

*На правах рукописи*



**Олейник Алёна Сергеевна**

**СИНТЕЗ, АНТИОКСИДАНТНАЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ  
АКТИВНОСТЬ S-[Ω-(ГИДРОКСИАРИЛ)АЛКИЛ]ТИОСУЛЬФАТОВ  
И Ω-(ГИДРОКСИАРИЛ)АЛКАНСУЛЬФОНАТОВ НАТРИЯ**

02.00.03 – органическая химия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Новосибирск – 2009

Работа выполнена в ГОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет»

Научный руководитель: кандидат химических наук  
доцент Кандалинцева Н.В.

Официальные оппоненты: доктор химических наук  
профессор Горностаев Л.М.

кандидат химических наук  
Щукин Г.И.

Ведущая организация: Институт химической биологии и  
фундаментальной медицины СО РАН

Защита состоится «29» мая 2009 года в 14 ч 30 мин

на заседании диссертационного совета Д 003.049.01 при Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН  
по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 9.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН.

Автореферат разослан «29» апреля 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного  
совета, доктор химических наук



Петрова Т.Д.

## Общая характеристика работы

**Актуальность темы.** К настоящему времени научно обоснована необходимость включения антиоксидантов в комплексную профилактику и терапию патологических состояний, сопровождающихся активизацией оксидантных процессов в организме. Большинство фенольных антиоксидантов (ФАО), применяемых в современной медицинской практике, обладают липофильными свойствами, между тем более привлекательными для использования в фармацевтических целях считаются гидрофильные соединения, выгодно отличающиеся большей биологической доступностью и скоростью транспорта в организме, а так же возможностью направленного введения.

Описанные в литературе водорастворимые ФАО, как правило, представляют собой производные природных или синтетических фенолов, модифицированные путём введения гидрофильных групп. Противоокислительные свойства таких соединений определяются их антирадикальной активностью. В то же время среди липофильных ФАО наиболее эффективными ингибиторами процессов свободнорадикального окисления являются антиоксиданты полифункционального действия, в частности, серо(азот)содержащие производные алкилированных фенолов, способные инактивировать как свободные радикалы, так и их предшественники – липопероксиды.

Ранее в НИИ химии антиоксидантов НГПУ на основе  $\omega$ -(4-гидроксиарил)-галогеналканов был осуществлен синтез водорастворимых полифункциональных ФАО, содержащих в качестве гидрофильных группировок алкиламмонийные и изотиурониевые группы. Однако *in vivo* для данных соединений наряду с выраженной протекторной активностью фиксировали и проявление токсических свойств.

Вместе с тем, до последнего времени осуществлять направленный синтез новых гидрофильных ФАО, по свойствам заданным образом отличающихся от известных аналогов, не представлялось возможным в силу отсутствия достаточного количества сведений о влиянии структуры таких антиоксидантов на их биоантиокислительные свойства.

Это обуславливает актуальность создания новых классов гидрофильных ФАО и изучение характера изменения их противоокислительных свойств и биологической активности в зависимости от строения.

В этой связи, **целью** настоящей работы явился синтез S-[ $\omega$ -(гидроксиарил)-алкил]тиосульфатов и  $\omega$ -(гидроксиарил)алкансульфонатов натрия и сравнительное исследование их антиоксидантной и биологической активности.

Для достижения данной цели предполагалось решить следующие **задачи**:

1. Отработать методики получения тиосульфатов и сульфонов на основе  $\omega$ -(гидроксиарил)галогеналканов и осуществить синтез структурно-

взаимосвязанных рядов S-[ $\omega$ -(гидроксиарил)алкил]тиосульфатов и  $\omega$ -(гидроксиарил)алкансульфонатов натрия.

2. Провести сравнительное исследование антиоксидантной активности синтезированных соединений в различных модельных системах.
3. На примере влияния синтезированных соединений на светящиеся бактерии *Photobacterium phosphoreum* отследить закономерности изменения токсических свойств гидрофильных ФАО в зависимости от строения.

**Научная новизна.** На основе  $\omega$ -(гидроксиарил)галогеналканов осуществлён синтез двух новых классов гидрофильных ФАО – S-[ $\omega$ -(гидроксиарил)алкил]-тиосульфатов и  $\omega$ -(гидроксиарил)алкансульфонатов натрия, образующих структурно-взаимосвязанные ряды, в пределах которых соединения различаются числом и строением *орто*-алкильных заместителей у фенольной ОН-группы, природой ионогенного фрагмента и степенью его удалённости от ароматического ядра, а также положением заместителя с гидрофильной группой относительно фенольного гидроксила и числом ОН-групп в ароматическом ядре.

Осуществлён синтез 3-(2-хлорэтилтио)-4,6-ди-*трет*-бутилпирокатехина и гидрофильных производных на его основе, выделен и охарактеризован побочный продукт взаимодействия названного хлорэтилтиопирокатехина с  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  в водно-спиртовом растворе – 5,7-ди-*трет*-бутил-8-гидрокси-4-тиохроман.

Для 39 гидрофильных и липофильных алкилфенолов определены константы скорости взаимодействия с пероксидными радикалами  $k_7$  в модельной реакции инициированного окисления метилолеата в водно-мицеллярном растворе додецилсульфата натрия при 60 °С. Показано, что в данной модельной системе экспериментально определяемые значения  $k_7$  зависят как от числа и строения *орто*-алкильных заместителей, так и от характера распределения антиоксиданта между мицеллярной и водной фазами.

Выявлено, что присутствие бивалентного атома серы в структуре S-[ $\omega$ -(гидроксиарил)алкил]тиосульфатов усиливает их способность ингибировать  $\text{Cu}^{2+}$ -индуцированное окисление этилолеата в водно-эмульсионной среде и автоокисление сливочного масла. Таким образом показано, что названные тиосульфаты являются полифункциональными антиоксидантами, эффективность которых обусловлена совместным действием фенольной и тиосульфатной групп.

Впервые для гидрофильных ФАО проведено исследование зависимости степени выраженности токсических свойств от строения. Изучено влияние водорастворимых производных алкилфенолов на биолюминесценцию *Photobacterium phosphoreum*. Установлено, что в отличие от липофильных алкилфенолов, в рядах гидрофильных ФАО токсичность снижается при уменьшении степени пространственного экранирования фенольного гидроксила.

**Научная и практическая значимость.** Предложены эффективные методики синтеза S-[ $\omega$ -(гидроксиарил)алкил]тиосульфатов и  $\omega$ -(гидроксиарил)-алкансульфонатов натрия – эффективных гидрофильных антиоксидантов.

В рядах синтезированных соединений выявлены закономерности изменения антиоксидантной активности и токсических свойств в зависимости от строения, которые могут быть использованы при создании структур новых водорастворимых антиоксидантов.

