

УДК 547.789:66.094.3097.8.

## АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ ДІГІДРОКСИФЕНІЛТІАЗОЛІВ

В. В. Одарюк, Л. Е. Гринько, Л. В. Каниболоцкая, Н. И. Бураков\*, И. Д. Одарюк, А. Л. Каниболоцкий\*, В. А. Михайлов\*, А. Н. Шендрик

\*Институт физико-органической химии и углехимии им. Л. М. Литвиненко НАН Украины, г. Донецк

Исследованы антиоксидантные свойства производных дигидроксибензилтиазола в модельной системе железоиндуцированного окисления полиоксиэтиленсорбитанмоноолеата (Твин-80) кинетическим (по поглощению кислорода) и статическим (по продуктам окисления) методами, а также восстанавливающая способность по отношению к  $Fe^{3+}$ . Показано, что изученные соединения являются эффективными антиоксидантами фенольного типа.

*Ключевые слова:* тиазолы, полифенолы, Твин-80, окисление, антиоксидант, восстанавливающая способность.

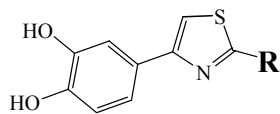
**Введение.** Роль активных форм кислорода (АФК) и инициируемых ими процессов свободнорадикального окисления, в том числе перекисного окисления липидов (ПОЛ), широко обсуждается в литературе в этиологии патологических состояний [1,2].

Развитие ПОЛ можно предотвратить введением специальных добавок – антиоксидантов. При этом на биологические антиоксиданты накладывается ряд ограничений, связанных с биодоступностью, возможной токсичностью, вероятностью проявления нежелательных побочных эффектов и т.п. Эти факты делают актуальным поиск новых веществ с антиоксидантной активностью среди низкотоксичных гетероциклических соединений.

Соединения тиазольного ряда находят эффективное применение в качестве лекарственных средств, красителей и пр. [3]. В последние годы для некоторых производных тиазола были выявлены антиоксидантные свойства [4-6], однако механизм их действия остается практически неизученным. Согласно данным [7], соединения, содержащие комбинацию фенольного или аминного фрагмента и атома серы, способны проявлять антиоксидантную активность в олеофазе за счет продуктов автоокисления самих ингибиторов, каталитически разлагающих гидропероксиды на молекулярные продукты, и тем самым вызывая многократный обрыв цепей окисления. То есть серусодержащие гетероциклы с полифенольным фрагментом могут выступать полифункциональными антиоксидантами, что повышает их эффективность в окислительных процессах.

В связи с вышесказанным, целью данной работы стало исследование антиоксидантной активности производных дигидроксибензилтиазола в модельной системе  $Fe^{2+}$ -инициированного окисления Твина-80 и определение феррицианидным методом их восстанавливающей способности.

**Экспериментальная часть.** Синтез дигидроксибензилтиазолов проводили по методу Ганча реакцией хлорацетилпирокатехина с соответствующими тиоамидами [8]. Чистоту синтезированных соединений подтверждали методом  $^1H$  ЯМР спектроскопии и ВЭЖХ. Структуры изученных тиазолов представлены на рис. 1.



$R = CH_3, -C_6H_5, -p-C_6H_4OH, -Ind, -C_6H_3(OCH_3)_2, -4-Pyr, -3-Pyr$

Рис. 1. Структуры изученных в качестве антиоксидантов тиазолов

Пирокатехин очищали сублимацией в вакууме. Твин-80 (Fluka), Тролокс – 6-гидроксил-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-уксусной кислоты (Aldrich), трихлоруксусную кислоту (Clariant, Германия), одно- и двузамещенные фосфаты натрия (Sigma) использовали без дополнительной очистки. 2-Тиобарбитуровую кислоту, гексацианоферрат калия очищали перекристаллизацией из воды, аскорбиновую кислоту перекристаллизовывали из этилового спирта. Диметилсульфоксид (DMSO) очищали перегонкой при пониженном давлении.

**Определение восстанавливающей способности.** Восстанавливающую способность определяли феррицианидным методом в реакции восстановления гексацианоферрата калия исследуемым антиоксидантом с дальнейшим определением окрашенного комплекса  $Fe^{2+}$  (берлинская лазурь,  $\lambda=700nm$ ) согласно методике [9]. Количественно восстанавливающую способность выражали как величину тангенса угла наклона зависимости оптической плотности от концентрации введенного антиоксиданта ( $tg\alpha$ ).

