



УДК 547.565.2'118:577.352.38

## СИНТЕЗ И СВОЙСТВА МЕМБРАНОАДРЕСОВАННЫХ АНТИОКСИДАНТОВ НА ОСНОВЕ ФОСФОРИЛИРОВАННЫХ ПИРОКАТЕХИНОВ

© 1995 г. А. А. Ахрем, В. И. Долгопалец, М. А. Кисель, Н. И. Мезен\*\*,  
В. А. Тимощук\*, А. С. Федулов\*\*, О. И. Шадыро\*

*Институт биоорганической химии АН Беларуси, Минск*

*\* Белгосуниверситет*

*\*\* Минский медицинский институт*

Поступила в редакцию 20.07.94 г.

С использованием 3,5-ди-*трет*-бутил-*о*-хинона в качестве исходного соединения синтезированы амфифильные мембраноадресованные антиоксиданты – 3,5-ди-*трет*-бутил-2-гидроксифенилфосфат, (3,5-ди-*трет*-бутил-2-гидроксифенил)гексадецилфосфат и (3,5-ди-*трет*-бутил-2-гидроксифенил)холестерилфосфат, различающиеся гидрофобно-гидрофильным балансом. 3,5-Ди-*трет*-бутил-2-гидроксифенилфосфат и (3,5-ди-*трет*-бутил-2-гидроксифенил)гексадецилфосфат уже в концентрации  $10^{-8}$  М подавляют образование малонового альдегида при перекисном окислении липидов гомогената мозга крыс, инициированном системой  $Fe^{2+}$ -аскорбат. При концентрациях антиоксидантов в гомогенате мозга  $10^{-4}$  М и выше образование малонового альдегида замедляется более эффективно, чем при аналогичных концентрациях токоферола.

*Ключевые слова: мембраноадресованные антиоксиданты, перекисное окисление липидов, гомогенат мозга.*

Свободнорадикальные реакции, имеющие место в клеточных мембранах человека и животных, играют важную роль в патогенезе воспалительных процессов, рака, ишемической болезни и в развитии дегенеративных явлений, таких, как старение, артрит и иммунодефицит [1 - 3]. К наиболее изученным свободнорадикальным реакциям относится перекисное окисление липидов (ПОЛ) [4, 5]. На первой стадии ПОЛ липиды, содержащие остатки полиеновых жирных кислот, превращаются в гидроперекиси. Присутствие в системе ионов металлов переменной валентности способствует развитию цепных реакций, деструктивному распаду гидроперекисей и образованию вторичных продуктов ПОЛ [4, 5]. Недавно мы показали, что свободные радикалы могут вызывать не только ПОЛ, но и фрагментацию ряда фосфолипидов в результате атаки их полярных липидных группировок [6, 7].

В живых клетках существует система подавления свободнорадикальных процессов, в состав которой входят как полимерные (сулероксиддисульфидаза, каталаза, глутатионзависимые пероксидазы и трансферазы), так и низкомолекулярные биоантиоксиданты [8, 9]. Низкомолекулярные анти-

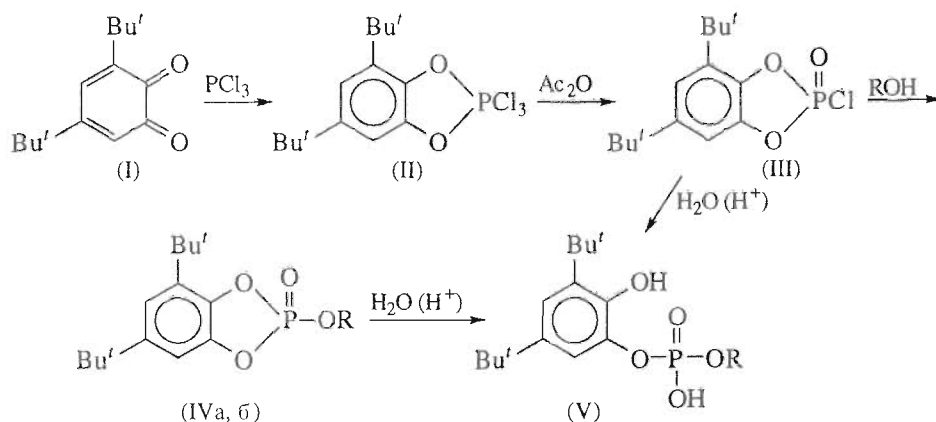
оксиданты в свою очередь подразделяются на водорастворимые (витамин С, глутатион) и липофильные (витамины А, Е и К). Последние ингибируют ПОЛ в гидрофобной области мембран, в то время как гидрофильные антиоксиданты нейтрализуют зарождающиеся в водной фазе активные частицы кислорода [9].