По данным исследований, проведенных в НИИ терапии СО РАМН, НИИ клинической иммунологии СО РАМН, НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАМН, НЦ клинической и экспериментальной медицины СО РАМН, *in vivo* синтезированные соединения проявляют низкую токсичность в сочетании с выраженной биологической активностью и могут найти применение в качестве гепато-, кардиопротекторных, противовоспалительных и иммуностимулирующих средств.

**Апробация работы.** Материалы диссертации докладывались на II и III Всероссийских конференциях молодых ученых и школах им. академика Н.М. Эмануэля «Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты» (г. Москва, 2006, 2008), VII Международной конференции «Биоантиоксидант» (г. Москва, 2006), VII Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Молодежь и наука XXI века» (Красноярск, 2006), Всероссийской конференции «Современные проблемы органической химии» (г. Новосибирск, 2007), X Молодежной конференции по органической химии (г.Уфа, 2007), а так же на XV Международной конференции «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Украина, Ялта-Гурзуф, 2007 г), XLVII Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (г. Новосибирск, 2009).

**Публикации.** Основное содержание диссертационной работы отражено в 13 публикациях: 3 статьи в рецензируемых журналах, 1 статья в сборнике и 9 тезисов докладов.

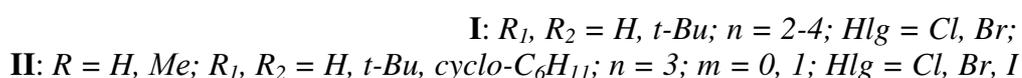
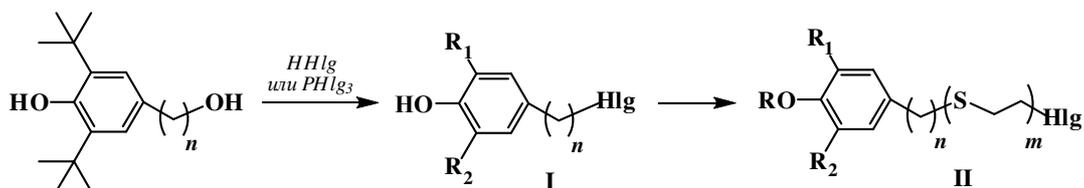
**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, пяти глав (литературный обзор, три главы обсуждения результатов собственных исследований и экспериментальная часть), выводов, списка цитируемой литературы (240 наименований, включая собственные публикации автора по теме диссертационной работы) и приложений. Объем диссертации – 144 страницы (без приложений), она иллюстрирована 21 таблицей и 16 рисунками.

Диссертационная работа выполнена в рамках комплексной университетской темы «Синтез и исследование полифункциональных фенольных антиоксидантов» (номер государственной регистрации 01.200.209186). Исследование биологической активности синтезированных соединений проведено при поддержке РФФИ (грант 05-04-48819).

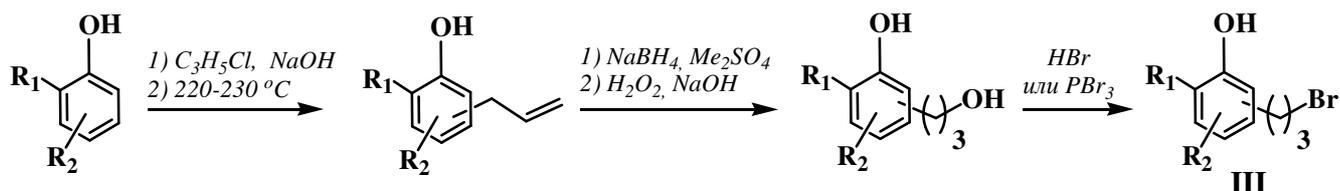
## Основное содержание работы

### Исходные вещества и промежуточные продукты

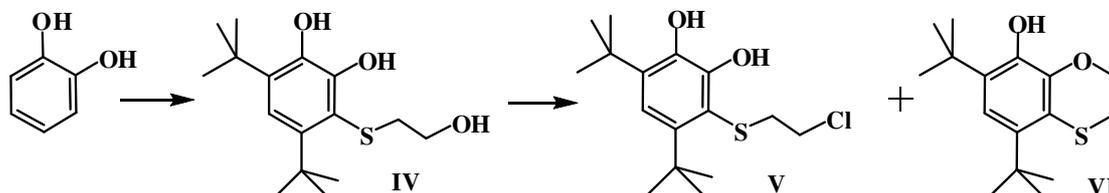
В качестве полупродуктов синтеза целевых соединений использовали галогениды **I-II**, полученные в НИИ химии антиоксидантов НГПУ на основе  $\omega$ -(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)алканолов разработанными ранее способами<sup>1</sup>:



а также бромиды **III**, синтезированные из 2-метил-6-алкил- и 2,4-ди-*трет*-бутилфенолов через аллильные производные:



Алканол **IV** получали из незамещённого пирокатехина по последовательности превращений, предложенной ранее Л.А. Масловской с соавт.<sup>2</sup>. Его превращение в хлорид **V** осуществляли под действием  $SOCl_2$  в присутствии каталитических добавок ДМФА, выход целевого хлорида достигал 88 %, в качестве побочного продукта фиксировали образование тиохромана **VI** (~5% по ВЭЖХ):



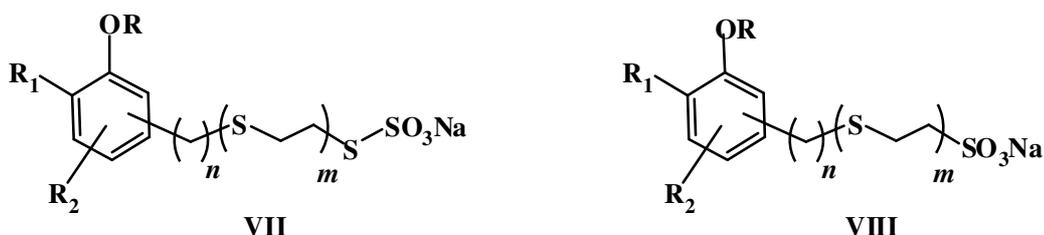
Тиохроман **VI** получали и встречным синтезом – по реакции хлорида **V** с NaOH.

<sup>1</sup> Просенко А.Е., Марков А.Ф., Пинко П.И. и др. // Пат. 1376511 РФ (1993); Просенко А.Е., Скоробогатов А.А., Дюбченко О.И. и др. // Изв. АН. Сер. химич., 2007, № 6, с. 1078; Марков А.Ф., Просенко А.Е., Кандалиничева Н.В. //Химия в интересах устойчивого развития, 2007, Т.15, с. 557.

<sup>2</sup> Масловская Л.А., Петрикевич Д.К., Тимошук В.А., Шадыро О.И. // Журн. общ. химии, 1996, №11 (66), с. 1893; они же, там же, с. 1899.