**Антиоксидантная активность в процессе железоиницированного окисления Твин-80 (статический метод).** Антиоксидантные свойства тиазолов в реакции  $Fe^{2+}$ -иницированного окисления Твин-80 определяли по методике [10] с некоторыми модификациями. В склянки темного стекла с притертой пробкой объемом 200 мл вносили реакционную смесь следующего состава: 4 мл 1% водного раствора Твина-80, 0,4 мл  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л раствора сернокислого железа (II), 0,4 мл  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л аскорбиновой кислоты, 0,4 мл  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л раствора антиоксиданта. В контрольный раствор вместо испытуемого вещества вносили 0,4 мл растворителя (для пирокатехина – вода, для тиазолов – DMSO). Смесь тщательно перемешивали, закрывали герметично пробкой и термостатировали при 323 К 48 часов. После окисления Твина-80 в опытные пробы добавляли по 0,4 мл соответствующего растворителя, а в контрольные – по 0,4 мл раствора вещества, которое испытывали в качестве антиоксиданта. Далее добавляли 2 мл 40% раствора трихлоруксусной кислоты, смесь перемешивали и выдерживали в течение часа. Затем раствор центрифугировали при 9000 об/мин на ультрацентрифуге, отбирали 3 мл надосадочной жидкости и приливали 6 мл 0,25% водного раствора 2-тиобарбитуровой кислоты. Смесь встряхивали и выдерживали 15 мин при 373 К, затем охлаждали и фотометрировали окрашенный в розовый цвет комплекс при 532 нм. Измерение выполняли на спектрофотометре СФ–2000 (Россия).

Фотоколориметрическое определение концентрации продуктов окисления Твина-80 основано на их комплексообразовании с 2-тиобарбитуровой кислотой. Снижение их концентрации в опытных пробах по сравнению с контрольными свидетельствует об антиоксидантной активности (АОА) испытуемого вещества, которую рассчитывали по следующей формуле:

$$AOA(\%) = \frac{D_{\text{контр}} - D_{\text{оп}}}{D_{\text{конт}}} \cdot 100\%, \quad (1)$$

где

$D_{\text{контр}}$  – поглощение контрольной пробы, моль/л;  
 $D_{\text{оп}}$  – поглощение опытной пробы, моль/л.

**Исследование влияния тиазолов на кинетику окисления Твин-80 (кинетический метод).**

Ингибированное окисление Твин-80 изучали газовольнометрическим методом [11] в фосфатной буферной системе (pH=7.4). В качестве инициатора окисления использовали сульфат железа (II).

**Результаты и их обсуждение.** Ненасыщенные жирные кислоты (НЖК), входящие в состав липидов плазматических мембран, являются одной из основных мишеней действия свободных радикалов. Образующиеся аддукты окисления НЖК изменяют свойства мембран, что приводит к изменению их проницаемости, повреждению транспортных АТФаз, изменению поверхностного заряда мембран и т.д. [12].

Для полного предотвращения или замедления таких процессов используют добавки антиоксидантов, первичное тестирование свойств которых проводят на модельных системах.

В качестве модельной системы можно использовать инициированное окисление индивидуальных НЖК, их смесей и сложных соединений в органических средах. Молекула Твин-80 (рис.2) содержит остаток олеиновой кислоты, поэтому процесс окисления данного субстрата может моделировать закономерности, наблюдаемые при окислении НЖК *in vivo*. При этом Твин-80 является водорастворимым поверхностно-активным соединением, что позволяет проводить исследование в водных средах. Это обусловило выбор Твина-80 в качестве модельного соединения для изучения антиоксидантных свойств тиазолов.

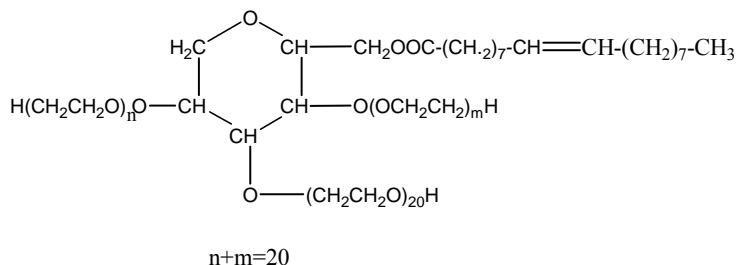


Рис. 2. Структура Твин-80

Так как изучаемые тиазолы содержат о-дигидроксибензольный фрагмент, то в качестве реперного соединения нами был исследован пирокатехин. В качестве «соединения сравнения» в тех же условиях определяли АОА Тролокса – водорастворимого аналога витамина Е.

