

Терпенофенол–хлориновые конъюгаты в реакции с пероксирадикалами

Л. И. Мазалецкая,^{a@} Н. И. Шелудченко,^a И. С. Худяева,^b Е. В. Буравлев,^b
Д. В. Белых,^b И. Ю. Чукичева^b

^aИнститут биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334 Москва, Россия

^bИнститут химии Коми научного центра Уральского отделения РАН, 167982 Сыктывкар, Россия

@E-mail: lim@sky.chph.ras.ru

Установлено, что внедрение терпенофенольного фрагмента на периферию хлоринового макроцикла существенно увеличивает антирадикальную активность таких терпенофенол-хлориновых конъюгатов.

Ключевые слова: Порфирины, производные хлорофилла, изоборнилфенолы, гибридные антиоксиданты, антирадикальная активность.

Terpenylphenol–Chlorin Conjugates in Reaction with Peroxy–Radicals

L. I. Mazaletskaya,^{a@} N. I. Sheludchenko,^a I. S. Khudyaeva,^b E. V. Buravlev,^b
D. V. Belykh,^b I. Yu. Chukicheva^b

^aEmanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russian Federation

^bInstitute of Chemistry, Komi Scientific Center, Ural Division, Russian Academy of Sciences, 167982 Syktivkar, Russia

@Corresponding author E-mail: lim@sky.chph.ras.ru

Chlorophyll a and its chemically modified derivatives are biologically active substances which are widely used in medical chemistry. Moreover, there are some data on the possibility of their use as antioxidants. An introduction of terpenylphenolic fragment at the periphery of the macrocycle can increase their own antioxidant activity of the parent molecule. Therefore the compounds combining in their molecules the fragments of terpenylphenol and chlorophyll a derivatives are of a great interest as potential antioxidants. At the present study, we have investigated an antiradical activity of terpenylphenol-chlorin conjugates, and the contribution of each fragment to the antiradical activity of the molecule as a whole was estimated. The classic method based on the oxygen detection uptake during the oxidation was used for antioxidant activity estimation. It was found that the antiradical activity of terpenylphenol-chlorin conjugates with an amide bond between the porphyrin and terpenylphenol fragments is caused by the presence of the terpenylphenol fragment. The conjugates activity appreciably exceeds the chlorophyll derivatives activity and at the same time, significantly is lower than terpenylphenols activity. Higher antiradical activity of conjugates compared with free chlorin macrocycles indicates that, despite the significant loss of activity, the phenolic group retains the ability to interact with free radicals.

Keywords: Porphyrins, chlorophyll derivatives, isobornyl phenols, hybrid antioxidant, antiradical activity.

Введение

Хлорофилл *a* и его химически модифицированные производные являются биологически активными веществами, которые находят широкое применение в медицинской химии.^[1,2] Кроме того, имеются данные о возможности их использования в качестве антиоксидантов (АО).^[3,4] Усилить антиоксидантные свойства производных хлорофилла можно за счет внедрения на периферию макроцикла фрагментов молекул, обладающих собственной антиоксидантной активностью, например, соединения класса замещенных фенолов. Их биологическая активность обусловлена, в частности, способностью взаимодействовать как со свободными радикалами, так и компонентами клеточных мембран, что может влиять на метаболизм в биологической системе вследствие изменения интенсивности перекисного окисления липидов.^[5] К такого типа соединениям относятся синтетические фенолы с терпеновыми изоборнилными заместителями, которые являются биологически активными веществами, проявляя противоионную,^[6] антиагрегантную активность, обладают гемореологическими, ретинопротекторными свойствами и улучшают мозговой кровоток.^[7-9] В зависимости от строения заместителей, их расположения в ароматическом кольце по отношению к ОН-группе терпенофенолы различаются по антирадикальной активности,^[10,11] которая обуславливает антиоксидантные свойства. В связи с этим в качестве потенциальных антиоксидантов представляют интерес соединения, сочетающие в своей молекуле фрагменты терпенофенолов и производных хлорофилла *a*.