## Синтез S-[ω-(гидроксиарил)алкил]тиосульфатов и -алкансульфонатов натрия

Предложены эффективные методики получения тиосульфатов **VII** и сульфоноватов **VIII** по реакциям соответствующих бромалкилфенолов **I-III** с  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  и  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , соответственно, в водно-спиртовых растворах ( $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ ,  $i\text{-PrOH}/\text{H}_2\text{O}$ ). Отработаны способы выделения и очистки целевых соединений, что позволило получать последние с выходами до 96 % (для **VII**) и 85 % (для **VIII**).

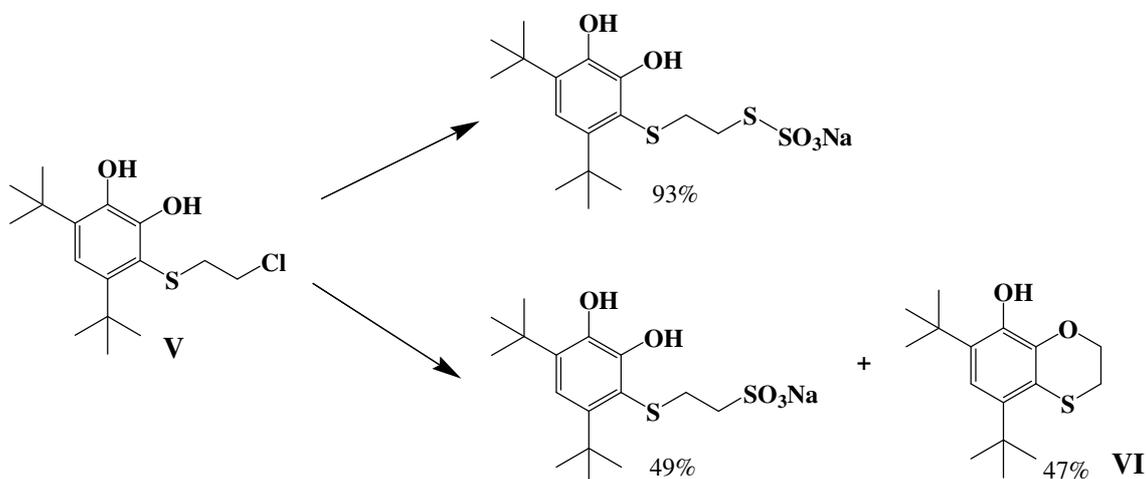


$R = \text{H}, \text{Me}; R_1, R_2 = \text{H}, \text{Me}, t\text{-Bu}, \text{cyclo-C}_6\text{H}_{11}; n = 2-4; m = 0, 1$

При взаимодействии исходных бромидов с  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  в реакционной массе обнаруживали побочные продукты – соответствующие алканола и их эфиры  $\text{R}'\text{OC}(\text{Me})_2\text{H}$ , образование которых, очевидно, обусловлено гидролизом  $\text{SO}_3^{2-}$ .

Показано, что с хорошими выходами соединения **VII**, **VIII** могут быть получены и из иод- и хлорзамещенных производных. Однако в последнем случае для проведения реакций требуются более жесткие условия. Так, S-[3-(3,5-дипрет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]тиосульфат натрия (**VIIa**) получали из соответствующего бромида с выходом 88 % после 6 ч нагревания реагентов при  $\sim 80^\circ\text{C}$ , из хлорида – с выходом 90 % после 6 ч при  $105-110^\circ\text{C}$ .

Вместе с тем, в случае хлорэтилтиопирокатехина **V** замещение атома хлора на тиосульфатную и сульфонатную группы эффективно протекало уже при  $80^\circ\text{C}$ . Это свидетельствует о большей реакционной способности связи C-Cl в данном соединении, что по всей видимости связано с анхимерным содействием атома серы. При использовании в качестве нуклеофильного реагента  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  наряду с целевым сульфонатом наблюдалось образование тиохромана **VI**:



Превращение хлорпроизводного **V** в тиохроман **VI**, очевидно, связано с невысокой нуклеофильностью  $\text{SO}_3^{2-}$ , позволяющей протекать конкурентной внутримолекулярной атаке, а также гидролизом  $\text{SO}_3^{2-}$ , приводящим к подщелачиванию реакционной массы и тем самым способствующим отрыву  $\text{HCl}$ .

Изучены некоторые свойства синтезированных соединений. Установлено, что растворимость тиосульфатов **VII** в воде при 20 °С составляет от 7.7 до 50 г на 100 г, сульфонатов **VIII** от 16.7 до 50 г / 100 г.

На примере тиосульфата **VIIa** показано, что синтезированные тиосульфаты вступают в реакции с  $\text{H}_2\text{O}_2$  в мягких условиях: нагревание **VIIa** с  $\text{H}_2\text{O}_2$  (мольное отношение 1:2) при 40 °С и  $\text{pH} = 7$  в течение 1 ч приводило к бис-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)пропил]дисульфиду с выходом 80%.

### *Исследование антирадикальной активности синтезированных соединений*

С учётом возможной области практического применения синтезированных соединений (ингибирование перекисного окисления липидов в биологических объектах) в качестве модельной системы исследования их антирадикальной активности (АРА) использовали окисление метилолеата (МО) в водном растворе додецилсульфата натрия (ДСН), как частный случай реакций окисления эфиров ненасыщенных жирных кислот в водных растворах поверхностно-активных веществ (ПАВ), которые удовлетворительно моделируют окисление липидов в биомембранах<sup>3</sup>.

Об АРА синтезированных соединений судили по величинам констант скоростей их взаимодействия с пероксидными радикалами  $k_7$ , которые определяли с привлечением манометрического метода, основанного на изучении кинетики поглощения кислорода в процессе ингибированного окисления.

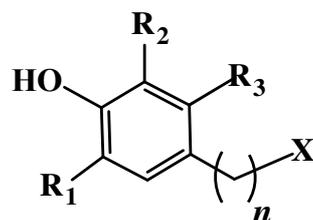
При определении величин  $k_7$  концентрации компонентов в пробе составляли: МО – 0.133 М, инициатора (2,2'-азо-бис-(2-метилпропионамидина) дигидрохлорид, АРН) – 6.15 мМ, ДСН – 0.25 М, ФАО – 0.05-0.23 мМ. Скорость иницирования  $W_i$  составляла  $7 \cdot 10^{-8} \text{ Мс}^{-1}$  (60 °С), длина цепей окисления – не менее 27 звеньев. Все измерения проводили в 3-8-кратной повторности, средняя квадратичная ошибка во всех случаях не превышала 25 %.

В рядах структурных аналогов с различным числом и строением *орто*-заместителей величины  $k_7$  изменялись в достаточно широком диапазоне от 200 до  $15200 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$  (табл. 1). При этом наименьшими значениями  $k_7$  ( $2.0\text{-}4.0 \cdot 10^2 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ ) характеризовались *орто*-незамещенные соединения, наибольшими ( $1.26\text{-}1.52 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ ) – производные 2-метил-6-циклогексил- и 2,6-дициклогексилфенолов.