На рис. 3. представлены данные об антиоксидантных свойствах соединений в процессе окисления Твина-80. Как видно из рис. 3, АОА производных тиазола выше, чем у известного ингибитора фенольного типа – пирокатехина, и для некоторых дигидроксибензилзамещенных тиазолов близки к АОА Тролокса. Замещенные тиазолы, молекулы которых не содержат полифенольный фрагмент, практически не проявляли антиоксидантной активности.

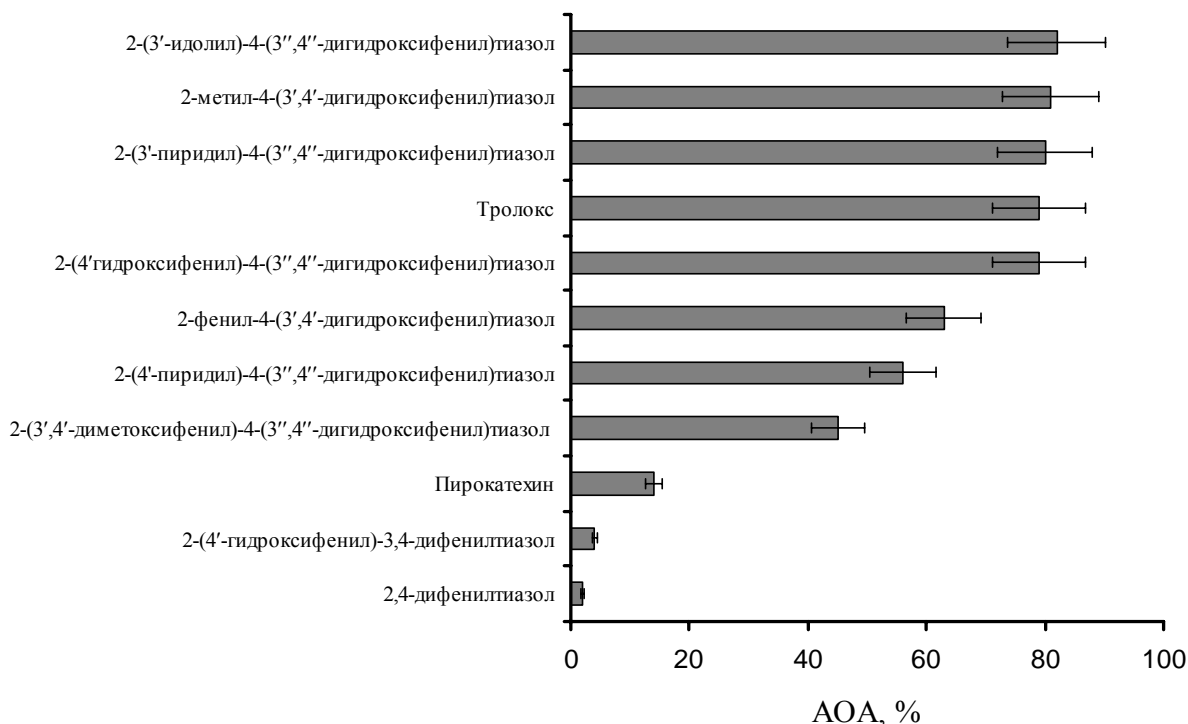


Рис. 3. Антиоксидантная активность производных тиазола в процессе  $Fe^{2+}$ -индуцированного окисления Твин-80

Для изучения кинетики окисления Твина-80 газовольюмометрическим методом проведена оптимизация методики и установлены оптимальные концентрации исходных веществ, при которых каждый из реагентов не поглощал бы кислород, а при их совместном присутствии в растворе происходило окисление с заметной скоростью. То есть, чтобы сульфат железа (II) выступал инициатором окисления, а Твин-80 – субстратом.

Кинетические кривые реакции  $Fe^{2+}$ -иницированного окисления Твина-80 приведены на рис. 4.

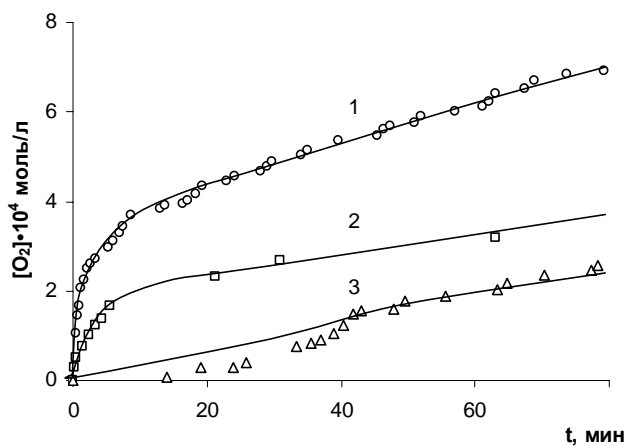


Рис. 4.  $Fe^{2+}$ -иницированное окисление Твина-80 без добавок (1), в присутствии пирокатехина (2), 2-фенил-4-(3',4'-дигидроксифенил)тиазола (3).  $C_{\text{Твин-80}}=0.1$  моль/л;  $C_{FeSO_4}=8 \cdot 10^{-4}$  моль/л,  $C_{AO}=1 \cdot 10^{-4}$  моль/л;  $T=308$  К,  $pH=7.4$