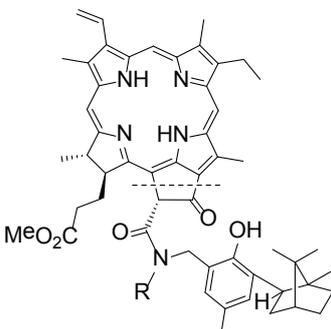
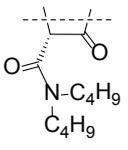
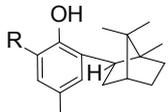
Целью настоящей работы является изучение антирадикальной активности конъюгатов, содержащих в молекуле терпенофенольный и хлорофиновый фрагменты, и определение вклада каждого из фрагментов в антирадикальную активность молекулы в целом.

В нашей работе для оценки антиоксидантного действия изучаемых соединений использован классический метод, основанный на регистрации количества поглощенного кислорода в процессе окисления, протекающего с заданной скоростью инициирования.^[12] В присутствии добавок антиоксиданта наблюдается замедление реакции, которое обусловлено взаимодействием антиоксиданта с пероксирадикалами окисляющегося субстрата. По мере расходования антиоксиданта скорость реакции увеличивается и достигает скорости неингибированного процесса. В качестве субстрата использован модельный углеводород – этилбензол, который удобен для тестирования жирорастворимых антиоксидантов. Кроме того, имеется значительная база литературных данных,^[13] позволяющая проводить адекватное сравнение антирадикальной активности различных антиоксидантов по отношению к пероксирадикалам окисляющегося субстрата.

Экспериментальная часть

Ингибирующее действие соединений, структурные формулы которых представлены в Таблице 1, изучали в модельной реакции окисления этилбензола (333 К), инициированного ди-

Таблица 1. Структурные формулы и значения параметра fk_7 , соединений 1–8.

Соединение	Обозначение	$fk_7 \cdot 10^{-4}$, л/моль·с
	R = C ₄ H ₉ (1)	0.53
	R = C ₆ H ₁₃ (2)	0.58
	R = C ₈ H ₁₇ (3)	0.58
	R = CH ₂ Ph (4)	0.73
	(5)	0.18
	R = H (6)	11.6 ^[10]
	R = CH ₃ (7)	14.8
	R = C(CH ₃) ₃ (8)	12.8

нитрилом азизомаляной кислоты (скорость инициирования $W_i = 5 \cdot 10^{-8}$ моль/л·с), с использованием волнометрического метода поглощения кислорода. Этилбензол с растворенным АО предварительно термостатировали, после чего вводили добавку инициатора. Из кинетических кривых определяли начальную скорость поглощения кислорода.

ИК спектры растворов АО в концентрации 1·10⁻² моль/л в *n*-гексане записывали на ИК-Фурье-спектрометре "Spectrum 100" (PerkinElmer, Germany).

Третичные амиды метилфеофорбида *a* (1–5) синтезировали по описанным ранее методикам.^[14-16] 2-Изоборнил-4-метилфенол (6) и 2-*трет*-бутил-6-изоборнил-4-метилфенол (8) получали по реакции алкилирования *n*-крезола и 2-*трет*-бутил-4-метилфенола камфеном;^[17,18] 2-изоборнил-4,6-диметилфенол (7), т.пл. 81–82 °С (82.9–83 °С)^[19] синтезировали из 2,4-диметилфенола по методике.^[17]

Результаты и их обсуждение

На Рисунке 1 представлены начальные участки кривых поглощения кислорода без добавок (кривая 1) и в присутствии добавок в различных концентрациях конъюгата 1 (кривые 2, 4), порфирина 5 (кривые 3, 5) и 2-изоборнил-4-метилфенола 6 (кривая 6). Из представленных данных видно, что изученные соединения в различной степени снижают скорость реакции окисления. В интервале исследованных концентраций для соединений 1 и 5, ввиду их относительно невысокого ингибирующего действия, наряду с обрывом цепей окисления на молекуле АО имеет место также и квадратичный обрыв цепей. Поэтому для количественной оценки параметра ингибирования fk_7 , где f – стехиометрический коэффициент ингибирования, k_7 – константа скорости взаимодействия антиоксидантов с пероксирадикалами, который является характеристикой антирадикальной

