

*Н. И. Мезен, О.И. Шадыро, А.С.Федулов*

## **Биоантиоксидантная активность производных пирокатехина и гидрохинона**

*Белорусский государственный медицинский университет, кафедра биологии, БГУ, кафедра радиационной химии и химической технологии*

В статье представлены результаты изучения антиоксидантной активности у производных двухатомных фенолов. Ключевые слова: антиоксиданты, перекисное окисление липидов, химическая структура, пирокатехин, гидрохинон.

В последние десятилетия природные фенольные соединения привлекают всеобщее внимание исследователей не только как объект химического изучения, но и в качестве перспективных веществ для получения биологически активных препаратов и лекарственных средств. Широкое изучение фенольных соединений показало, что вещества данной группы обладают разносторонним действием на организмы животных и человека [1-11]. В настоящее время антиоксидантной активности фенольных соединений уделяется огромное внимание, как возможному механизму, через который реализуются биологические эффекты данной группы соединений [2,6,7-11]. Имеется большое количество работ, указывающих на взаимосвязь адаптогенных, иммуномодулирующих, противоопухолевых и ряда других свойств фенолов с их антиоксидантной активностью [1,3,4,7].

До сих пор малоизученными остаются вопросы о взаимосвязи антиоксидантной активности соединений с их химической структурой.

На кафедре радиационной химии и химической технологии Белорусского государственного университета были синтезированы производные пирокатехина и гидрохинона, условно названные Т-2, Т-3, К-1, Т-37.

Целью нашего исследования явилось изучение биоантиоксидантной активности у производных пирокатехина и гидрохинона в общем гомогенате мозга крыс. В качестве препарата сравнения использовали близкий по структуре исследуемым соединениям широко известный антиоксидант ионол.

### **Материал и методы**

Антиоксидантную активность соединений изучали по их влиянию *in vitro* на кинетику накопления малонового диальдегида (МДА) в гомогенатах головного мозга лабораторных крыс [5] по следующей методике. Животных декапитировали. Головной мозг быстро извлекали, отмывали его в охлажденном до 0 – +40С 0,9% NaCl, освобождали от оболочек и крупных кровеносных сосудов и готовили общий гомогенат мозга (ОГМ) на трис-НСI-буфере (рН 7,4) в соотношении 1:10 (ткань:буфер). 50 мкл ОГМ вносили в пробирку, содержащую 50 мкл исследуемого соединения, 350 мкл трис-буфера и 50 мкл индуцирующей ПОЛ смеси, состоящей из 1,2 x 10<sup>-7</sup>М FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O и 8 x 10<sup>-5</sup> М аскорбиновой кислоты. Смесь инкубировали 30 минут при 37о С. Затем на льду к пробам добавляли по 3,5 мл реагента,

содержащего 15% трихлоруксусной кислоты и 0,375% 2-тиобарбитуровой кислоты в 0,25 N HCl и инкубировали в течение 15 минут на водяной бане при 100о С. По окончании инкубации пробы охлаждали на льду, центрифугировали на центрифуге ОСВМ 20 минут при 2500 оборотов/сек и отбирали по 3 мл супернатанта. Изменение содержания МДА рассчитывали в процентах от контроля-«норма», который принимали за 100% накопление МДА. Контроль-«норма» представляет собой описанную выше систему, которая вместо исследуемого соединения содержала 50 мкл дистиллированной H2O.

#### Результаты и обсуждение

Пирокатехин, гидрохинон, пирогаллол, резорцин – исходные соединения основных классов биологически важных фенолов [9].

При сравнительном изучении базовых фенольных соединений установлено следующее (табл. 1.). Наиболее активными в антиоксидантном отношении, по нашим данным, являются пирокатехин и гидрохинон, что согласуется с данными литературы [7]. Так, содержание МДА гидрохинон в концентрациях 10<sup>5</sup>-10<sup>-4</sup> М снижает на 7,8-90%, пирокатехин в концентрациях 10<sup>-5</sup>-10<sup>-4</sup> М на 47,4-82,1% (табл.1).

Таблица 1.

