эффективности исследована кинетика окисления этил-олеата в присутствии солей CuCl_2 , FeCl_2 , FeCl_3 , CoCl_2 , NiCl_2 в зависимости от концентрации. Результаты приведены на рис. 1.

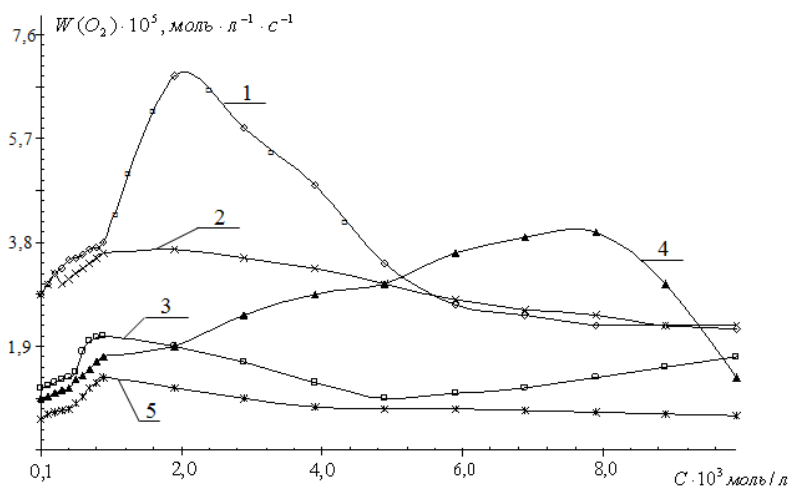


Рис. 1. Зависимость скорости окисления МЛ от концентрации катионов: 1 – Cu^{2+} ; 2 – Fe^{2+} ; 3 – Fe^{3+} ; 4 – Co^{2+} ; 5 – Ni^{2+}

Из рисунка видна экстремальная зависимость скорости окисления от концентрации исследованных катализаторов. Для большинства катализаторов, кроме катионов кобальта максимум соответствует концентрациям $(1-2) \cdot 10^{-3}$ моль/л. Для катионов кобальта максимальная скорость окисления достигается при концентрации $(6-8) \cdot 10^{-3}$ моль/л. Наиболее эффективным является хлорид меди, который выбран в качестве рабочего катализатора.

Каталитическая активность исследованных солей падает в ряду: $\text{Cu}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Fe}^{3+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$. В целом, по

результатам проведенных исследований подобран состав субстрата, который содержит эмульсию этилолеата в воде в соотношении 1 : 3 (по объему), добавки цетилтриметиламмония бромиды и хлорида меди в концентрациях $(1-3) \cdot 10^{-3}$ моль/л.

Для оценки возможности тестирования антиоксидантов исследована кинетика окисления указанного субстрата в присутствии стандартного синтетического ингибитора – ионола в зависимости от его концентрации. Типичные кинетические кривые (КК) приведены на рис. 2.

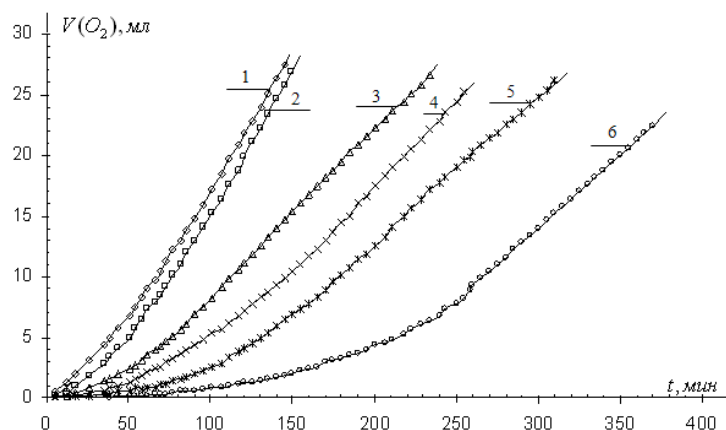


Рис. 2. Кинетические кривые каталитического окисления ЭО: 1 – контроль; 2 – $1 \cdot 10^{-5}$; 3 – $2 \cdot 10^{-5}$; 4 – $5 \cdot 10^{-5}$; 5 – $1 \cdot 10^{-4}$; 6 – $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л ионола

Из рисунка видно, что ионол тормозит процесс окисления водно-липидного субстрата пропорционально концентрации.

По описанной в предыдущем сообщении методике вычислены значения fK_{t5} при разных концентрациях ионола. Результаты приведены в табл. 1.