<sup>3</sup> Рогинский В.А. // Биол. мембраны, 1990, № 7, С. 297.

Таблица 1

Значения констант скорости  $k_7$  для гидрофильных и липофильных фенолов при окислении метилолеата в водной среде в присутствии ДСН, 60 °С



| R <sub>1</sub>                               | R <sub>2</sub>   | R <sub>3</sub>  | n | X   | шифр        | $k_7 \cdot 10^{-3}, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ |
|--|--|---|---|---|-------------|--|
| H  | H  | H   | 3 | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na                                  |             | 0.2  |
| H  | H  | H   | 3 | SO <sub>3</sub> Na  |             | 0.4  |
| H  | H  | H   | 3 | SC <sub>4</sub> H <sub>9</sub>                                    |             | 0.4  |
| H  | <i>t</i> -Bu   | H   | 3 | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na                                  |             | 1.7  |
| H  | <i>t</i> -Bu   | H   | 3 | SO <sub>3</sub> Na  |             | 1.8  |
| H  | <i>t</i> -Bu   | H   | 3 | SC(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> Cl                              |             | 1.5  |
| H  | <i>t</i> -Bu   | H   | 3 | SC <sub>4</sub> H <sub>9</sub>                                    |             | 1.6  |
| H  | <i>t</i> -Bu   | H   | 2 | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na                                  |             | 1.3  |
| H  | <i>t</i> -Bu   | H   | 4 | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na                                  |             | 2.4  |
| <i>t</i> -Bu                                 | <i>t</i> -Bu   | H   | 3 | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na                                  | <b>VIIa</b> | 5.6  |
| <i>t</i> -Bu                                 | <i>t</i> -Bu   | H   | 3 | SO <sub>3</sub> Na  |             | 3.5  |
| <i>t</i> -Bu                                 | <i>t</i> -Bu   | H   | 3 | SC(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> Cl                              |             | 4.2  |
| <i>t</i> -Bu                                 | <i>t</i> -Bu   | H   | 3 | SC <sub>4</sub> H <sub>9</sub>                                    | <b>IX</b>   | 2.9  |
| <i>t</i> -Bu                                 | <i>t</i> -Bu   | H   | 2 | COOK  |             | 5.8  |
| <i>t</i> -Bu                                 | <i>t</i> -Bu   | H   | 0 | Me  | ионол       | 27   |
| <i>t</i> -Bu                                 | <i>t</i> -Bu   | H   | 3 | S(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na |             | 10.2   |
| <i>t</i> -Bu                                 | <i>t</i> -Bu   | H   | 3 | S(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na               |             | 10.0   |
| Me   | Me   | H   | 3 | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na                                  |             | 0.9  |
| Me   | Me   | H   | 3 | SO <sub>3</sub> Na  |             | 3.1  |
| Me   | Me   | H   | 3 | SC <sub>4</sub> H <sub>9</sub>                                    |             | 3.3  |
| H  | <i>cyclo</i> -C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>                     | H   | 3 | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na                                  |             | 2.0  |
| H  | <i>cyclo</i> -C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>                     | H   | 3 | SO <sub>3</sub> Na  |             | 1.8  |
| H  | <i>cyclo</i> -C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>                     | H   | 3 | SC <sub>4</sub> H <sub>9</sub>                                    |             | 2.6  |
| <i>t</i> -Bu                                 | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na | H   | 0 | <i>t</i> -Bu  |             | 7.2  |
| Me   | <i>t</i> -Bu   | H   | 3 | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na                                  |             | 10.2   |
| Me   | <i>t</i> -Bu   | H   | 3 | SO <sub>3</sub> Na  |             | 9.1  |
| <i>cyclo</i> -C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> | <i>cyclo</i> -C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>                     | H   | 3 | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na                                  |             | 12.6   |
| <i>cyclo</i> -C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> | <i>cyclo</i> -C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>                     | H   | 3 | SO <sub>3</sub> Na  |             | 13.1   |
| Me   | <i>cyclo</i> -C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>                     | H   | 3 | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na                                  |             | 15.2   |
| <i>t</i> -Bu                                 | OH   | S(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na     | 0 | <i>t</i> -Bu  |             | 9.4  |
| <i>t</i> -Bu                                 | OH   | S(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na                   | 0 | <i>t</i> -Bu  |             | 3.4  |
| <i>t</i> -Bu                                 | OH   | S(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SC(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> Cl | 0 | <i>t</i> -Bu  |             | 3.1  |

Гидрофильные производные 3,5-ди-*трет*-бутилпирокатехина в рассматриваемой модельной системе характеризовались величинами  $k_7$  близкими к таковым для соответствующих производных 2,6-ди-*трет*-бутилфенола.

Удлинение *пара*-алкильной цепи, разделяющей арильный и тиосульфатный фрагменты, в молекулах моно- и ди-*орто-трет*-бутилзамещенных тиосульфатов приводило к увеличению константы скорости  $k_7$ . Соединения с одинаковым строением гидроксирилалкильного фрагмента и различными гидрофильными группами, а также их липофильные аналоги – бутил-3-(4-гидроксиарил)-пропилсульфиды, – характеризовались близкими величинами  $k_7$ .

Вместе с тем, ионол по значению  $k_7$  существенно превосходил другие производные 2,6-ди-*трет*-бутилфенола, в частности тиосульфат **VIIa** и сульфид **IX**, в то же время при окислении метилолета в хлорбензоле (гомогенный раствор) названные соединения характеризовались практически одинаковыми значениями  $k_7$ <sup>4</sup>. С привлечением УФ-спектроскопии нами было показано, что в бифазной системе “МО – вода” тиосульфат **VIIa** находится преимущественно в воде, тогда как ионол нацело, а сульфид **IX** в значительной степени переходят в МО. Это позволяет считать, что в рассматриваемой модельной системе экспериментально измеряемые величины  $k_7$  зависят как от особенностей строения молекул ФАО, так и от их распределения между мицеллами и водной фазой.

### *Исследование общей ингибирующей активности*

Молекулярный дизайн S-[ $\omega$ -(гидроксиарил)алкил]тиосульфатов **VII** предполагает наличие у этих соединений двух типов противоокислительной активности: антирадикальной у фенольной ОН-группы и противопероксидной у бивалентного атома серы тиосульфатного фрагмента. В этой связи наряду АРА данных соединений не тождественна их общей ингибирующей активности (Total Antioxidant Activity, ТАА).

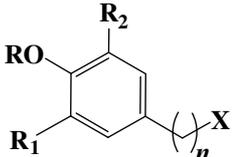
Сравнение ТАА тиосульфатов **VII** и сульфонов **VIII** проводили в двух модельных системах – при  $\text{Cu}^{2+}$ -индуцированном окислении этилолеата в водной эмульсии (60 °С) и автоокислении сливочного масла (27 °С).