Влияние фенола и его производных на кинетику накопления МДА в ОГМ крыс (% содержания уровня МДА от контроля-«норма») ( n=9)

Концентрация вещества, М	Статистические показатели	Исследуемое соединение			
		Фенол	Пирокатехин	Гидрохинон	Резорцин
10 <sup>-3</sup>	M+m	96,77+7,24	17,88+11,07	10,00+7,07	91,07+4,49
	P <sub>1,2</sub>	<0,001			
	P <sub>1,3</sub>		<0,001		
	P <sub>1,4</sub>			>0,5	
10 <sup>-5</sup>	M+m	100,0+11,4	52,61+23,52	92,20+18,0	84,3+3,80
	P <sub>1,2</sub>	<0,05			
	P <sub>1,3</sub>		>0,5		
	P <sub>1,4</sub>			>0,5	
10 <sup>-6</sup>	M+m	100,0+0,21	111,0+14,66	97,77+16,57	93,83+4,86
	P <sub>1,2</sub>	<0,05			
	P <sub>1,3</sub>		>0,5		
	P <sub>1,4</sub>			>0,5	
10 <sup>-7</sup>	M+m	105,1+16,1	103,3+9,97	100,0+0,1	96,40+1,67
	P <sub>1,2</sub>	>0,5			
	P <sub>1,3</sub>		>0,5		
	P <sub>1,4</sub>			>0,5	
10 <sup>-8</sup>	M+m	111,2+13,7	101,7+1,01	100,0+0,1	102,4+5,31
	P <sub>1,2</sub>	>0,5			
	P <sub>1,3</sub>		>0,5		
	P <sub>1,4</sub>			>0,5	

Примечание: P1-2 – достоверность различий при сравнении фенола с пирокатехином

P1-3 – достоверность различий при сравнении фенола с гидрохиноном

P1-4 – достоверность различий при сравнении с резорцином

Фенол обладает незначительным ингибирующим действием на уровень МДА в ОГМ только в концентрации  $10^{-4}$  М. Резорцин незначительно снижает образования МДА только в концентрациях  $10^{-5}$  –  $10^{-4}$  М.

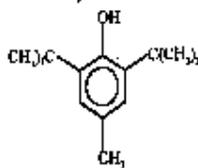
В этой связи, пирокатехин и гидрохинон были выбраны в качестве исходных веществ для последующего синтеза антиоксидантов этого ряда.

К фенольным соединениям относятся циклические соединения, у которых в своей молекуле имеется ароматическое (бензольное) кольцо, содержащее одну или несколько гидроксильных групп. Антиоксидантные свойства фенолов связаны с наличием в их структуре подвижных атомов водорода в гидроксильных группах, которые легко отдают этот атом водорода при взаимодействии с свободными радикалами (СР). В этом случае фенолы выступают в роли восстановителей СР, превращаясь сами в малоактивные феноксильные радикалы.

Число известных фенольных соединений превышает 20000. В значительных количествах они встречаются во всех живых растительных организмах, составляя 1 – 2% биомассы и более и выполняя разнообразные биологические функции. Наибольшим разнообразием химических свойств и биологической активности отличаются фенольные соединения с двумя и более гидроксильными группами в бензольном ядре [7-8].

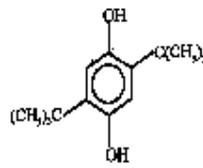
Эти данные также учитывались при синтезе наших веществ.

Инол – жирорастворимый препарат, относящийся к классу экранированных фенолов и содержащий третбутильные группы в положении 2,6. [10, 11].



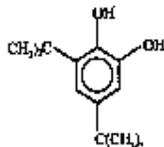
ИОНОЛ

(2,6-ди-tert-бутил-4-метилфенол)



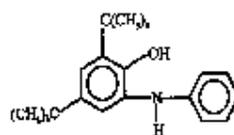
T-2

(1,4-ди-tert-бутилгидрохинон)



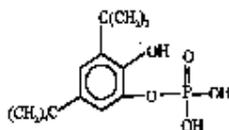
T-3

(3,5-ди-tert-бутилпирокатехин)



T-37

(2-гидрокси-3,5-ди-tert-бутил-N-фениланилин)



K-1

(3,5-ди-tert-бутил-2-гидроксифенилфосфат)

Таблица 2.