Таблица 1.

Результаты вычисления fK_{t5} на ионоле при окислении водно-липидного субстрата

Концентрация ионола, моль/л	$W_{O_2}^{энал}$, моль·л ⁻¹ ·с ⁻¹	fK_{t5} , л·моль ⁻¹ ·с ⁻¹
$1 \cdot 10^{-5}$	$1,4 \cdot 10^{-5}$	$2,1 \cdot 10^3$
$2 \cdot 10^{-5}$	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^3$
$5 \cdot 10^{-5}$	$8,8 \cdot 10^{-6}$	$6,6 \cdot 10^2$
$1 \cdot 10^{-4}$	$5,9 \cdot 10^{-6}$	$4,9 \cdot 10^2$
$5 \cdot 10^{-4}$	$2,2 \cdot 10^{-6}$	$2,7 \cdot 10^2$

Из таблицы видно изменение значений fK_{t5} примерно в 10 раз при изменении концентрации ионола \sim в 10 раз, что свидетельствует о сложном механизме его действия в водно-липидном субстрате. Поскольку параметр fK_{t5} не может служить

критерием эффективности ингибитора в водно-липидном субстрате, то результаты эксперимента обработаны путем аппроксимации КК методом наименьших квадратов и последующего их дифференцирования. Результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2.

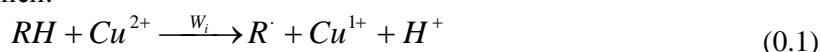
**Кинетические параметры окисления
водно-липидного субстрата в присутствии ионола**

C_{InH} , моль/л	$W_{нач.}$, моль·л ⁻¹ ·с ⁻¹	$W_{max.}$, моль·л ⁻¹ ·с ⁻¹	a_2 , моль·л ⁻¹ ·с ⁻²	τ_1 , МИН	τ_2 , МИН
контроль	$(7,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	$(1,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$	$(2,5 \pm 0,7) \cdot 10^{-8}$	20±2	85±2
$1 \cdot 10^{-5}$	$(7,4 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$(2,2 \pm 0,6) \cdot 10^{-8}$	40±1	85±2
$2 \cdot 10^{-5}$	$(4,9 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$	$(8,6 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(5,7 \pm 0,8) \cdot 10^{-9}$	50±5	120±2
$5 \cdot 10^{-5}$	$(2,4 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$	$(9,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(6,2 \pm 0,6) \cdot 10^{-9}$	80±2	175±2
$1 \cdot 10^{-4}$	$(1,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(8,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(6,2 \pm 0,7) \cdot 10^{-9}$	120±3	210±2
$5 \cdot 10^{-4}$	$(1,4 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$	$(8,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$	$(6,2 \pm 0,7) \cdot 10^{-9}$	180±2	350±3

В качестве критериев эффективности и механизма действия ингибитора в водно-липидном субстрате использованы описанные ранее кинетические параметры: начальная ($W_{нач.}$), максимальная ($W_{max.}$) скорости окисления, периоды полного торможения (τ_1) и окончания ускорения (τ_2), ускорение (a). По начальной скорости и периоду полного торможения судят об эффективности обрыва цепей на ингибиторе. По уменьшению максимальной скорости окисления с увеличением концентрации ингибитора судят об участии продуктов превращения ингибитора в реакциях обрыва цепей. По уменьшению величины ускорения с увеличением концентрации

ингибитора судят об участии продуктов его превращения в реакциях разветвления цепей. Период окончания ускорения характеризует выход процесса на максимальную скорость и полный расход ингибитора. Кинетические параметры, приведенные в табл. 2 свидетельствуют о сложном механизме действия ионола в водно-липидном субстрате и о возможном его участии в реакциях продолжения и разветвления цепей. Тогда возможная схема механизма каталитического окисления водно-липидного субстрата в присутствии ионола включает дополнительные реакции:

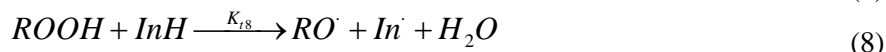
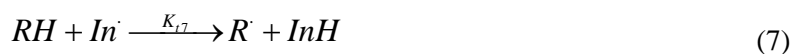
Инициирование цепей:



Разветвление цепей:



Обрыв цепей:



Таким образом, предлагаемый метод позволяет не только оценить эффективность ингибитора, но и сделать предположение о механизме его действия.