Окисление этилолеата в водно-эмульсионной среде проводили по известной методике, предложенной ранее в качестве способа тестирования средств антиоксидантотерапии<sup>5</sup>. Рабочие концентрации компонентов пробы составляли: этилолеата – 0.67 М,  $\text{CuCl}_2$  – 3 мМ, ФАО – 2 мМ, ПАВ (цетилтриметиламмония бромид) – 0.03 М. Давление кислорода – 1 атм. Об эффективности ФАО судили по длительности периода индукции ингибированного окисления ( $\tau$ ).

<sup>4</sup> Кандалинцева Н.В., Дюбченко О.И., Терах Е.И. и др. // Хим.-фарм. журн., 2002, № 4 (36), с. 13; Просенко А.Е., Марков А.Ф., Хомченко А.С. и др. // Нефтехимия, 2006, № 6 (46), с. 471.

<sup>5</sup> Ушкалова В.Н., Перевозкина М.Г., Барышников Э.В. // Свободно-радикальное окисление липидов в эксперименте и клинике: Сб. науч. трудов, Ч. 1., Тюмень: Изд-во Тюмен. гос. ун-та, 1997, с. 77.

Периоды индукции  $\text{Cu}^{2+}$ -индуцированного окисления этилолеата, ингибированного синтезированными соединениями

| Общая формула   | Соединение |                |                |   |                                  | $\tau^*$ , мин |
|---|------------|----------------|----------------|---|----------------------------------|----------------|
|   | R          | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | n | X                                |                |
|  | Me         | H              | H              | 3 | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na | 13             |
|   | Me         | H              | H              | 3 | SO <sub>3</sub> Na               | 10             |
|   | H          | H              | H              | 3 | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na | 53             |
|   | H          | H              | H              | 3 | SO <sub>3</sub> Na               | 38             |
|   | H          | H              | <i>t</i> -Bu   | 3 | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na | 64             |
|   | H          | H              | <i>t</i> -Bu   | 3 | SO <sub>3</sub> Na               | 59             |
|   | H          | <i>t</i> -Bu   | <i>t</i> -Bu   | 3 | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na | 258            |
|   | H          | <i>t</i> -Bu   | <i>t</i> -Bu   | 3 | SO <sub>3</sub> Na               | 200            |
|   | H          | <i>t</i> -Bu   | <i>t</i> -Bu   | 2 | COOK                             | 93             |

\*Для неингибированного окисления  $\tau = 10$  мин

Согласно полученным данным (табл. 2) все исследованные соединения, за исключением анизольных производных, обладали выраженной способностью ингибировать  $\text{Cu}^{2+}$ -индуцированное окисление этилолеата. При этом, как и в случае АРН-инициированного окисления МО в мицеллах ДСН, в рядах тиосульфатов и сульфонов с увеличением числа *трет*-бутильных *орто*-заместителей наблюдалось усиление противоокислительных свойств.

Вместе с тем, независимо от числа заместителей в ароматическом ядре тиосульфаты превосходили по ингибирующему действию соответствующие сульфонаты. Это свидетельствует о проявлении тиосульфатной группой противоокислительной активности и позволяет считать S-[ $\omega$ -(гидроксиарил)алкил]-тиосульфаты VII полифункциональными антиоксидантами.

Окисление сливочного масла с добавками ФАО (1 мкмоль/г) проводили на воздухе в тонком (2-3 мм) слое при 27 °С. О степени окисленности масла судили по накоплению перекисных продуктов, концентрацию которых определяли колориметрически железороданидным методом.

Наиболее эффективно окисление сливочного масла ингибировали тиосульфаты на основе 2,6-ди-*трет*-бутилфенола и 3,5-ди-*трет*-бутилпирокатехина, которые по противоокислительному действию превосходили реперный антиоксидант фенозан калия (3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)пропионат калия) (рис. 1). Замена тиосульфатной группы на сульфонатную, а также снижение пространственной экранированности фенольного гидроксила приводили к снижению антиокислительной активности соединений.

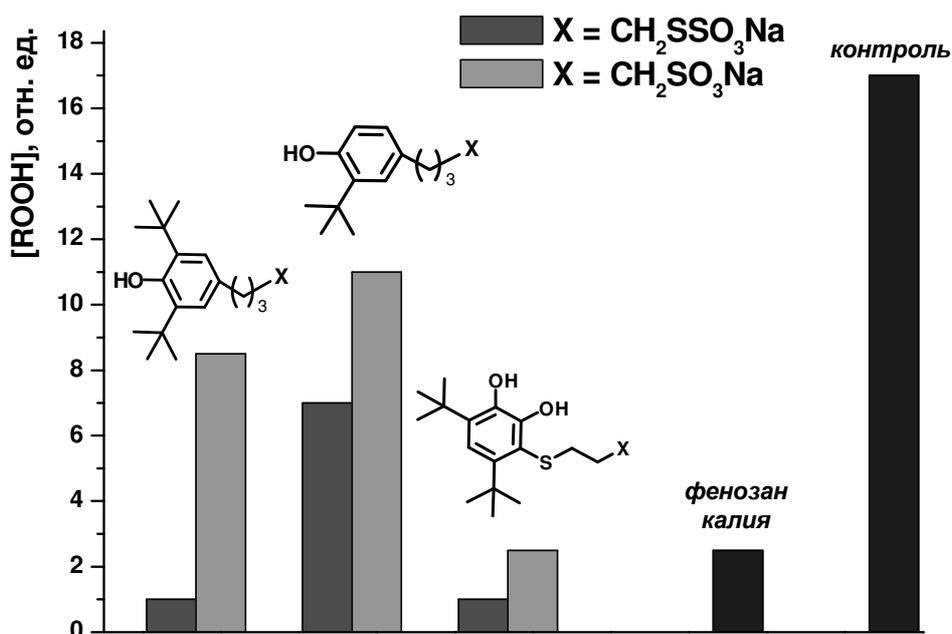


Рис. 1. Относительное содержание гидропероксидов в сливочном масле после 3 мес. окисления при 27 °С.

### ***Исследование влияния синтезированных соединений на биолюминесценцию *Photobacterium phosphoreum****

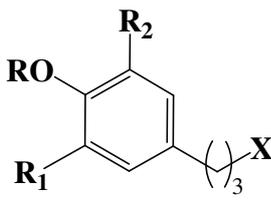
Первичную оценку степени токсического влияния синтезированных соединений на живые организмы проводили с использованием биохемилюминесцентного метода и культур светящихся бактерий *Photobacterium phosphoreum* из коллекции Института биофизики СО РАН. О токсичности соединений судили по величине ID<sub>50</sub>, численно равной концентрации ФАО, в присутствии которой интенсивность бактериальной люминесценции снижалась на 50 %.