активности, было использовано уравнение:

$$W_0/W - W/W_0 = fk_7[AO]_0/k_6^{0.5}W_1^{0.5}, \quad (1)$$

где W_0 и W – скорости окисления в отсутствие и в присутствии добавок соответственно, W_1 – скорость иницирования, k_6 – константа скорости квадратичной рекомбинации пероксирадикалов. Уравнение (1) получено в работе^[20] при анализе схемы ингибированного окисления, включающей следующие реакции: Инициатор + $(RH, O_2) \rightarrow RO_2\cdot$ (иницирование цепей окисления, W_1); $RO_2\cdot + RH \rightarrow ROOH$ (продолжение цепи, k_2); $RO_2\cdot + RO_2\cdot \rightarrow$ продукты (квадратичный обрыв цепей, k_6); $AO + RO_2\cdot \rightarrow P_1$ (линейный обрыв цепей на АО, k_7); $P_1 + RO_2\cdot \rightarrow P_2$.

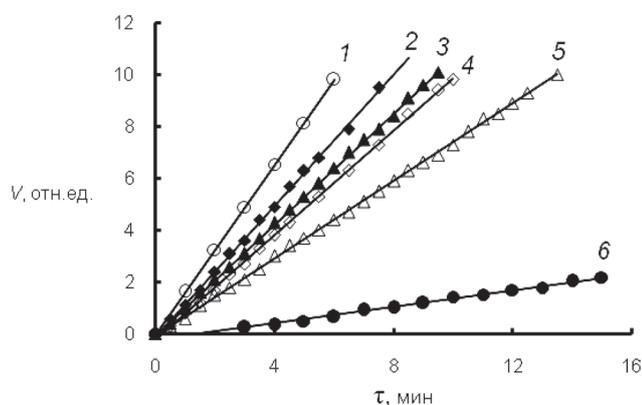


Рисунок 1. Начальные участки кинетических кривых поглощения кислорода при окислении этилбензола без добавок (1), и в присутствии изученных соединений (моль/л): 2 – $1 \cdot 10^{-4}$ (1); 3 – $5 \cdot 10^{-4}$ (5); 4 – $2 \cdot 10^{-4}$ (1); 5 – $1 \cdot 10^{-3}$ (5); 6 – $1 \cdot 10^{-4}$ (6). Температура 333 К, $W_1 = 5 \cdot 10^{-8}$ моль/л·с.

Как видно из Рисунка 2, начальная скорость ингибированного окисления линейно зависит от начальной концентрации АО в координатах уравнения (1). Из тангенса угла наклона полученных прямых определяли величину параметра ингибирования fk_7 (Таблица 1). При расчете принимали $k_6 = 1.9 \cdot 10^7$ л/моль·с.^[21] Из представленных данных следует, что производное хлорофилла **5** характеризуется весьма умеренной антирадикальной активностью и значительно уступает фенольным антиоксидантам (Рисунок 1, Таблица 1).

Можно было ожидать, что внедрение на периферию макроцикла фрагмента терпенофенола приведет к увеличению антиоксидантных свойств конъюгата по сравнению с исходной молекулой порфирина. Из представленных данных видно (Таблица 1), что введение в макроцикл фрагмента терпенофенола приводит к увеличению величины fk_7 в 3–4 раза по сравнению с аналогичным по структуре порфирином **5**, не содержащим терпенофенольного заместителя в макроцикле. Природа второго углеводородного заместителя при атоме азота амидной группы (R) слабо влияет на антиоксидантную активность соединений **1–4**.

Сравнение показывает, что величины fk_7 полученных конъюгатов более чем на порядок ниже fk_7

изоборнилзамещенных фенолов **6–8**, не содержащих в *o*-положении порфириновый заместитель. Снижение антирадикальной активности конъюгатов **1–4** по сравнению с терпенофенолами **6** и **7** может быть связано с рядом причин. Во-первых, наличие объемного порфиринового заместителя в *o*-положении по отношению к гидроксильной группе фенола может обуславливать стерические затруднения при взаимодействии ОН-группы с пероксирадикалами. Во-вторых, электроноакцепторная амидная группа, обеспечивающая связь между фенольным и порфириновым фрагментами, может также способствовать уменьшению величины fk_7 . И, наконец, к снижению константы скорости взаимодействия с пероксирадикалами может привести образование внутримолекулярной водородной связи^[10,11,22] между фенольной гидроксильной группой и атомами азота или кислорода амидной группы ($C=O \cdots H-N$ и $N \cdots H-O$).