α -токоферол относят к важнейшим биоантиоксидантам, регулирующим интенсивность свободнорадикального окисления липидов биомембран и отвечающего за их проницаемость и формирование патологий [1, 10, 13]. В предыдущем сообще-

нии (сообщ. 1) приведены высокие значения fK_{t5} для α -токоферола в стироле и этилбензоле [2], а также показано, что в растворе метиллинолеата он действует по сложному механизму, как слабый ингибитор. В литературе мы не встречали данных об оценке эффективности α -токоферола в водных средах, поэтому представляло большой интерес исследовать его эффект в

водно-липидном субстрате. С этой целью исследовано влияние α -токоферола на окисление водно-липидного субстрата в широком интервале концентраций от $1 \cdot 10^{-8}$ до $1 \cdot 10^{-1}$ моль/л. Типичные результаты приведены на рис. 3.

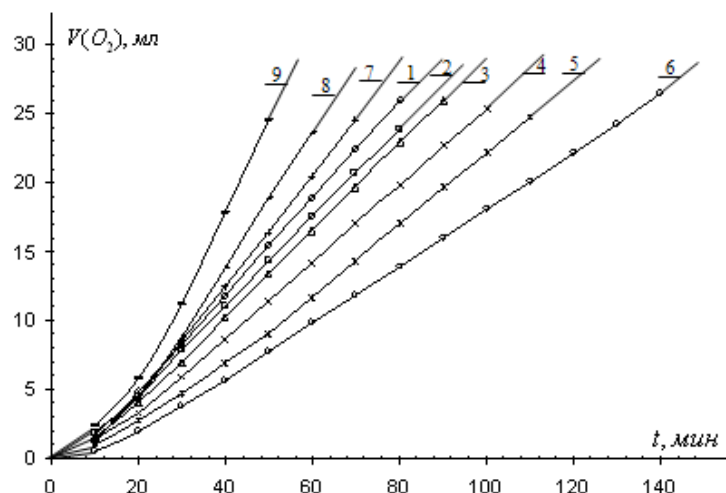


Рис. 3. Кинетические кривые окисления водно-липидного субстрата: 1 – контроль; α -токоферол: 2 – $1 \cdot 10^{-8}$; 3 – $1 \cdot 10^{-7}$; 4 – $1 \cdot 10^{-6}$; 5 – $1 \cdot 10^{-5}$; 6 – $1 \cdot 10^{-4}$; 7 – $1 \cdot 10^{-3}$; 8 – $1 \cdot 10^{-2}$; 9 – $1 \cdot 10^{-1}$ моль/л

Из рисунка видно, что α -токоферол при концентрациях $1 \cdot 10^{-8}$ – $6 \cdot 10^{-4}$ моль/л слабо тормозит процесс, а при концентрациях $1 \cdot 10^{-3}$ – $1 \cdot 10^{-1}$ моль/л ускоряет процесс. Результаты свидетельствуют об изменении механизма действия в водно-липидной модели не только у ионола, но и у α -токоферола по сравнению с окислением безводных субстратов. В водно-

липидном субстрате α -токоферол действует как буфер, ускоряя процесс при одних концентрациях и замедляя процесс при других концентрациях. Именно такой механизм действия характерен для многих биологически активных соединений (холестерина, гормонов), обеспечивающих гомеостаз.

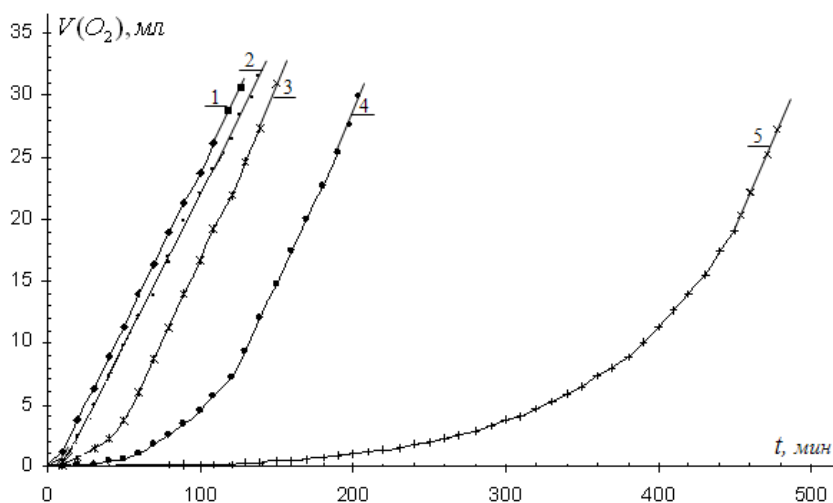


Рис. 4. Кинетические кривые каталитического окисления МЛЛ: 1 – контроль; капотен: 2 – $1 \cdot 10^{-4}$; 3 – $1 \cdot 10^{-3}$; 4 – $1 \cdot 10^{-2}$; 5 – $1 \cdot 10^{-1}$ моль/л

В предыдущем сообщении (сообщ. 1) капотен использован в качестве пред-

ставителей тиолов. В настоящем сообщении приведены результаты исследования

его антиоксидантной активности в водно-липидной среде. Типичные КК окисления водно-липидного субстрата приведены на рис. 4.