Влияние ионола и производных пирокатехина и гидрохинона на кинетику накопления МДА в ОГМ крыс (% содержания уровня МДА от контроля-«норма») (n=9)

Концентрация вещества	Статистические показатели	Исследуемое соединение				
		T-2	T-3	T-37	K-1	Ионол
10 <sup>2</sup>	M+m	3,4+1,82	3,2+1,18	1,4+1,90	8,4+3,87	4,0+0,50
	P <sub>1-5</sub>	>0,5				
	P <sub>2-5</sub>		>0,5			
	P <sub>3-5</sub>			>0,5		
10 <sup>4</sup>	M+m	43,3+3,18	3,8+1,67	2,6+1,41	25,9+2,48	4,0+0,50
	P <sub>1-5</sub>	<0,05				
	P <sub>2-5</sub>		>0,5			
	P <sub>3-5</sub>			>0,5		
10 <sup>6</sup>	M+m	77,7+9,92	4,1+1,66	9,9+0,21	65,6+4,60	29,1-4,17
	P <sub>1-5</sub>	<0,001				
	P <sub>2-5</sub>		<0,05			
	P <sub>3-5</sub>			<0,001		
10 <sup>8</sup>	M+m	100,2+2,34	6,1+2,01	19,4+3,96	72,1+8,87	96,1+3,77
	P <sub>1-5</sub>	>0,5				
	P <sub>2-5</sub>		<0,05			
	P <sub>3-5</sub>			>0,5		
10 <sup>10</sup>	M+m	94,6+9,44	9,4+2,01	91,7+11,8	83,8+3,09	100,8+6,84
	P <sub>1-5</sub>	>0,5				
	P <sub>2-5</sub>		<0,001			
	P <sub>3-5</sub>			>0,5		
10 <sup>12</sup>	M+m	108,8+9,41	38,5+15,91	98,3+2,40	86,8+2,10	102,7+7,87
	P <sub>1-5</sub>	>0,5				
	P <sub>2-5</sub>		<0,05			
	P <sub>3-5</sub>			>0,5		
10 <sup>14</sup>	M+m					
	P <sub>1-5</sub>					
	P <sub>2-5</sub>					
	P <sub>3-5</sub>				>0,5	

Примечание: P1-5 – достоверность различий при сравнении соединения T-2 с ионолом

P2-5 – достоверность различий при сравнении соединения T-3 с ионолом

P3-5 – достоверность различий при сравнении соединения T-37 с ионолом

P4-5 – достоверность различий при сравнении соединения K-1 с ионолом

Как видно из таблицы 2, наиболее высокой антиоксидантной активностью ионол обладает в концентрациях 10<sup>5</sup>-10<sup>3</sup> М, где снижает накопление МДА в ОГМ на 70,9-96,0%. В более низких концентрациях у ионола ингибирующей активности не выявлено.

При наличии третбутильных групп в положении 1,4 (соединение T-2) наблюдается снижение антиокислительной активности (табл.2). Соединение T-2 в концентрации 10<sup>-3</sup> М ингибирует образование МДА на 96,6%. В концентрациях 10<sup>-5</sup>-10<sup>-4</sup> М T-2 снижает образование МДА на 32,7-62,7%. В более низких концентрациях (10<sup>-8</sup>-10<sup>-6</sup> М) данное соединение не влияет на содержание МДА.

Наибольшей антиоксидантной активностью из изучаемых соединений обладает 3,5-дитрет-бутилпирокатехин (соединение T-3), которое ингибирует образование МДА в интервале концентраций 10<sup>-8</sup>-10<sup>-3</sup> М. Уровень МДА при концентрациях соединения 10<sup>-7</sup>-10<sup>-3</sup> М не превышает 9,4-3,1% от контроля-«норма». В концентрации 10<sup>-8</sup> М соединение T-3 ингибирует образование МДА на 61,5%.

Соединение T-37 (алкилированный о-аминофенол) помимо гидроксильных и третбутильных групп в своей структуре имеет фениланилин. Ингибирующая

активность у данного соединения высокая и превосходит ионол. Соединение Т-37 в концентрациях 10-6-10-3 М снижает образование МДА на 80,6-98,7 %. В концентрациях 10-8-10-7 М-на 1,7-8,3%. По эффективности данное соединение превосходит ионол.