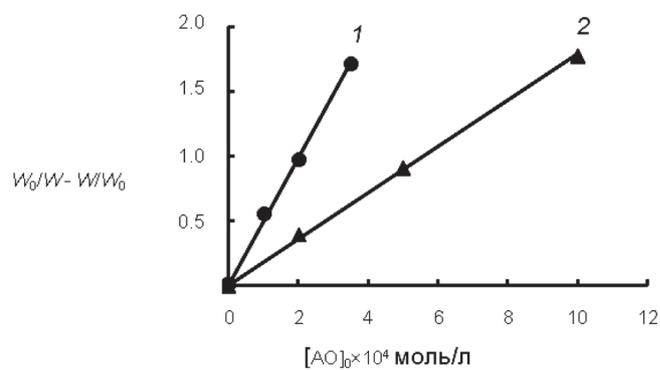


Рисунок 2. Зависимость начальной скорости окисления от начальной концентрации АО в координатах уравнения (1): 1 – 1; 2 – 5.

Для выяснения влияния пространственных затруднений на реакционную способность ОН-групп было проведено сравнительное исследование реакционной способности двух изоборнилфенолов с различными алкильными заместителями в положении 2: 2-изоборнил-4,6-диметилфенола **7** и 2-*трет*-бутил-6-изоборнил-4-метилфенола **8**. Установлено, что замена метильного заместителя на объемный *трет*-бутильный в *o*-положении фенола приводит к снижению величины fk_7 ~ менее чем в 1.2 раза. Полученный результат согласуется с литературными данными. Так, сравнение антирадикальной активности 2,4,6-триметилфенола и 2,4-ди-*трет*-бутил-6-метилфенола показывает, что при взаимодействии с пероксирадикалами *n*-декана (50 °С) их константы^[13] различаются всего лишь на 5%. Проводимое сравнение имеет право на существование, поскольку изоборнильный заместитель в *o*-положении не проявляет себя как, например, *трет*-бутильный: в отличие от пространственно затрудненных фенолов с 2,6-ди-*трет*-бутильными заместителями, кинетические характеристики 2,6-диизоборнил-4-метилфенола соответствуют характеристикам пространственно незатрудненных фенолов.^[13] Таким образом, существенное уменьшение антирадикальной активности терпено-

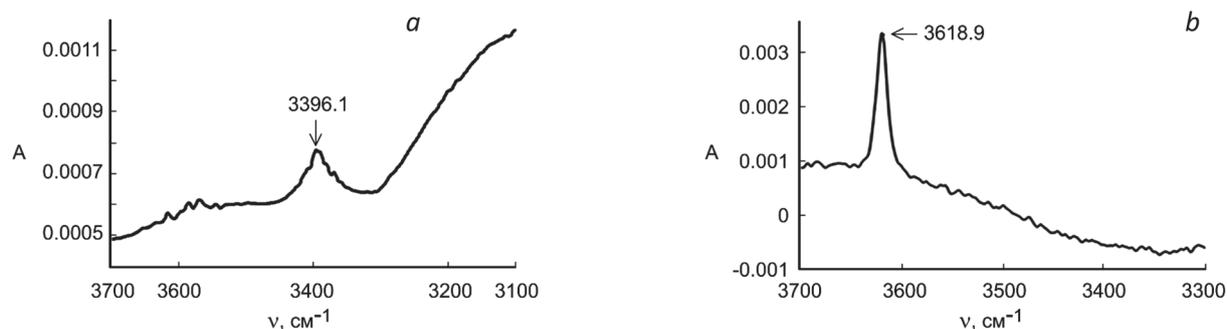


Рисунок 3. ИК-спектры соединений в *n*-гексане: *a* – **1** (область $\nu = 3700\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$); *b* – **6** (область $\nu = 3700\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$).