Полученные данные (табл. 3) свидетельствуют, что степень токсического влияния гидрофильных ФАО на *Ph. phosphoreum* зависит как от природы ионогенного фрагмента, так и от числа и строения *орто*-заместителей в ароматическом ядре. Величины ID<sub>50</sub> для синтезированных тиосульфатов и сульфонатов принимали значения от 0.21 до 5.90 мМ, а для соответствующих хлоридов S-[ω-(4-гидроксиарил)алкил]изотиурония<sup>6</sup> варьировали в более широком диапазоне – от 0.02 до 670 мМ.

Независимо от природы ионогенного фрагмента в ряду *орто*-дизамещенных соединений величины ID<sub>50</sub> возрастали при переходе от ди-*трет*-бутилированных соединений к менее экранированным аналогам. Метилирование фенольной ОН-группы также приводило к снижению токсического действия соединений.

<sup>6</sup> Кандалинцева Н.В., Просенко А.Е., Дюбченко О.И., Стоянов Е.С. // Журн. орг. химии, 2001, № 9 (37), с. 1317.

Значения  $ID_{50}$  для исследованных гидрофильных алкилфенолов

| формула   | R  | R <sub>1</sub>                               | R <sub>2</sub>                               | ID <sub>50</sub> , мМ |                     |                                      |
|---|----|--|--|-----------------------|---------------------|--------------------------------------|
|   |    |  |  | X                     |                     |                                      |
|   |    |  |  | SO <sub>3</sub> Na    | SSO <sub>3</sub> Na | SC(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> Cl |
|  | Me | H  | H  | 2.38                  | 5.87                | 670                                  |
|   | H  | H  | H  | 0.21                  | 3.14                | 235                                  |
|   | H  | H  | <i>t</i> -Bu                                 | 0.51                  | 1.84                | 46                                   |
|   | H  | <i>t</i> -Bu                                 | <i>t</i> -Bu                                 | 1.34                  | 0.65                | 0.02                                 |
|   | H  | <i>cyclo</i> -C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> | <i>cyclo</i> -C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> | 1.96                  | 0.37                | ...                                  |
|   | H  | Me   | Me   | 5.41                  | 4.68                | 208                                  |
|   | H  | <i>t</i> -Bu                                 | Me   | 5.90                  | 1.38                | ...                                  |
|   | H  | H  | <i>cyclo</i> -C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> | 1.00                  | 0.96                | ...                                  |

В ряду ди-*трет*-бутилзамещённых соединений при переходе от сульфоната к тиосульфату и далее к хлориду изотиурония значения  $ID_{50}$  снижались с 1.34 до 0.02 мМ, в тоже время в аналогичных рядах ди- и моно-*орто*-незамещённых соединений наблюдалось увеличение значений  $ID_{50}$ . В рядах изотиурониевых и тиосульфатных производных при последовательном удалении *трет*-бутильных групп способность соединений подавлять бактериальную биолюминесценцию уменьшалась, в ряду аналогичных сульфонов, напротив, увеличивалась.

В рамках настоящего исследования принципиально важным являлся вопрос о возможности использования величин  $ID_{50}$ , полученных на бактериальных культурах, для прогноза токсических свойств исследуемых соединений в отношении лабораторных животных.

Острую токсичность исследуемых соединений в отношении лабораторных животных изучали в НИИ клинической иммунологии СО РАМН. Средние летальные дозы  $LD_{50}$  определяли на мышах при внутрибрюшинном введении препаратов. В результате было установлено, что синтезированные нами тиосульфаты и сульфонаты характеризуются величинами  $LD_{50}$  в диапазоне от 150 до 1000 и от 120 до 3000 мг/кг соответственно, в то время как предложенные ранее гидрофильные производные 3-(4-гидроксиарил)пропильного ряда, содержащие в качестве полярных фрагментов изотиурониевые и алкиламмонийные группы, более токсичны – величины  $LD_{50}$  составляют от 30 до 175 и от 50 до 125 мг/кг соответственно<sup>7</sup>.

<sup>7</sup> Фенольные биоантиоксиданты / Зенков Н.К., Кандалицева Н.В., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б., Просенко А.Е. – Новосибирск: СО РАМН, 2003. – 328 с.; Дюбченко О.И., Никулина В.В., Марков А.Ф. и др. // Хим.-фарм. журн., 2006, № 4 (40), с. 117.

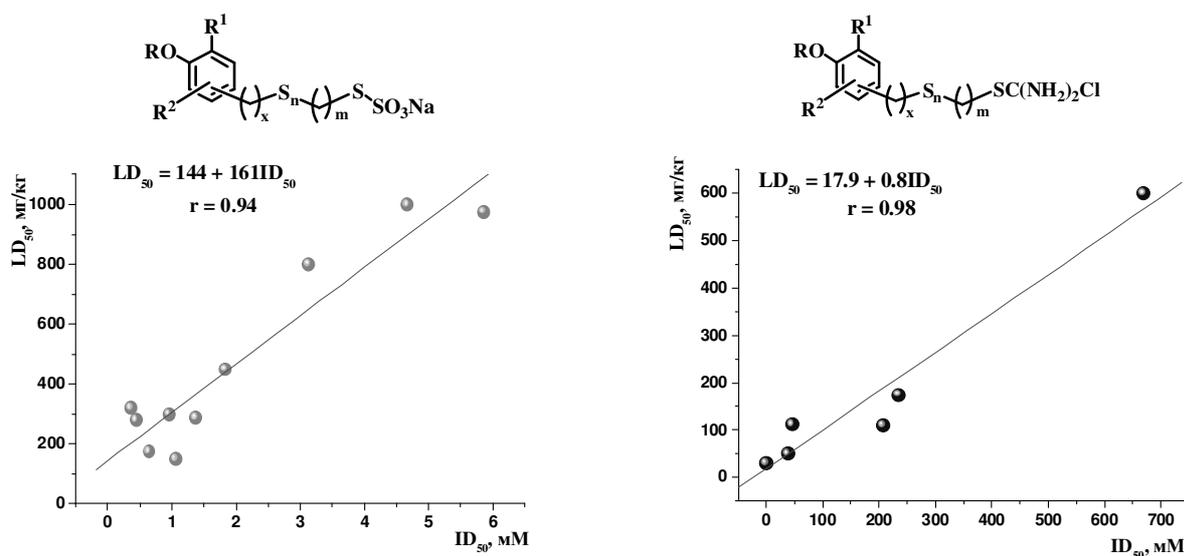


Рис. 2. Зависимость между величинами  $LD_{50}$  и  $ID_{50}$  для  $S$ -[ $\omega$ -(гидроксиарил)алкил]-тиосульфатов и хлоридов  $S$ -[ $\omega$ -(гидроксиарил)алкил]изотиурония

Показано (рис. 2), что величины, количественно характеризующие токсическое влияние гидрофильных ФАО на бактериальные культуры *Ph. Phosphoreum* и лабораторных животных в отдельных реакционных сериях коррелируют друг с другом. Это может быть использовано в практических целях для оценки острой токсичности вновь синтезированных соединений по значениям  $ID_{50}$ .