В последние годы многие исследователи заняты поиском синтетических ингибиторов радикальных процессов, которые рассматриваются ими как потенциальные лекарственные вещества для профилактики и лечения патологий, обусловленных сбоями в антиокислительной системе организма. Так, синтезирован ряд пространственно-затрудненных фенольных антиоксидантов, эффективно подавляющих ПОЛ [10, 11], а Э.Е. Нифантьевым и сотрудниками предложены так называемые мембраноадресованные антиоксиданты – фосфатидилгидрохиноны и фосфатидилионолы [12, 13]. Предполагается, что такие соединения будут легче проникать в мембраны и оказывать пролонгированное действие, причем их фосфатидильный остаток будет выступать синергистом пространственно-затрудненной фенольной группировки. Недавно высказана гипотеза о наличии антиоксидантных свойств у холестерина, который является одним из главных компонентов мембран клеток животных [14].

Сокращения: ПОЛ – перекисное окисление липидов, ТБК – тиобарбитуровая кислота.

Учитывая эти факты и соображения, мы поставили своей целью изучение новых мембраноадресованных антиоксидантов, имитирующих природные фосфолипиды, и синтезировали (3,5-ди-*трет*-бутил-2-гидроксифенил)гексадецилфосфат (VI) и

(3,5-ди-*трет*-бутил-2-гидроксифенил)холестерилфосфат (VII), а также (для выяснения роли гидрофобно-гидрофильного баланса в ингибировании ПОЛ) водорастворимый 3,5-ди-*трет*-бутил-2-гидроксифенилфосфат (V).



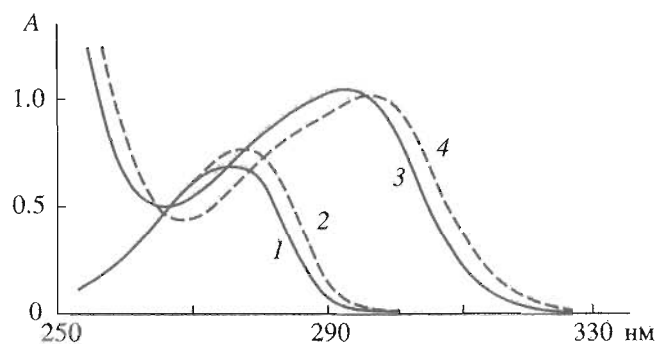
(V) R = H

(IVa), (VI) R = *n*-C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>

(IVб), (VII) R = 5-холестен-3β-ил

В качестве исходного соединения для синтеза был выбран 3,5-ди-*трет*-бутил-*о*-хинон (I). При его обработке треххлористым фосфором образовывался промежуточный трихлорфениленфосфат (II), легко переведенный нагреванием с уксусным ангидридом в монохлорфениленфосфат (III). Следует отметить, что обычно соединения типа (III) получают из соответствующих пирокатехинов действием PCl<sub>3</sub> или PCl<sub>5</sub> с последующим окислением хлором [15, 16]. Наш метод синтеза таких соединений выгодно отличается тем, что реакция протекает количественно, в мягких условиях и при этом легко контролируется по исчезновению интенсивной окраски *о*-хинона.

