

УДК 547.943.7/541.127/128.24/577.161.6

## КИНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ КАПОТЕНА

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-метил-пропионил]-L-пролина) в сравнении со стандартными антиоксидантами дибунолом и а-токоферолом в безводных иницированных и водно-липидных катализируемых субстратах. Выявлена высокая антиоксидантная активность капотена в водно-липидных катализируемых субстратах, превышающая ингибирующие свойства а-токоферола и уступающая активности дибунола. Установлен идентичный характер кинетических кривых окисления липидного субстрата в растворе хлорбензола в присутствии  $6 \cdot 10^{-3}$  М инициатора азобисизобутиронитрила и водно-липидной системе в присутствии  $2 \cdot 10^{-3}$  М хлорида меди (II),  $1 \cdot 10^{-3}$  М цетилтриметиламмоний бромид при равных концентрациях дибунола. Установлено, что капотен в процессе окисления разрушает гидропероксиды молекулярным путем, способность разрушения гидропероксидов капотеном связана с наличием тиольной группы. Установлено, что все исследуемые добавки капотена разрушали гидропероксиды на 50–75 %.

**Ключевые слова:** антиоксиданты, а-токоферол, дибунол, капотен, пероксидное окисление, антиоксидантная активность

## KINETIC METHODS TO TEST THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF CAPOTEN

Perevozkina M.G.

State Agrarian University of Northern Trans-urals, Tyumen, e-mail: mgperevozkina@mail.ru

Investigated the antioxidant activity of capoten (1-[(2S)-3-mercapto-2-methyl-propionyl]-L-proline) compared with standard antioxidants the BHT and a-tocopherol in anhydrous initiated and water-catalyzed lipid substrates. The high antioxidant activity of capoten in the water-catalyzed lipid substrates exceeding the inhibitory properties of a-tocopherol and inferior activity BHT. Installed the identical nature of the kinetic curves of the oxidation of the lipid substrate in a solution of chlorobenzene in the presence of  $6 \cdot 10^{-3}$  M of the initiator azobisisobutyronitrile and the water-lipid system in the presence of  $2 \cdot 10^{-3}$  M chloride copper (II),  $1 \cdot 10^{-3}$  M cetyltrimethylammonium bromide at equal concentrations BHT. It is established that capoten in the oxidation process destroys the hydroperoxides molecular way, the ability of the destruction of hydroperoxides by capoten associated with the presence thiol groups. It was established that all the studied additives capoten destroying hydroperoxides by 50–75 %.

**Keywords:** antioxidants,  $\alpha$ -tocopherol, dibunol, capoten, peroxide oxidation, antioxidant activity

Настоящая работа является продолжением наших исследований, посвященных тестированию ингибиторов окисления различного химического строения кинетическими методами [4, 5]. Для торможения процессов окисления применяют антиоксиданты (АО), которые находят все более широкое применение для предотвращения окислительных превращений липидов *in vitro*, а также *in vivo* в комплексной терапии широкого круга заболеваний [1, 2]. В связи с этим актуальной является проблема предварительного тестирования антиоксидантных свойств лекарственных препаратов, а также расширение ассортимента эффективных синтетических антиоксидантов, достижение высоких эффектов ингибирования при меньших концентрациях антиоксиданта.

**Цель исследования** – тестирование антиоксидантной активности капотена при различных способах иницирования в безводных и водно-липидных средах в срав-

нении со стандартными антиоксидантами, дибунолом и а-токоферолом.

### Материалы и методы исследования

Антиоксидантную активность (АОА) изучали волонометрическим методом поглощения кислорода в модифицированной установке типа Варбурга при окислении метиллинолеата (МЛИ) в присутствии  $1 \cdot 10^{-3}$  М цетилтриметиламмоний бромид (ЦТМАБ) в качестве поверхностно-активного вещества (ПАВ), с добавками  $2 \cdot 10^{-3}$  М хлорида меди (II) в пробе при  $t = (60 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ ,  $W_i = 1,9 \cdot 10^{-5}$  М·с<sup>-1</sup>. Соотношение липидов и воды составляло 1:3, а общий объем пробы 4 мл. Кинетическая модель тестирования антиоксидантов, подбор концентраций катализатора и ПАВ описываются в работе [6]. Кинетику поглощения кислорода изучали в среде инертного растворителя хлорбензола, процесс иницировали за счет термического разложения  $6 \cdot 10^{-3}$  М азо-бис-изобутиронитрила (АИБН) в пробе при  $t = (60 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ ,  $W_i = 4,8 \cdot 10^{-8}$  М·с<sup>-1</sup>. В качестве критериев оценки антиоксидантных свойств соединений использовали – периоды индукции ( $t$ ), начальные и максимальные скорости окисления ( $W_{\text{нач}}$ ,  $W_{\text{max}}$ ). Кинетику накопления гидропероксидов изучали при аутоокислении мети-

лолеата (МО) методом обратного йодометрического титрования в среде хлорбензола при  $t = (60 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ .

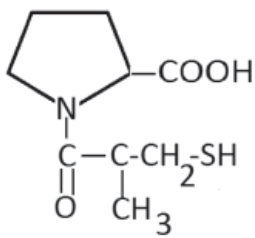
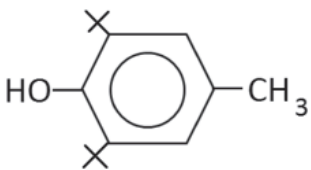
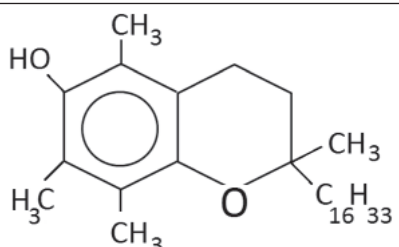
**Результаты исследования и их обсуждение**

Капотен является производным пролина с отдаленной боковой тиольной группой. Препарат применяют при лечении легкой и умеренной гипертонии, а также при тяжелых формах сердечно-сосудистых заболеваний [3]. Химическая

структура капотена позволяет прогнозировать его ингибирующую активность за счет разрушения гидропероксидов тиольной группой. Представляло интерес исследование антиоксидантной активности капотена в процессе окисления метиллинолеата в условиях инициирования в среде хлорбензола и катализа в водно-липидной среде в сравнении с дибунолом и а-токоферолом. Формулы изучаемых соединений представлены в табл. 1.

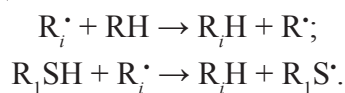
**Таблица 1**

Химические формулы изучаемых антиоксидантов

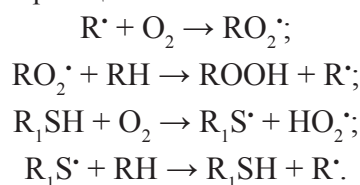
Название АО	Формула
Капотен 1-[(2S)-3-меркапто-2-метилпропионил]-L-пролин	
Дибунол (2,6-ди-трет-бутил-4-метил-фенол)	
а-токоферол (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметил-2-фитилхроман)	

На рис. 1 представлены кинетические кривые (КК) окисления МЛ в растворе хлорбензола в присутствии широкого диапазона концентраций ( $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-1}$ ) М капотена. Показано, что капотен в безводной среде проявляет сложный механизм действия, обусловленный его вероятным участием в реакциях зарождения, продолжения и обрыва цепей. При одних концентрациях капотена происходит уменьшение максимальной скорости, при других наблюдается промотирование процесса окисления. Из табл. 2 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. Зависимость периода индукции от концентрации капотена в среде хлорбензола имеет максимум при концентрации  $(4-5) \cdot 10^{-4}$  М (рис. 2).

Характер воздействия капотена на процесс иницированного окисления МЛ может быть объяснен его участием в радикальном процессе. Радикал инициатора АИБН ( $R_i^\cdot$ ) конкурентно взаимодействует с метиллинолеатом (RH) или с тиольной группой капотена ( $R_1SH$ ) по реакциям:



Далее радикалы метиллинолеата ( $R^\cdot$ ) и капотена ( $R_1S^\cdot$ ) взаимодействуют с кислородом по реакциям:



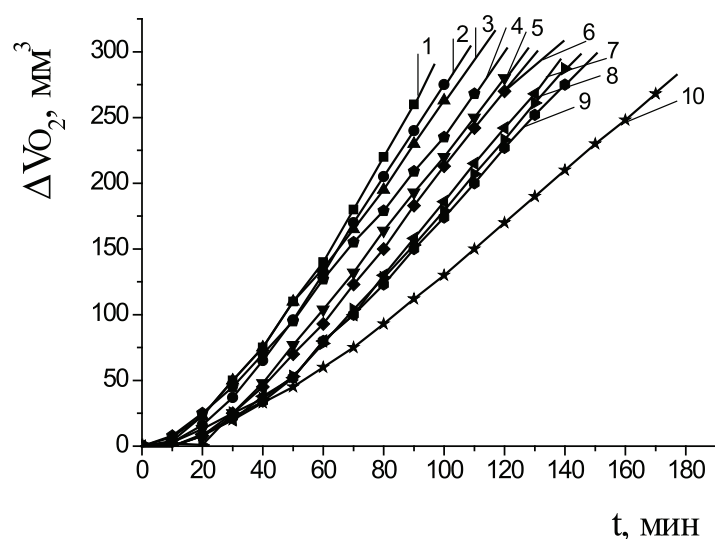


Рис. 1. Кинетика окисления метиллинолеата в безводной среде в присутствии  $6 \cdot 10^{-3}$  М АИБН и капотена М:  
 2 – контроль; 1 –  $1 \cdot 10^{-2}$ ; 3 –  $8 \cdot 10^{-3}$ ; 4 –  $1 \cdot 10^{-1}$ ; 5 –  $5 \cdot 10^{-4}$ ; 6 –  $5 \cdot 10^{-6}$ ,  
 7 –  $1 \cdot 10^{-6}$ ; 8 –  $1 \cdot 10^{-3}$ ; 9 –  $8 \cdot 10^{-4}$ ; 10 –  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $t = 60^\circ\text{C}$

Наблюдаемое увеличение начальной скорости процесса при высоких концентрациях капотена происходит за счет участия капотена в реакциях инициирования, при этом соотношение инициатора и капотена составляет 1:(1,7–17).

Снижение начальной скорости окисления при небольших добавках капотена может быть связано с участием соединения в реакциях обрыва цепей:

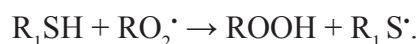


Таблица 2

Кинетические параметры окисления метиллинолеата в растворе хлорбензола в присутствии  $6 \cdot 10^{-3}$  М АИБН и в водно-липидной среде в присутствии  $2 \cdot 10^{-3}$  М  $\text{CuCl}_2$  в зависимости от концентрации капотена, [InH] – ингибитор,  $t = 60^\circ\text{C}$

Безводная среда, $6 \cdot 10^{-3}$ М АИБН				
[InH], М	$t$ , мин	$W_{\text{нач}} \cdot 10^{-8}$ , М·с <sup>-1</sup>	$W_{\text{max}} \cdot 10^{-7}$ , М·с <sup>-1</sup>	$\frac{[\text{АИБН}]}{[\text{InH}]}$
Контроль МЛ	20	6,0	2,2	–
$1 \cdot 10^{-6}$	42	5,0	1,9	6000:1
$5 \cdot 10^{-6}$	36	4,7	1,8	1200:1
$5 \cdot 10^{-5}$	90	4,5	1,7	120:1
$1 \cdot 10^{-4}$	44	4,5	1,7	60:1
$5 \cdot 10^{-4}$	36	4,9	2,0	12:1
$1 \cdot 10^{-3}$	20	6,0	2,2	6:1
$1 \cdot 10^{-2}$	30	7,2	2,4	1:1,7
$1 \cdot 10^{-1}$	22	8,0	2,8	1:17
Водно-липидная среда, $2 \cdot 10^{-3}$ М $\text{CuCl}_2$ , $1 \cdot 10^{-3}$ М ЦТМАБ				
[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>	$\frac{[\text{CuCl}_2]}{[\text{InH}]}$
Контроль МЛ	5	14,4	2,6	–
$1 \cdot 10^{-6}$	8	7,6	1,6	2000:1
$1 \cdot 10^{-5}$	15	6,9	1,0	200:1
$1 \cdot 10^{-4}$	26	6,2	1,6	20:1
$1 \cdot 10^{-3}$	45	3,6	1,7	2:1
$1 \cdot 10^{-2}$	95	2,1	1,7	1:5
$1 \cdot 10^{-1}$	395	0,6	1,7	1:50