### **Биоантиоксидантные свойства синтезированных соединений *in vitro* и *in vivo***

Биоантиоксидантные свойства синтезированных тиосульфатов и сульфонов изучались в НИИ клинической иммунологии СО РАМН, НИИ терапии СО РАМН, НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАМН и НЦ клинической и экспериментальной медицины СО РАМН.

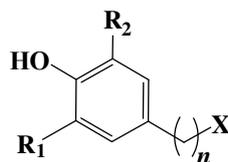
Показано, что *in vitro* все исследованные  $S$ -[ $\omega$ -(гидроксиарил)алкил]-тиосульфаты и -сульфонаты, проявляют выраженную антиокислительную активность, в том числе при окислении липопротеинов низкой плотности (ЛНП) в присутствии ионов металлов переменной валентности и при образовании пероксонитрита при разложении морфолиносиднонимина (табл. 4). Изменение противоокислительного действия соединений в зависимости от степени пространственной экранированности фенольной ОН-группы носило неоднозначный характер, но во всех случаях соединения с тиосульфатной группой превосходили по эффективности свои сульфонатные аналоги. Это свидетельствует о том, что в биологических системах синтезированные тиосульфаты VII также проявляют себя как полифункциональные антиоксиданты.

Для отдельных представителей синтезированных соединений *in vivo* показано наличие гепатопротекторной (модель CCl<sub>4</sub>-индуцированного токсического гепатита мышей), кардиопротекторной (модель ишемии/реперфузии изолированных сердец крыс), иммуностимулирующей (модель иммунодефицита у мышей, подвергшихся облучению или введению циклофосфана) и противовоспалительной (модель каррагинан-индуцированного отёка лапы у крыс) активностей, а также способности активизировать редоксчувствительные факторы транскрипции (культуры клеток гепатомы человека HepG2).

Высказано предположение, что противовоспалительный эффект синтезированных соединений реализуется через их способность индуцировать экспрессию контролируемых антиоксидант-респонсивным элементом (ARE) генов, кодирующих белки, участвующие в воспалительном процессе.

Таблица 4

*Биоантиоксидантная активность гидрофильных фенольных соединений*



| Соединение     |                |   |                                  | Cu <sup>2+</sup> -<br>зависимое<br>окисление<br>ЛНП,<br>ID <sub>50</sub> , мкМ | ONOO <sup>-</sup><br>ID <sub>50</sub> ,<br>мкМ | Снижение<br>активности<br>АЛАТ <sup>a</sup> , % | Прирост<br>объёма<br>лапы <sup>б</sup> ,<br>% | Экспрессия<br>GSTP1 <sup>в</sup> ,<br>% |
|----------------|----------------|---|----------------------------------|--|--|---|---|---|
| R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | n | X                                |  |  |   |   |   |
| H              | H              | 3 | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na | 400  | 2.9  | 22  | 42*   | 124.5*                                  |
| H              | H              | 3 | SO <sub>3</sub> Na               | 2770   | 5.9  |   | 39*   | 106.6*                                  |
| H              | <i>t</i> -Bu   | 3 | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na | 30   | 9.7  |   | 15*   | 186.2*                                  |
| H              | <i>t</i> -Bu   | 3 | SO <sub>3</sub> Na               | 43   | 10.1   |   | 26*   | 128.9*                                  |
| <i>t</i> -Bu   | <i>t</i> -Bu   | 3 | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na | 10   | 10.7   | 58*   | 37*   | 33.7*                                   |
| <i>t</i> -Bu   | <i>t</i> -Bu   | 3 | SO <sub>3</sub> Na               | 15   | 24.7   | 48*   | 37*   | 151.1*                                  |
| <i>t</i> -Bu   | <i>t</i> -Bu   | 2 | COOK                             | 13   | 21.3   | 40*   | 30*   |   |

*a* – снижение активности аланинаминотрансферазы (гепатоцеллюлярный фермент, появляющийся в кровяном русле при повреждении мембран гепатоцитов) в сыворотке крови мышей на фоне введения ФАО (20 мг/кг, внутривенно);

*б* – прирост объёма лапы при введении каррагинана без антиоксидантной защиты – 60 %, вводимая доза ФАО – 100 мг/кг, перорально;

*в* – экспрессия GSTP1 (ARE-зависимый ген, кодирующий глутатион-S-трансферазу P1) при обработке клеток HepG2 известным индуктором ARE *трет*-бутилгидрохиноном – 100 %, [ФАО]=20мкМ;

\*– достоверно значимое отличие от контроля

## Выводы

1. Осуществлен синтез S-[ $\omega$ -(гидроксиарил)алкил]тиосульфатов и  $\omega$ -(гидроксиарил)алкансульфонатов натрия, образующих структурно-взаимосвязанные ряды, в которых соединения различаются числом и строением *орто*-алкильных заместителей; длиной цепи, разделяющей арильный и ионогенный фрагменты; положением заместителя с гидрофильным фрагментом относительно ароматического гидроксила; числом OH-групп в ароматическом ядре.
2. Показано, что 3-(2-хлорэтилтио)-4,6-ди-*трет*-бутилпирокатехин в реакциях нуклеофильного замещения с  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  и  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  превосходит по реакционной способности 3-(4-гидроксиарил)-1-хлорпропан. Выделен и охарактеризован побочный продукт взаимодействия названного хлорэтилтиопирокатехина с  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  в водно-спиртовом растворе – 5,7-ди-*трет*-бутил-8-гидрокси-4-тиохроман.
3. Для 39 соединений впервые измерены константы скорости взаимодействия с пероксидными радикалами  $k_7$  при окислении метилолеата в водно-мицеллярном растворе додецилсульфата натрия. Показано, что в рядах синтезированных соединений с увеличением пространственной экранированности фенольной OH-группы величины  $k_7$  изменяются немонотонно: наименьшими величинами  $k_7$  ( $2.0\text{-}4.0 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) характеризуются *орто*-незамещенные соединения, наибольшими ( $1.26\text{-}1.52 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) – производные 2-метил-6-циклогексил- и 2,6-дициклогексилфенолов. В рядах *трет*-бутилзамещенных S-[ $\omega$ -(4-гидроксиарил)алкил]тиосульфатов удлинение цепи, разделяющей ароматическое ядро и тиосульфатную группу также способствовало увеличению значений  $k_7$ .
4. Характер изменения величины  $k_7$  в рядах гидро- и липофильных производных  $\omega$ -(4-гидроксиарил)алкильного типа свидетельствует, что экспериментально определяемые при окислении метилолеата в водном растворе додецилсульфата натрия значения  $k_7$  зависят как от строения молекулы антиоксиданта, так и его распределения в водно-мицеллярной системе.
5. По способности ингибировать  $\text{Cu}^{2+}$ -индуцированное окисление этилолеата, автоокисление сливочного масла и наработку различных видов активированных кислородных метаболитов  $\omega$ -(гидроксиарил)алкансульфонаты уступают соответствующим тиосульфатам, что позволяет рассматривать последние как полифункциональные антиоксиданты.
6. Установлено, что степень токсического влияния водорастворимых ФАО на светящиеся бактерии и лабораторных животных зависит как от степени пространственного экранирования фенольной OH-группы, так и от природы гидрофильного фрагмента. В рядах соединений с одинаковым строением  $\omega$ -(4-гидроксиарил)алкильного фрагмента токсичность снижалась при замене