Действием гидрофобных спиртов – *n*-гексаканола и холестерина – хлорфосфат (III) был превращен в соответствующие триэфиры (IV), кото-



Спектры поглощения 3,5-ди-*трет*-бутил-2-гидроксифенилфосфата (V) в воде (1), спирте (2), 0,05 н. КОН (3) и 0,05 н. спиртовом растворе КОН (4).

рые без выделения были гидролизованы разбавленной уксусной кислотой до стерически более выгодных ациклических диалкилфосфатов (VI) и (VII). Аналогично был гидролизован до монофосфата (V) и хлорциклофосфат (III).

Наличие фенольной группировки в соединениях (V) - (VII) было доказано УФ-спектрами (рисунков). Для последних характерны максимум поглощения при 277 - 278 нм, который претерпевает значительный bathochromный сдвиг, и увеличение интенсивности поглощения при подщелачивании. В спектрах <sup>1</sup>H-ЯМР соединений (VI) и (VII) присутствуют характерные сигналы ароматических протонов, протонов метильных групп *трет*-бутильных заместителей ароматического кольца, метильных и метиленовых групп холестеринного и гексадецильного остатков. Сравнение хроматографической подвижности 3,5-ди-*трет*-бутил-2-гидроксифенилфосфата (V) - (VII) и фосфатидилхолина на пластинках с тонким слоем силикагеля свидетельствует о сходстве адсорбционных свойств синтезированных нами соединений и природных фосфолипидов (см. табл. 1).

Ингибирование ПОЛ полученными веществами было изучено на гомогенате мозга крыс. В гомогенате инициировали Fe<sup>2+</sup>-аскорбатзависимое ПОЛ в присутствии природного антиоксиданта токоферола и соединений (V) - (VII). Как следует из табл. 2, в сравнении с α-D-токоферолом соединения (V) и (VI) уже при концентрации 10<sup>-5</sup> М значительно эффективнее ингибируют накопление активных в тесте с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) продуктов ПОЛ. При концентрации ингибиторов (V), (VI) и (VII), равной 10<sup>-3</sup> М,

**Таблица 1.** Физико-химические свойства мембраноадресованных антиоксидантов на основе замещенных пирокатехинов

Соединение	$R_f$ ( $R_{PC}$ )*	Коэффициент распределения в системе <i>n</i> -бутанол–вода
(V)	0.32(0.89)	4.5
(VI)	0.61(1.69)	10.6
(VII)	0.68(1.89)	17.0
Фосфатидилхолин (PC)	0.36(1.00)	–

\* ТСХ на силикагеле в системе растворителей хлороформ–метанол–вода, 65 : 25 : 4 (по объему).

образование ТБК-активных продуктов снижается до 8.5, 5.5 и 18.2% соответственно. При этой концентрации токоферола выход ТБК-активных продуктов составляет 75% от контроля. При низких концентрациях практически не проявляет активности антиоксидант на основе холестерина. По данным распределения в системе *n*-бутанол–вода (табл. 1), он является самым гидрофобным соединением. По-видимому, в водном растворе большая часть молекул этого соединения подвергается агрегации, что приводит к резкому снижению эффективной концентрации антиоксиданта как в водной фазе, так и в мембране. Соединение (VI), очевидно, хорошо встраивается в мембрану, а водорастворимый антиоксидант (V) распределяется между гидрофобной липидной фазой и водой. Благодаря такому распределению соединение (V) ингибирует зарождение активных частиц кислорода и предотвращает образование конъюгированных диенов и гидроперекисей фосфолипидов [9, 17].