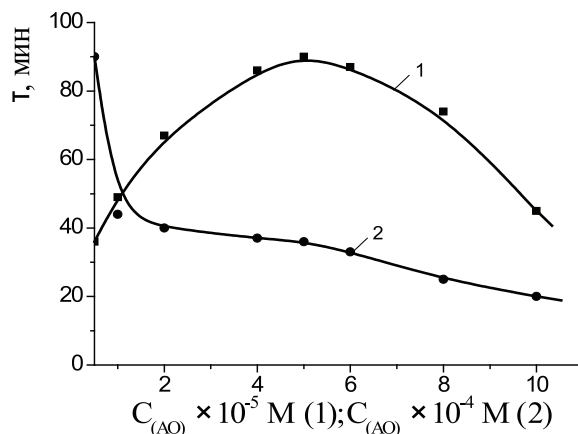


Рис. 2. Зависимости периода индукции от концентрации капотена в безводной среде;  $6 \cdot 10^{-3}$  М АИБН, субстрат окисления – метиллинолеат,  $t = 60^\circ\text{C}$

На рис. 3 приведены КК каталитического окисления МЛ в водно-липидной среде в присутствии ( $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-1}$ ) М капотена. Показано, что все добавки соединения тормозят процесс окисления, 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). На рис. 4 показана линейная зависимость

периода индукции от роста концентрации капотена. Характер влияния капотена на кинетику каталитического окисления МЛ может быть объяснен следующим образом. Капотен может участвовать в реакциях обрыва цепей, обеспечивая ингибирование процесса окисления. Снижение скорости окисления под влиянием капотена может быть обусловлено его конкурентным участием с катализатором в молекулярном распаде гидропероксидов:

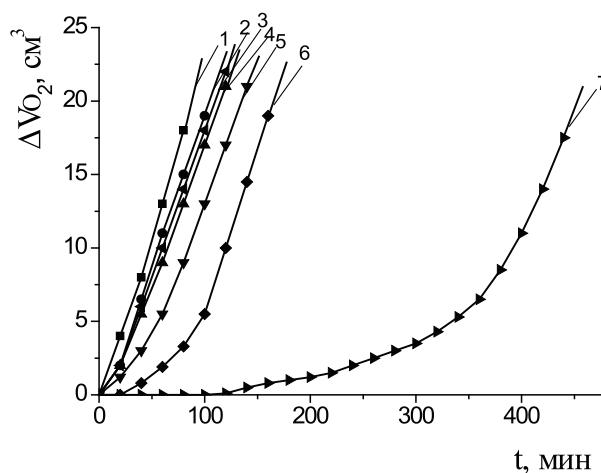
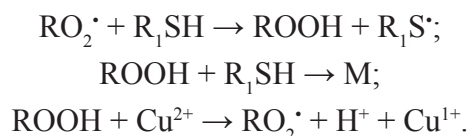
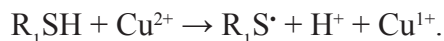


Рис. 3. Кинетика окисления метиллинолеата в водно-липидной среде в присутствии капотена: 1 – контроль; 2 –  $1 \cdot 10^{-6}$  М; 3 –  $1 \cdot 10^{-3}$  М; 4 –  $1 \cdot 10^{-4}$  М; 5 –  $1 \cdot 10^{-3}$  М; 6 –  $1 \cdot 10^{-2}$  М; 7 –  $1 \cdot 10^{-1}$  М;  $2 \cdot 10^{-3}$  М  $\text{CuCl}_2$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$  М ЦТМАБ,  $t = 60^\circ\text{C}$

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 капотена

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 (рис. 5) наблюдалось снижение концентрации гидропероксидов, в контрольном опыте ROOH продолжали накапливаться. Установлено, что все исследуемые добавки капотена способствовали разрушению гидропероксидов на 50–75%.

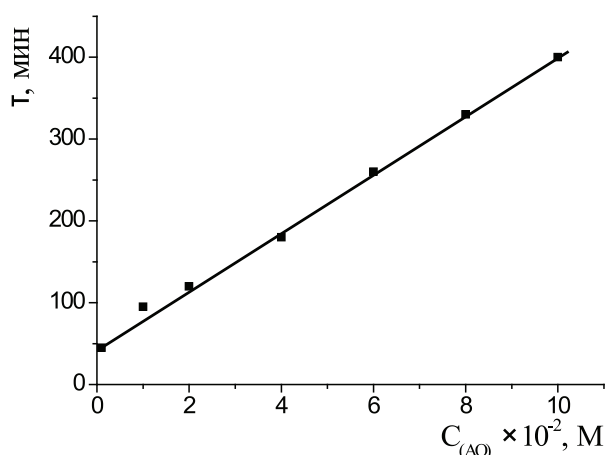


Рис. 4. Зависимость периода индукции от концентрации капотена в водно-липидной среде:  $2 \cdot 10^{-3} \text{ M CuCl}_2$ ,  $1 \cdot 10^{-3} \text{ M ЦТМАБ}$ , субстрат окисления – метиллинолеат,  $t = 60^\circ\text{C}$