Из рисунка видно, что эффективное торможение наблюдается только при высоких концентрациях, превышающих $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, когда количество тиола равно или превышает концентрацию катализатора.

Для количественной оценки результатов и исследования механизма действия

капотена КК аппроксимировали функциями, как описано выше, с последующим их дифференцированием. Рассчитаны кинетические параметры. Этот подход позволил выявить особенности влияния капотена в зависимости от концентрации. В результате показано (табл. 3), что при концентрациях капотена $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л наблюдаются два участка КК подобно контрольной пробе.

Таблица 3.

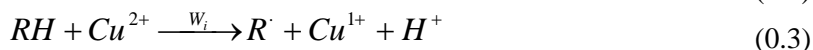
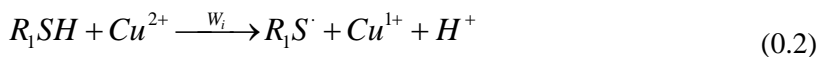
Кинетические параметры окисления водно-липидного субстрата в присутствии капотена

C_{InH_2} МОЛЬ/Л	$W_{нач.}$ МОЛЬ·Л ⁻¹ ·С ⁻¹	$W_{max.}$ МОЛЬ·Л ⁻¹ ·С ⁻¹	a МОЛЬ·Л ⁻¹ ·С ⁻²	τ_1 , МИН	τ_2 , МИН
контроль	$(1,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$(2,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$(2,8 \pm 0,5) \cdot 10^{-8}$	—	30 ± 2
$1 \cdot 10^{-6}$	$(8,9 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(2,3 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$	$(2,6 \pm 0,6) \cdot 10^{-8}$	—	35 ± 3
$1 \cdot 10^{-5}$	$(8,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	$(2,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$(2,6 \pm 0,6) \cdot 10^{-8}$	—	40 ± 5
$1 \cdot 10^{-4}$	$(5,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(2,6 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$	$(2,7 \pm 0,7) \cdot 10^{-8}$	—	50 ± 4
$1 \cdot 10^{-3}$	$(4,0 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$	$(2,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$(2,6 \pm 0,7) \cdot 10^{-8}$	40 ± 5	55 ± 2
$1 \cdot 10^{-2}$	$(8,6 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$	$(2,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$	$(2,7 \pm 0,8) \cdot 10^{-8}$	50 ± 2	130 ± 3
$1 \cdot 10^{-1}$	$(6,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-7}$	$(2,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$	$(2,8 \pm 0,7) \cdot 10^{-8}$	260 ± 3	390 ± 2

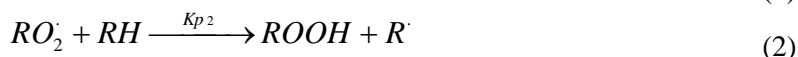
При концентрациях капотена $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л и выше КК аппроксимируют тремя функциями, что свидетельствует об изменении механизма действия. Количественные показатели: $W_{нач.}$, $W_{max.}$, τ_1 , τ_2 , a совпадают с контрольной пробой вплоть до $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л концентрации капотена. Уменьшение начальной скорости и ускорения, увеличение τ_1 и τ_2 наблюдается, начиная с

концентрации капотена $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Максимальная скорость и ускорение остаются постоянными при всех концентрациях капотена. Представленные результаты позволяют сделать вывод о том, что капотен в присутствии катионов меди легко окисляется подобно метиллинолеату. Процесс протекает по схеме:

Инициирование:



Продолжение цепей:



Обрыв цепей:



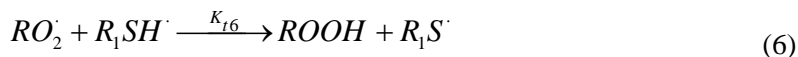
Вероятно, радикалы тиола менее активны, чем радикалы метиллинолеата, по-

этому они рекомбинируют и не участвуют в реакциях продолжения цепей. Они быст-

ро выводятся из процесса, практически не влияя на кинетику.