Основываясь на данных табл. 1 и 2, можно сделать вывод, что мембраноадресованные антиок-

сиданты на основе ди-*трет*-бутилзамещенного пирокатехина являются эффективными ингибиторами ПОЛ в биологических мембранах, а их ингибирующая активность сложным образом зависит от концентрации и гидрофобно-гидрофильного баланса молекул этих соединений.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали холестерин (Merck, ФРГ), гексадеканол (Fluka, Швейцария), тиобарбитуровую кислоту (Serva, ФРГ), силикагель для колоночной хроматографии с размером частиц 40 - 100 мкм (Chemapol, Чехо-Словакия). 3,5-Ди-*трет*-бутил-*о*-хинон получали по методике, описанной в работе [18].

Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР регистрировали на приборе Bruker AC-200. Электронные спектры в ультрафиолетовой области записывали на приборе Sresord M-40. ИК-спектры получали с помощью прибора UR-20. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Merck с закрепленным слоем силикагеля. Пятна на пластинках обнаруживали с помощью реагента на фосфолипиды [19].

**3,5-Ди-трет-бутил-1,2-фениленхлорфосфат (III).** К охлажденному до  $-5^{\circ}\text{C}$  раствору 565 мг 3,5-ди-*трет*-бутил-*о*-хинона в 20 мл хлористого метилена постепенно прибавляли при перемешивании 0.25 мл хлористого фосфора (III) в 10 мл хлористого метилена в течение 15 мин. Реакционную смесь доводили до комнатной температуры, а затем кипятили 3 ч с обратным холодильником. При кипячении интенсивная окраска раствора постепенно слабела и к концу нагревания приобретала бледно-зеленый цвет. Растворитель упаривали на роторном испарителе и остаток дважды упаривали с толуолом для удаления остатков  $\text{PCl}_3$ . К остатку прибавляли 3 мл толуола, 0.5 г свежеперегнанного уксусного ангидрида, смесь кипятили с обратным холодильником. Через 1.5 ч растворитель удаляли в вакууме, к остатку прибавляли 5 мл толуола и смесь снова упаривали.

**Таблица 2.** Скорость накопления ТБК-активных продуктов в гомогенате головного мозга крыс при инициации ПОЛ комплексом  $\text{Fe}^{2+}$  – аскорбат в присутствии токоферола и синтезированных антиоксидантов (в процентах к контрольному эксперименту, без антиоксидантов)

[Антиоксидант], M	Токоферол	(V)	(VI)	(VII)
$10^{-8}$	101.4 ± 0.4	86.8 ± 2.1	90.6 ± 0.7	113.4 ± 1.8
$10^{-7}$	96.9 ± 2.1	83.8 ± 3.1	81.1 ± 0.3	104.7 ± 6.6
$10^{-6}$	88.3 ± 2.8	72.1 ± 8.9	62.9 ± 1.6	109.5 ± 6.7
$10^{-5}$	80.3 ± 5.4	46.6 ± 4.6	27.6 ± 5.3	90.3 ± 6.6
$10^{-4}$	76.0 ± 8.1	25.9 ± 2.5	12.6 ± 4.3	50.6 ± 2.8
$10^{-3}$	75.4 ± 9.7	8.5 ± 3.9	5.5 ± 1.1	18.2 ± 5.0

Образующееся желто-оранжевое масло хлорфосфата (III) растворяли в 15 мл свежеперегнанного тетрагидрофурана и использовали в последующих синтезах без очистки.

**3,5-Ди-*трет*-бутил-2-гидроксифенилфосфат (V).** К 5 мл раствора 3,5-ди-*трет*-бутил-1,2-фениленхлорфосфата (III) прибавляли 2 мл 10% водной уксусной кислоты, смесь выдерживали 24 ч при комнатной температуре и упаривали. Остаток растворяли в 5 мл хлороформа и хроматографировали на колонке (2 × 30 см), заполненной силикагелем. Элюирование проводили градиентом метанола в хлороформе. Фракции, дающие синее окрашивание с реагентом на фосфолипиды, собирали и растворитель упаривали. Остаток перекристаллизовывали из метанола. Выход 70% (в расчете на хинон), т. пл. 170°C; ИК (пленка,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ ): 1305, 1593, 2200 - 3400. Найдено, %: P 9.86.  $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{O}_5\text{P}$ . Вычислено, %: P 10.26.