фенольного фрагмента конъюгатов **1–4**, по-видимому, не может быть объяснено стерическими затруднениями за счет введения объемного заместителя в *o*-положение к ОН-группе.

На основе имеющихся литературных данных можно провести анализ влияния электроакцепторных групп на реакционную способность фенольных антиоксидантов. Так, при взаимодействии с пероксирадикалами этилбензола происходит снижение величины $k_7 \sim$ в 4.3 раза для 4-нитрофенола по сравнению с незамещенным фенолом. Подобная картина наблюдается для 2,6-ди-*трет*-бутил-4-замещенных фенолов при взаимодействии с растущими пероксирадикалами полистирола.^[13] при введении в *n*-положение электроакцепторных нитро- или циано-групп величина k_7 снижается в 5 и 2.9 раза соответственно. Таким образом, наличие в молекуле фенолов групп с сильными электроакцепторными свойствами хотя и приводит к заметному уменьшению величин k_7 , однако имеющиеся различия оказываются не столь значительными, как в случае конъюгатов **1–4**.

Известно, что образование внутримолекулярной водородной связи заметно снижает реакционную способность ОН-группы фенольных антиоксидантов.^[11] Предположительный вывод об образовании внутримолекулярной водородной связи для конъюгатов **1–4** может быть сделан на основании данных ИК спектроскопии. Так, в ИК-спектре соединения **1** наблюдается полоса валентных колебаний при $\nu = 3396\text{ cm}^{-1}$ (Рисунок 3а), характерная для ОН-групп, связанных внутримолекулярной водородной связью, в то время как полоса валентных колебаний несвязанных ОН-групп фенола **6** наблюдается при $\nu = 3619\text{ cm}^{-1}$ (Рисунок 3б).

Снижение реакционной способности за счет образования внутримолекулярной водородной связи ($\text{O}\cdots\text{H}-\text{O}$ и $\text{N}\cdots\text{H}-\text{O}$) ранее нами установлено для изоборнилзамещенных фенолов с *o*-алкокси- и *o*-диалкиламинометильными заместителями.^[10,11] Так, для *o*-изоборнилоксифенола величина fk_7 уменьшалась в 6.5 раз по сравнению с *o*-изоборнилфенолом.^[10] Еще более существенное снижение реакционной способности (~ 100 раз) наблюдали при введении в вакантное *o*-положение молекулы изоборнилзамещенных фенолов диалкиламинометильного заместителя.^[11] Из данных, представленных в Таблице 1, следует, что соединения **1–4** занимают промежуточное положение

по потере активности между *o*-алкоксифенолами и *o*-диалкиламинометилфенолами. Это можно объяснить большей прочностью водородной связи, образованной диалкиламинометильной группой по сравнению со связью, образованной атомами азота или кислорода амидной группы.

Заключение

Таким образом, в настоящей работе установлено, что антирадикальная активность изученных терпенофенол-хлориновых конъюгатов обусловлена наличием терпенофенольного фрагмента. Активность конъюгатов заметно превосходит активность аналогичного по структуре производного хлорофилла *a* и, в то же время, значительно ниже активности терпенофенолов. Основной причиной снижения реакционной способности конъюгатов по сравнению с исходной молекулой замещенного фенола является, по-видимому, образование внутримолекулярной водородной связи между атомом водорода гидроксильной группы и атомом азота амидной группы, обеспечивающей связь порфирина с терпенофенолом и выступающей в роли *o*-заместителя. Более высокая антирадикальная активность конъюгатов по сравнению со свободными хлориновыми макроциклами показывает, что, несмотря на значительную потерю активности, фенольная группа, тем не менее, сохраняет способность взаимодействовать со свободными радикалами.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований УрО РАН, проект № 12-Т-3-1020.

Список литературы

References

1. Nyman E.S., Hynninen P.H. *Photochem. Photobiol. B: Biology* **2004**, 73, 1–28.
2. DeRosa M.C., Crutchley R.J. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 233–234, 351–371.