Производное пирокатехина – соединение К-1 – содержит фосфатидильный остаток. Данный препарат имеет высокую ингибирующую активность в концентрациях 10-5-10-3 М (снижает уровень МДА на 53,4-91,6%).. Антиоксидантное действие препарата в концентрациях 10-8-10-6М выражено сильнее, чем у ионола (снижает образование МДА на 13,2-21,9%) (рис.1).

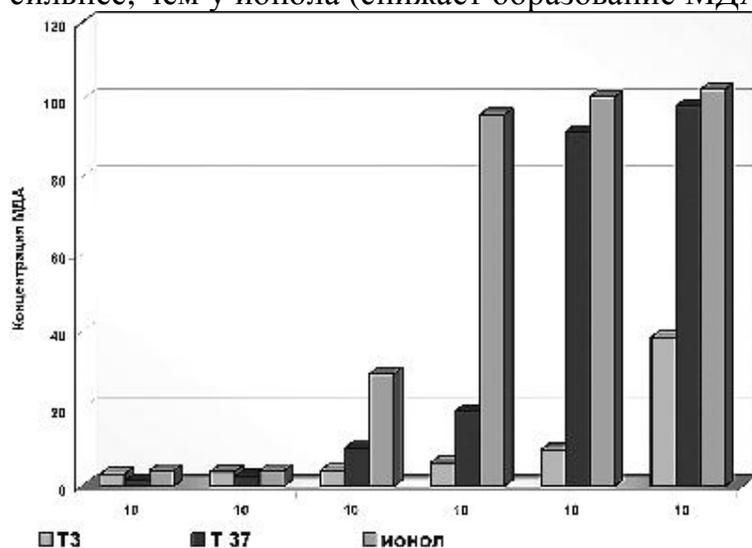


Рис. Влияние производных пирокатехина Т3, Т37, ионола на содержание МДА в ОГМ крыс

Таким образом, исследуемые производные пирокатехина и гидрохинона обладают высокой антиоксидантной активностью. Наиболее эффективными из исследуемых веществ являются соединения Т-3, Т-37. Антиоксидантная активность этих препаратов значительно превосходит ионол (рис.), особенно в диапазоне низких концентраций, где последний не влияет на содержание МДА.

#### Выводы

1. Производные пирокатехина Т-2, Т-3, Т-37, К-1 обладают выраженным ингибирующим действием на железо-аскорбат-зависимое ПОЛ в ОГМ крыс.
2. Антиоксидантная активность у данных соединений зависит от их исходных соединений, среди которых дифенол Т-3 и аминафенол Т-37 превосходят по эффективности ионол.

#### Литература

1. Абрамченко, В. Антиоксиданты и антигипоксанты в акушерстве. – Санкт-Петербург, 2001г., 400 с.
2. Барабой, В.А. Биологическое действие растительных фенольных соединений.-. Киев:Наук. думка, 1976.-260 с.
3. Барабой, В.А. Растительные фенолы и здоровье человека.-М.: Наука, 1984.-160 с.

4. Бурлакова, Е.Б., Алексенко, А.В., Молочикна, Е.М. и др. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. //: АН СССР, Ин-т. хим.физики.-М.: Наука.-1975.-214 с.
5. Владимиров, Ю.А., Арчаков, А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах – М.: Наука, 1972, 252с.
6. Дубинская, В.А., Минеева, М.Ф., Колхир, В.К. Влияние природных веществ растительного происхождения на активность ферментов антиоксидантной защиты // Биоантиоксидант: Материалы международного симпозиума. – Тюмень, 1997.-С.49-50.
- 7.Иванов, И.И. Биоантиокислители. М., Наука, 1975,267 с.
8. Кретович, В.Л. Биохимия растений.-М.: Высш.шк., 1986.-503 с.
9. Мезен, Н.И., Квачева, З. Б., Федулов, А.С., Шадыро, О.И., Тимошук.- Тезисы докладов 4-й Всесоюзной конференции «Биоантиоксидант». Москва,2-4 июня 1992 г., с.256.
10. Рогинский, В.А. Фенольные антиоксиданты: способность и реакционная эффективность. – М.: Наука, 1988, 247 с.
11. Burton, G.W., Ingold, K.I. Autoxidation of biological molecules.-J. Am. Chem. Soc., 1981, V.103, N.21, P.6472-6477.