изотиуруниевой группы на тиосульфатную и далее на сульфонатную. Независимо от природы ионогенного фрагмента токсические свойства уменьшались при переходе от *орто*-ди-*трет*-бутилзамещенных гидрофильных алкилфенолов к менее экранированным аналогам.

7. Показано, что синтезированные S-[ $\omega$ -(гидроксиарил)алкил]тиосульфаты и  $\omega$ -(гидроксиарил)алкансульфонаты натрия характеризуются низкой токсичностью (IV (малотоксично) – V (практически нетоксично) классы токсичности), *in vitro* и *in vivo* проявляют выраженную биологическую активность и могут найти применение в качестве биоантиоксидантов, противовоспалительных, гепато-, кардиопротекторных средств, а также активаторов антиоксидант-респонсивного элемента.

***Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:***

1. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Кандалинцева Н.В., Олейник А.С., Просенко А.Е., Гусаченко О.Н., Шкляева О.А., Вавилин В.А., Ляхович В.В. Антиоксидантные и противовоспалительные свойства новых водорастворимых серо-содержащих фенольных соединений // Биохимия. – 2007. – том 72, вып.6. – С. 790-798.
2. Олейник А.С., Куприна Т.С., Певнева Н.Ю., Марков А.Ф., Кандалинцева Н.В., Просенко А.Е., Григорьев И.А. Синтез и антиоксидантные свойства S-[3-(гидроксиарил)пропил]тиосульфатов и [3-(гидроксиарил)пропан]-1-сульфонатов натрия // Изв. АН. Сер. Хим. – 2007. – №6. – С. 1094-1101.
3. Олейник А.С., Певнева Н.Ю., Кандалинцева Н.В., Просенко А.Е., Хощенко О.М., Душкин М.И. Синтез и биологическая активность гидрофильных алкилфенолов// Химия в интересах устойчивого развития. – 2008. – №16. – С. 559 – 564.
4. Иванова А.С., Халикова Н.Р., Кандалинцева Н.В. Исследование токсических свойств галогенидов S-(3-(4-гидроксиарил)пропил)изотиуруния биолюминесцентным методом // Сборник науч. работ студентов и молодых ученых. – Новосибирск: НГПУ, 2006. Вып. 8. – Ч.1. – С. 205-211.

***Тезисы всероссийских и международных конференций***

5. Иванова А.С., Кандалинцева Н.В., Просенко А.Е. Применение биолюминесцентного метода для изучения токсичности водорастворимых фенольных антиоксидантов // Мат. II Всерос. конф. молодых ученых и школы им. академика Н.М. Эмануэля «Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты» – М.: Изд-во РУДН, 2006. – С. 107-109.
6. Иванова А.С., Кандалинцева Н.В. Сравнительное изучение токсичности солей S-[3-(4-гидроксиарил)пропил]изотиуруния биолюминесцентным методом // Мат. VII Всерос. научно-практ. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых «Молодежь и наука XXI века»: в 2 т. – Т.2. – Красноярск, 2006. – С. 216-217.

7. Певнева Н.Ю., Куприна Т.С., Ягунов С.Е., Иванова А.С., Кандалинцева Н.В., Просенко А.Е. Синтез серосодержащих гидрофильных антиоксидантов на основе пирокатехина // Мат. VII Междунар. конф. «Биоантиоксидант» – М.: Изд-во РУДН, 2006. – С. 215-216.
8. Кандалинцева Н.В., Олейник А.С., Куприна Т.С., Певнева Н.Ю., Дюбченко О.И., Просенко А.Е. Гидрофильные гибридные антиоксиданты фенольного типа: синтез и биологическая активность // Мат. Всерос. науч. конф. «Современные проблемы органической химии». – Новосибирск, 2007. – С. 141.
9. Олейник А.С., Куприна Т.С., Ягунов С.Е., Кандалинцева Н.В., Просенко А.Е. Синтез и антирадикальные свойства сульфонатных и тиосульфонатных производных на основе алкилзамещенных моно- и двухатомных фенолов // Мат. Всерос. науч. конф. «Современные проблемы органической химии». – Новосибирск, 2007. – С. 149.
10. Кандалинцева Н.В., Олейник А.С., Дюбченко О.И., Просенко А.Е., Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. Гидрофильные гибридные антиоксиданты фенольного типа: активность *in vitro* и *in vivo* // Мат. XV междунар. конф. и дискуссионного научного клуба «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» – Украина, Крым, Ялта-Гурзуф, 2007г. – С. 405-406.
11. Олейник А.С., Кандалинцева Н.В. Соли Бунте на основе гидроксиарилгалогеналканов как перспективные антиоксиданты // Мат. X Молодежной конф. по органической химии. – Уфа: изд-во «Реактив» – 2007. – С. 229.
12. Олейник А.С., Трубникова Ю.Н., Кандалинцева Н.В., Просенко А.Е. S-[ $\omega$ -(гидроксиарил)алкил]тиосульфаты натрия – полифункциональные гидрофильные антиоксиданты // Мат. III Всерос. конф. молодых ученых и школы им. академика Н.М. Эмануэля «Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты» – М.: Изд-во РУДН, 2008. – С. 215-217.
13. Гаас Н.А., Олейник А.С., Кандалинцева Н.В. Изучение антирадикальной активности гидрофильных и липофильных тиаалкилфенолов при окислении метилолеата в водно-мицеллярном растворе // Мат. XLVII Межд. науч. студен. конф. «Студент и научно-технический прогресс»: Химия. – Новосибирск, 2009. – С. 105.

Лицензия Л.Р. № 020059 от 24.03.97  
Гигиенический сертификат 54.НК.05.953.П.000149.12.02 от 27.12.02

---

Подписано в печать .04.09. Формат бумаги 60x84/16.  
Печать RISO. Уч.-изд.л. . Усл. п.л. . Тираж 100 экз.  
Заказ № .

---

Педуниверситет, 630126, Новосибирск, 126, Вилюйская, 28.