**(3,5-Ди-*трет*-бутил-2-гидроксифенил)гексадецилфосфат (VI).** 500 мг *n*-гексадеканола растворяли в 5 мл раствора 3,5-ди-*трет*-бутил-1,2-фениленхлорфосфата (III) в тетрагидрофуране, к полученному раствору прибавляли 0.3 мл триэтиламина и смесь выдерживали 10 сут при комнатной температуре. Выпавший за это время гидроксид триэтиламина отфильтровывали и растворитель упаривали. Чтобы полностью удалить из воскообразного остатка триэтиламин, операцию упаривания тетрагидрофурана повторяли дважды. Остаток растворяли в 15 мл тетрагидрофурана, прибавляли 3 мл 15% уксусной кислоты и полученный раствор сутки выдерживали при комнатной температуре. Растворитель упаривали, остаток растворяли в 5 мл хлороформа и хроматографировали на колонке (2 × 30 см), заполненной силикагелем. Колонку элюировали 200 мл хлороформа, а затем его смесями с метанолом, повышая концентрацию спирта на 10% в каждом последующих 200 мл элюента. Фракции с фосфорсодержащими веществами собирали и растворитель упаривали. Выход фосфата (VI) 65%; ИК (пленка,  $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ ): 1305, 1592, 2100 - 3600.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м. д.): 1.24(с), 1.34(с), 0.80 - 1.40(м), 7.04(с), 7.00(с).

**(3,5-Ди-*трет*-бутил-2-гидроксифенил)холестерилфосфат (VII).** К 5 мл раствора 3,5-ди-*трет*-бутил-1,2-фениленхлорфосфата (III) в тетрагидрофуране прибавляли 800 мг холестерина и 0.3 мл триэтиламина. Дальнейшие операции проводили так же, как при синтезе соединения (VI). Выход антиоксиданта (VII) 36%.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м. д.): 1.24(с), 1.34(с), 0.80 - 1.40(м), 7.04(с), 7.10(с).

**Определение ингибирующего действия антиоксидантов.** Гомогенат мозга крыс готовили измельчением ткани в 10-кратном объеме 50 мМ трис-НСI (рН 7.4). 50 мкл гомогената разбавляли 350 мкл буферного раствора, прибавляли к полу-

ченной суспензии 50 мкл спиртового раствора антиоксиданта и 50 мкл смеси, содержащей  $1.2 \times 10^{-7}$  М сульфат железа и  $10^{-5}$  М аскорбиновую кислоту. Смесь инкубировали 30 мин при 37°C, приливали 3 мл 0.375% раствора тиобарбитуровой кислоты в 0.25 М НСI и нагревали 15 мин на кипящей водяной бане. После центрифугирования суспензии в течение 10 мин при 2000 об/мин супернатант отбирали и измеряли поглощение при 530 нм. Процент ингибирования рассчитывали относительно контрольного эксперимента, проведенного в отсутствие антиоксиданта.

**Определение распределения в системе *n*-бутанол-вода.** 1 мМ раствор антиоксиданта в *n*-бутаноле, насыщенном водой, интенсивно встряхивали с равным объемом воды, насыщенной *n*-бутанолом. Нижний и верхний слой разделяли центрифугированием и измеряли поглощение в органической фазе при 280 нм. Коэффициент распределения рассчитывали по формуле