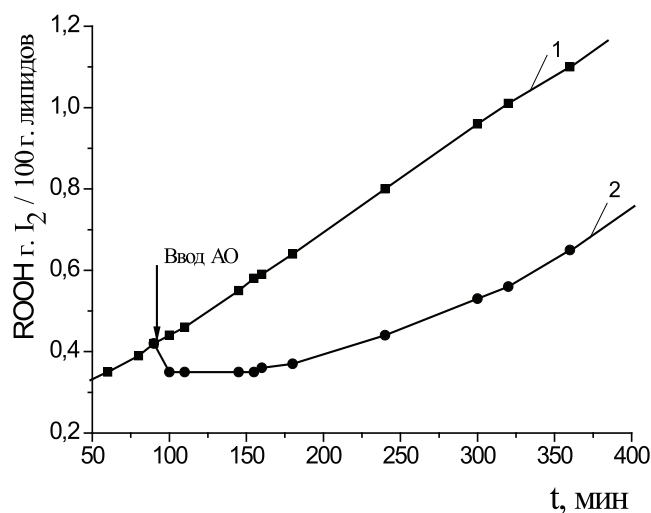


Рис. 5. Кинетика накопления гидропероксидов при аутоокислении MO в присутствии АО: 1 – контроль; 2 – капотен. Стрелкой показан ввод АО.  $C_{(AO)} = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $t = 60^\circ\text{C}$

Проведено исследование закономерностей окисления метиллинолеата в присутствии добавок стационарных ингибиторов окисления дибунла и а-токоферола. Установлен идентичный характер кинетических кривых окисления липидного субстрата в растворе хлорбензола в присутствии  $6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  инициатора и водно-липидной си-

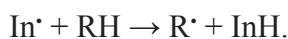
стеме с добавками  $2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  хлорида меди (II) при равных концентрациях дибунла: наблюдался период полного торможения, период аутоускорения и достижение максимальной скорости окисления. Периоды индукции увеличивались пропорционально увеличению концентрации дибунла (табл. 3).

Таблица 3

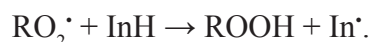
Кинетические параметры окисления метиллинолеата в растворе хлорбензола в присутствии  $6 \cdot 10^{-3}$  М АИБН и в водно-липидной среде в присутствии  $2 \cdot 10^{-3}$  М  $\text{CuCl}_2$  в зависимости от концентрации а-токоферола, дибунола,  $[\text{InH}]$  – ингибитор,  $t = 60^\circ\text{C}$

Безводная среда, $6 \cdot 10^{-3}$ М АИБН			
$[\text{InH}]$ , М	$t$ , мин	$W_{\text{нач}} \cdot 10^{-8}$ , М·с <sup>-1</sup>	$W_{\text{max}} \cdot 10^{-7}$ , М·с <sup>-1</sup>
Контроль МЛ	15	4,3	2,6
а-токоферол			
$1 \cdot 10^{-8}$	17	4,3	2,3
$1 \cdot 10^{-6}$	35	2,5	1,9
$1 \cdot 10^{-4}$	67	1,1	1,8
$1 \cdot 10^{-3}$	350	0,6	1,7
Дибунол			
$1 \cdot 10^{-6}$	35	4,3	2,5
$1 \cdot 10^{-5}$	45	3,4	2,4
$1 \cdot 10^{-4}$	170	2,1	2,1
$1 \cdot 10^{-3}$	650	1,6	1,8
Водно-липидная среда, $2 \cdot 10^{-3}$ М $\text{CuCl}_2$ , $1 \cdot 10^{-3}$ М ЦТМАБ			
$[\text{InH}]$ , 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>
Контроль МЛ	5	14,4	2,6
а-токоферол			
$1 \cdot 10^{-8}$	10	14,0	2,1
$1 \cdot 10^{-6}$	20	9,7	1,9
$1 \cdot 10^{-4}$	35	5,2	1,4
$1 \cdot 10^{-3}$	15	14,6	3,2
Дибунол			
$1 \cdot 10^{-6}$	30	13,8	2,5
$1 \cdot 10^{-5}$	40	12,7	2,3
$1 \cdot 10^{-4}$	160	4,1	1,8
$1 \cdot 10^{-3}$	590	1,9	1,5