При концентрациях капотена в 5 – 50 раз, превышающих концентрацию ката-

лизатора, его избыток начинает участвовать в реакции обрыва цепей, обеспечивая торможение процесса. Схема механизма дополняется реакцией:



Одинаковые максимальные скорости окисления, ускорения в контрольной пробе и в пробах с навеской капотена свидетельствуют о том, что продукты окисления капотена не участвуют в процессе окисления.

Выводы

Предложен состав водно-липидной системы для тестирования антиоксидантов.

Для качественной оценки эффективности тестируемых антиоксидантов предложен метод внешнего стандарта.

Для количественной оценки эффективности и механизма действия антиоксидантов предложен математический метод обработки кинетических кривых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Аристархова С.А. Изучение ингибирующей активности токоферолов / С.А. Аристархова, Е.Б. Бурлакова, Н.Г. Храпова // Известия АН СССР. Сер. хим., 1972. – № 12. – С. 2714 – 2718.

2. Бурлакова Е.Б. Кинетические особенности токоферолов как антиоксидантов: Препринт / Е.Б. Бурлакова, С.А. Крашаков, Н.Г. Храпова – Черногоровка, 1992. – 56с.

3. Васильева Н.В. Органический синтез: Учебн. пособие / Н.В. Васильева, Т.А. Смолина, В.К. Тимофеева и др. – М.: Просвящение, 1986. – 367с.

4. Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков – М.: Наука, 1972. – 231с.

5. Денисов Е.Т. Механизмы гомолитического распада молекул в жидкой фазе

// Итоги науки и техники. Сер. «Кинетика и катализ». – 1981. – Т. 9. – С. 1.

6. Джанашия П.Х., Назаренко В.А., Николенко С.А. Современные аспекты клинического применения ингибиторов ангиотензинпрерывающего фермента. – М.: РГМУ, 1999. – 48с.

7. Кобалова Ж.Д., Котовская Ю.В. Артериальная гипертония: ключевые аспекты дифференциальной диагностики, профилактики, клиники и лечения. М.: Фортэ - АРТ, 2001 – 208с.

8. Крепс Е.М. Липиды клеточных мембран. – М.: Наука, 1981. – 339с.

9. Семенов Н.Н. Цепные реакции. – М.: Наука, 1986. – 535с.

10. Ушкалова В.Н. Содержание, антиоксидантная активность и стабильность токоферолов в пищевых липидах // Вопросы питания, 1986. – № 3. – С. 10 – 17.

11. Харитоновна А.А. Кинетический анализ свойств антиоксидантов в сложных композициях с помощью модельной цепной реакции / А.А. Харитоновна, З.К. Козлова, Б.Ф. Цепалов, Г.П. Гладышев // Кинетика и катализ. – 1979. – Т. 20. – № 3. – С. 593 – 599.

12. Шелушенко Н.И. Определение ингибирующей эффективности антиоксидантов на модели аскорбатзависимого перекисного окисления липидов биологических мембран / Н.И. Шелушенко, С.А. Аристархова, Л.Н. Шишкина // Исследование синтетических и природных антиоксидантов in vitro in vivo. – М.: Наука, 1992. – С. 76 – 79.

13. Yanishlieva N. Natural antioxidants in lipid oxidation / N. Yanishlieva, E. Marinova // Buld. Chem. Commun. – 2003. – V. 35. – № 2. – P. 79 – 91.

**KINETIC APPROACHES TO A PROBLEM OF ANTIOXIDANT TEST.
PART 2. WATER-LIPID MODEL**

Zhuravleva L.A., Kravnik V.V., Ushkalova V.N.

Surgut State University, Surgut

This article summarizes results of water-lipid kinetic model devising of antioxidant test. Micelle formation of two- and three-component systems (methyl linoleate : water, ethyl oleate : water, ethyl oleate : water: surface active substans) was tested. Optimal composition of water-lipid substratum was proposed on the basis of obtained results. Efficiency of standard approaches and original mathematical method of kinetic parameters calculation at testing antioxidants was researched. The efficiency of proposed model was estimated an example of such inhibitors as standard ionol and a natural α -tocopherole and synthetic capotene. The method of external standard (ionol as the external standard) has been offered for qualitative antioxidants testing. Some mathematical parameters such as w_{min} , w_{max} , τ_1 , τ_2 , a for quantitative estimation of antioxidants were proposed.