3. Lanfer-Marquez U.M., Barros R.M.C., Sinnecker P. *Food Res. Int.* **2005**, *38*, 885–891.
4. Yu J.-W., Yoon S.-S., Yang R. *Biol. Pharm. Bull.* **2001**, *24*, 1053–1059.
5. Burlakova E.B., Alesenko A.V., Molochkina E.M., Pal'mina N.P., Khrapova N.G. *Bioantioxidants in Radiation Damage and Malignant Growth*. Moscow: Nauka, **1975**. 214 p. (in Russ.) [Бурлакова Е.Б., Алесенко А.В., Молочкина Е.М., Пальмина Н.П., Храпова Н.Г. *Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте*. М.: Наука, **1975**. 214 с.]
6. Cirri M., Mura P., Corvi Mora P. *Int. J. Pharm.* **2007**, *340*, 84–91.
7. Plotnikov M.B., Smolyakova V.I., Ivanov I.S., Chernisheva G.A., Kuchin A.V., Chukicheva I.J., Krasnov E.A. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2010**, *149*, 721–723.
8. Logvinov S.V., Plotnikov M.B., Zhdankina A.A., Smolyakova V.I., Ivanov I.S., Kuchin A.V., Chukicheva I.Yu., Varakuta E.Yu. *Neurosci. Behav. Physiol.* **2010**, *40*, 779–782.
9. Plotnikov M.B., Smol'yakova V.I., Ivanov I.S., Kuchin A.V., Chukicheva I.J., Buravlev E.V., Krasnov E.A. *Pharm. Chem. J.* **2011**, *44*, 530–533.
10. Mazaletskaya L.I., Sheludchenko N.I., Shishkina L.N., Kuchin A.V., Fedorova I.V., Chukicheva I.Yu. *Petrol. Chem.* **2011**, *51*, 348–353.
11. Mazaletskaya L.I., Sheludchenko N.I., Shishkina L.N., Buravlev E.V., Chukicheva I.Yu., Kutchin A.V. *Russ. J. Phys. Chem. A* **2013**, *87*, 565–570.
12. Emanuel' N.M., Denisov E.E., Mayzus Z.K. *Chain Oxidation Reaction of Hydrocarbons in the Liquid Phase*. Moscow: Nauka, **1965**. 375 p. (in Russ.) [Эмануэль Н. М., Денисов Е.Е., Майзус З.К. *Цепные реакции окисления углеводородов в жидкой фазе*. М.: Наука, **1965**. 375 с.]
13. Denisov E.T. *The Rate Constants of Homolytic Liquid-Phase Reactions*. Moscow: Nauka, **1971**. 771 p. (in Russ.) [Денисов Е.Т. *Константы скорости гомолитических жидкофазных реакций*. М.: Наука, **1971**. 771 с.]
14. Buravlev E.V., Chukicheva I.Yu., Belykh D.V., Kuchin A.V. *Chem. Nat. Compd.* **2007**, *43*, 678–681.
15. Belykh D.V., Buravlev E.V., Chukicheva I.Yu., Tarabukina I.S., Shevchenko O.G., Plyusnina S.N., Kutchin A.V. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2012**, *37*, 558–564.
16. Belykh D.V., Kopylov E.A., Gruzdev I.V., Kuchin A.V. *Russ. J. Org. Chem.* **2012**, *46*, 577–585.
17. Chukchieva I.Yu., Fedorova I.V., Kuchin A.V. *Khim. Rastit. Syr'ya* **2009**, *3*, 63–68 (in Russ.).
18. Fedorova I.V., Chukicheva I.Yu., Shumova O.A., Kutchin A.V. *Russ. J. Gen. Chem.* **2013**, *83*, 1103–1110.
19. Kitchen L.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, *70*, 3608–3610.
20. Aleksandrov A.L., Denisov E.T. *Izv. Akad. Nauk USSR, Ser. Khim.* **1969**, *8*, 1652–1658 (in Russ.).
21. Tsepalov V.F., Shlyapintoh V.Ya. *Kinetika Kataliz* **1962**, *3*, 870–876 (in Russ.).
22. Tsepalov V.F., Kharitinova A.A., Gladysheva G.P. *Kinetika Kataliz* **1977**, *18*, 1261–1267 (in Russ.).

Received 04.09.2015

Accepted 02.11.2015