КК окисления метиллинолеата в безводной среде с добавками ( $1 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-5}$ ) М а-токоферола имели аутоускоренный характер без периода полного торможения. Период полного торможения появлялся только при концентрациях ( $1 \cdot 10^{-4}$ – $5 \cdot 10^{-4}$ ) М и увеличивался пропорционально концентрации ингибитора, а-токоферол в водно-липидной среде проявлял слабые антиоксидантные свойства, в концентрациях выше  $1 \cdot 10^{-3}$  М протормозил процесс окисления липидных субстратов. В присутствии ( $1 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-4}$ ) М а-токоферола наблюдалось замедление начальных стадий окисления и уменьшение максимальной скорости (табл. 3). В процессе окисления а-токоферол образует достаточно активные токоферольные радикалы ( $\text{In}^\cdot$ ), способные участвовать в побочных реакциях продолжения цепей с молекулами субстрата (RH) [1]:



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



### 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 тиольной группы.

**Список литературы**

1. Бурлакова Е.Б., Крашаков С.А., Храпова Н.Г. Кинетические особенности токоферолов как антиоксидантов. Черноголовка, 1992. – 56 с.

2. Дурнев А.Д., Середенин С.В. Антиоксиданты как средства защиты генетического аппарата // Хим.-фарм. журнал. – 1990. – № 2. – С. 92–100.

3. Газизов Р.Р., Чернецов В.А. Применение капотена при острой сердечной недостаточности у больных с крупноочаговым инфарктом миокарда // Военно-медицинский журнал. – 2006. – Т. 327. – № 2. – С. 60.

4. Перевозкина М.Г., Тихонова В.В., Кадочникова Г.Д. и др. Физико-химические закономерности окисления липидных субстратов под действием гипотензивных препаратов // Свободно-радикальное окисление липидов в эксперименте и клинике. – Тюмень: Из-во Тюм.ГУ, 1997. – С. 104–113.

5. Перевозкина М.Г. Кинетика каталитического окисления мицеллярных субстратов в присутствии лекарственных препаратов различного фармакологического действия // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 3 (1). – С. 68–75.

6. Перевозкина М.Г. Тестирование антиоксидантной активности полифункциональных соединений кинетическими методами: монография. – Новосибирск: Изд. СибАК, 2014. – 240 с.

**References**

1. Burlakova E.B., Krashakov S.A., Hrapova N.G. Kinetic characteristics of tocopherols as antioxidants. Chernogolovka, 1992. 56 p.

2. Durnev A.D., Seredenin S.V. Antioksidanty kak sredstva zashchity geneticheskogo apparata // Him.-farm. Zhurnal, 1990, no. 2, pp. 92–100.

3. Gazizov R.R., Chernecov V.A. Primenenie kapotena pri ostroj serdechnoj nedostatochnosti u bol'nyh s krupnoochagovym infarktomyokarda // Voenno-meditsinskij zhurnal, 2006, Vol. 327. no. 2. pp. 60.

4. Perevozkina M.G., Tihonova V.V., Kadochnikova G.D. i dr. / Fiziko-himicheskie zakonomernosti okisleniya lipidnyh substratov pod dejstviem gipotenzivnyh preparatov // Svobodno-radikal'noe okislenie lipidov v jeksperimente i klinike. Tyumen, Izdat. Tjumenskogo gos. Un-ta, 1997, pp. 104–113.

5. Perevozkina M.G. Kinetika kataliticheskogo okisleniya micelljarnyh substratov v prisutstvii lekarstvennyh preparatov razlichnogo farmakologicheskogo dejstvija // Fundamentalnye issledovanija, 2014, no. 3 (1), pp. 68–75.

6. Perevozkina M.G. Testirovanie antioksidantnoj aktivnosti polifunkcionalnyh soedinenij kineticheskimi metodami. Monografija. Novosibirsk: Izd. SibAK, 2014. 240 p.

**Рецензенты:**

Ерёмин Д.И., д.б.н., профессор кафедры почвоведения и агрохимии, ФГБОУ ВПО «Государственный аграрный университет Северного Зауралья», г. Тюмень;

Грехова И.В., д.б.н., профессор кафедры общей химии, ФГБОУ ВПО «Государственный аграрный университет Северного Зауралья», г. Тюмень.

Работа поступила в редакцию 12.11.2014.