Введение пирокатехина и тиазолов приводит к уменьшению скорости реакции (рис.4.). В присутствии антиоксидантов выход кинетической кривой на насыщение происходит быстро, что делает невозможным достоверный расчет начальной скорости окисления. В связи с этим, для оценки эффективности ингибирующего действия тиазолов в процессе окисления Твина-80 использовали формулу:

$$\text{Эффективность ингибитора} = \frac{C_t(O_2)}{C_t^{\text{inh}}(O_2)}, \quad (2)$$

где

$C_t(O_2)$  – количество кислорода, поглощенного в отсутствии ингибитора за время  $t$  ( $t=30$  мин);

$C_t^{inh}(O_2)$  – количество кислорода, поглощенного при ингибированном окислении за то же время.

Полученные данные по эффективности тиазольных антиоксидантов в реакции иницированного окисления Твин-80 представлены в табл. 1.

Таблица 1  
Эффективность ингибирующего действия тиазолов в процесс окисления Твина-80  
 $pH=7.4, T=308K, C_{AO}=1 \cdot 10^{-4}$  моль/л

Антиоксидант	$C_{O_2} \cdot 10^4$ , моль/л	Эффективность ингибитора
Неингибированное окисление	4.9	1.0
2-фенил-4-(3',4'-дигидроксифенил)тиазол	1.0	4.9
2-(4'-гидроксифенил)-4-(3'',4''-дигидроксифенил)тиазол	1.4	3.5
2-метил-4-(3',4'-дигидроксифенил)тиазол	0.6	8.2
2-(3'-индолил)-4-(3'',4''-дигидроксифенил)тиазол	0.8	6.1
2-(3',4'-диметоксифенил)-4-(3'',4''-дигидроксифенил)тиазол	0.9	5.4
Пирокатехин	3.1	1.6

Как видно из представленных данных, тиазолы снижают скорость окисления Твина-80. Высокая АОА тиазолов может быть обусловлена влиянием тиазольного цикла и заместителей на донорные свойства полифенольного фрагмента молекулы антиоксиданта. За счет присутствия тиазольного фрагмента возможна дополнительная стабилизация фенокисильного радикала антиоксиданта. С другой стороны, нельзя исключать возможность того, что дигидроксифенилзамещенные тиазолы могут проявлять повышенную антиоксидантную активность за счет полифункциональности и комбинированного механизма ингибирования окисления.

Достоверной корреляция между АОА (статический метод) и эффективностью ингибитора (кинетический метод) не выявлено. Это объясняется, по-видимому, тем, что газовольнометрическим методом можно оценить влияние ингибитора только на начальный этап процесса окисления Твина-80, в то время как значение АОА позволяет оценить это влияние на более глубоких стадиях реакции. Отсутствие корреляции между АОА и эффективностью ингибитора может указывать на то, что характер влияния одного и того же антиоксиданта на образование промежуточных и конечных продуктов окисления может отличаться.

Еще одной мерой АОА является восстанавливающая способность, которая выражает способность соединением отдавать электрон, возвращая окисленный субстрат в исходное состояние.

Для изученных соединений в интервале концентраций  $1 \cdot 10^{-5}$ – $1.5 \cdot 10^{-4}$  наблюдается линейный рост оптической плотности с увеличением количества введенного антиоксиданта. 2,4-Дифенилтиазол, 2-(4'-гидроксифенил)-3,4-дифенилтиазол (табл.2) практически не проявляют восстанавливающей способности. Это согласуется с отсутствием у них антиоксидантных свойств при окислении Твина-80.

Восстанавливающая способность пирокатехина является максимальной среди всех изученных соединений и превышает данную величину для Тролокса в 2.6 раза.