$$k = A_2 / (A_1 - A_2),$$

где  $A_1$  и  $A_2$  – оптическое поглощение бутанольного раствора до и после распределения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Floyd R.A. // *FASEB J.* 1990. V. 4. № 6. P. 2587 - 2597.
2. Singal P.K., Petkau A., Gerrard J.M., Hrushovetz S., Foerster J. // *Mol. Cell Biol.* 1988. V. 84. № 2. P. 121 - 122.
3. Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. № 17. P. 7915 - 7922.
4. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. // *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford: Clarendon Press, 1989. P. 188 - 233.
5. Slater T.F. // *Biochem. J.* 1984. V. 222. № 1. P. 1 - 15.
6. Ахрем А.А., Едимичева И.П., Зайцев А.А., Кисель М.А., Тимощук В.А., Шадыро О.И. // Докл. АН СССР. 1991. Т. 316. № 4. С. 919 - 921.
7. Ахрем А.А., Кисель М.А., Шадыро О.И., Юркова И.Л. // Докл. РАН. 1993. Т. 330. № 4. С. 716 - 718.
8. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. // Успехи соврем. биологии. 1993. Т. 113. В. 4. С. 442 - 455.
9. Кения М.В., Лукаш А.И., Гуськов Е.П. // Успехи соврем. биологии. 1993. Т. 113. В. 4. С. 456 - 470.
10. Еришов В.В., Никифоров Г.А., Володькин А.А. Пространственно-затрудненные фенолы. М.: Химия, 1972.
11. Рогинский В.А. Фенольные антиоксиданты: реакционная способность и эффективность. М.: Наука, 1988.
12. Нифантьев Э.Е., Предводителев Д.А., Золотов М.А. // Биоорганич. химия. 1981. Т. 7. № 7. С. 1100 - 1106.
13. Нифантьев Э.Е., Предводителев Д.А., Золотов М.А. // Биоорганич. химия. 1982. Т. 8. № 9. С. 1263 - 1268.

14. Smith L.L. // Free Radical Biol. and Med. 1991. V. 11. P. 47 - 61.
15. Gross H., Gloede S. // Chem. Ber. 1963. V. 96. P. 1378 - 1394.
16. Khawaja T.A., Reese C.B. // J. Amer. Chem. Soc. 1966. V. 88. P. 3446 - 3447.
17. Miura U., Utsumi H., Hamada A. // Arch. Biochem. and Biophys. 1993. V. 300. № 1. P. 148 - 156.
18. Gierer J., Insgard F. // Acta chem. scand. 1977. V. 31B. № 7. P. 546 - 560.
19. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin J.M. // J. Chromat. 1975. V. 114. P. 129 - 141.

## Synthesis and Properties of Membrane-Addressed Antioxidants on the Basis of Phosphorylated Pyrocatechols

A. A. Akhrem, V. I. Dolgopalets, M. A. Kisel', N. I. Mezen\*\*,  
V. A. Timoshchuk\*, A. S. Fedulov\*\*, and O. I. Shadyro\*

*Institute of Bioorganic Chemistry, Belarussian Academy of Sciences, Minsk, Belarus'*

*\*Belarussian State University, Minsk, Belarus'*

*\*\* Minsk Medical Institute, Minsk, Belarus'*

**Abstract** – Amphiphilic membrane-addressed antioxidants differing in their hydrophobic–hydrophilic balance, 3,5-di-*tert*-butyl-2-hydroxyphenyl phosphate, (3,5-di-*tert*-butyl-2-hydroxyphenyl)hexadecyl phosphate, and (3,5-di-*tert*-butyl-2-hydroxyphenyl)-5-cholesten-3 $\beta$ -yl phosphate, were synthesized starting from 3,5-di-*tert*-butyl-*o*-quinone. Even at 10<sup>-8</sup> M concentration, 3,5-di-*tert*-butyl-2-hydroxyphenyl phosphate and (3,5-di-*tert*-butyl-2-hydroxyphenyl)hexadecyl phosphate inhibit formation of malonic aldehyde during peroxidation of lipids from rat brain homogenate initiated with a Fe<sup>2+</sup>–ascorbate system. At 10<sup>-4</sup> M and higher concentrations of antioxidants in the brain homogenate, the formation of malonic aldehyde is inhibited more efficiently than with tocopherol at the same concentrations.

*Key words: membrane-addressed antioxidants, lipid peroxidation, rat brain homogenate.*