Таблица 2  
Восстанавливающая способность субстратов

№ п/п	Субстрат	$tg \alpha \cdot 10^{-4}$
1	2,4-дифенилтиазол	0.7±0.1
2	2-(4'-гидроксифенил)-3,4-дифенилтиазол	0.8±0.1
3	Пирокатехин	17.29±0.06
4	2-(3',4'-диметоксифенил)-4-(3'',4''-дигидроксифенил)тиазол	9.5±0.4
5	2-(4'-пиридил)-4-(3'',4''-дигидроксифенил)тиазол	9.0±0.8
6	2-фенил-4-(3',4'-дигидроксифенил)тиазол	4.9±0.2
7	2-(4'гидроксифенил)-4-(3'',4''-дигидроксифенил)тиазол	5.9±0.3
8	Тролокс	6.6±0.1
9	2-(3'-пиридил)-4-(3'',4''-дигидроксифенил)тиазол	10.0±0.6
10	2-метил-4-(3',4'-дигидроксифенил)тиазол	15.3±0.1
11	2-(3'-идолил)-4-(3'',4''-дигидроксифенил)тиазол	8±1

**Выводы.** Комбинирование в молекуле тиазольного и полифенольного фрагментов позволяет получить эффективные ингибиторы окисления органических веществ в жидкой фазе. Присутствие в молекуле тиазольного цикла, очевидно, дополнительно стабилизирует ответственный за антиоксидантную активность соединения пирокатехиновый фрагмент молекулы, в результате чего дигидроксифенилтиазолы являются более эффективными антиокислителями, чем незамещенный пирокатехин.

## РЕЗЮМЕ

Досліджено антиоксидантні властивості похідних дигідроксифенілтіазола у модельній системі залізоіндукованого окиснення поліоксетиленсорбітанмоноолеату (Твін-80) кінетичним (за поглинанням кисню) і статичним (за продуктами окиснення) методами, а також відновлююча здатність по відношенню до  $Fe^{3+}$ . Знайдено, що досліджені сполуки є ефективними антиоксидантами фенольного типу.

*Ключові слова:* тіазоли, поліфеноли, Твін-80, окиснення, антиоксидант, відновлююча здатність.

## SUMMARY

It has been studied antioxidant properties of dihydroxyphenylthiazole derivatives in the model system of ferrous initiated oxidation of polyoxyethylene sorbitan monooleate (Tween-80) by the kinetic (oxygen consumption) and static (products of oxidation) methods, and reducing power in the reaction with  $Fe^{3+}$ . The investigated compounds has been found as effective phenolic-type antioxidants.

*Keywords:* thiazole, polyphenols, Tween-80, oxidation, antioxidant, reducing power.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Янковский Ю. В. Токсичность кислорода и биологические системы (эволюционные, экологические и медико-биологические аспекты). / Ю. В. Янковский. – СПб: Игра, 2000. – 294 с.
2. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life/ B. Halliwell// Plant Physiology. – 2006. – Vol. 141. – P. 312-322
3. Иванский В. И. Химия гетероциклических соединений / В. И. Иванский – М: Высш. школа, 1978. – 559 с.
4. Исследование антиокислительных свойств тиамин / П. И. Лукиенко, Н. Г. Мельниченко, И. В. Зверинский и др.// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2000. – Т. 130, № 9. – С. 303-305.
5. De S. Antioxidant activity of an aminithiazole compounds: possible mechanism / S. De, S. Adhikari, J. Tilak-Jain et al. // Chemico-Biological Interactions. – 2008. – No 173. – P. 215-223.
6. Phenolic thiazoles as novel orally-active neuroprotective agents / J. J. Harnett, V. Roubert, Ch. Dolo et al. // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2004. – No 14. – P. 157-160.
7. Синтез и исследование антиокислительной активности различных производных 2-амино-4-фенил-1,3-тиазола / И. А. Рзаева, С. Э. Садигова, Т. М. Векилова и др. // Нефтехимия. – Т. 45, № 6. – С. 470-475.
8. Hantzsch A. Ueber Verbindungen des Thiazols (Pyridins der Thiophenreihe) / A. Hantzsch, J. H. Weber // Dtsch. Chemischen Berichte. – 1887. –V. 20, No 2. – P. 3118-3132.
9. Oyaizu M. Antioxidant activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography / M. Oyaizu // Nippon Shokunin Kogyo Gakkaishi. – 1986. – No 35. – P.771-775.
10. Определение антиокислительной активности химических соединений/ С. Г. Благородов, А. П. Шепелев, Н. А. Дмитриева и др. // Хим.-фарм. журн. – 1987. – Т. 21, № 3. – С. 292-296.
11. Эмануэль Н. М. Цепные реакции окисления углеводов в жидкой фазе / Н. М. Эмануэль, Е. Т. Денисов, З. К. Майзус. – Москва: Наука, 1965. – 506 с.
12. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress / B. Halliwell // Biochemical Society Transactions – 2007. – No 35. – P. 1147-1150.

*Поступила в редакцию 22.03.2010 г.*