

УДК 547.853.5:(542.913+543.42)

## АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ПИРИДИЛГИДРАЗОНОВ АРОМАТИЧЕСКИХ АЛЬДЕГИДОВ

**В. В. Виноградов, А. Н. Николаевский, Е. И. Хижан**

Определены кинетические параметры антирадикальной активности производных пиридилгидразонов ароматических альдегидов хемилюминесцентным методом по реакции с пероксидными радикалами при иницированном окислении этилбензола. Выявлено, что введение ОН-группы в молекулу гидразона приводит к увеличению значения стехиометрического коэффициента ингибирования. Изучены закономерности ингибирующего действия антиоксидантов в гетерогенных системах: при иницированном окислении эмульсии этилбензола, а также дисперсии фосфатидилхолина как водно-липидной модели.

**Ключевые слова:** пиридилгидразон, антиоксидант, константа скорости, стехиометрический коэффициент ингибирования, период индукции, окисление в эмульсии, активные формы кислорода.

Проблема защиты индивидуальных веществ и материалов на их основе от нежелательных окислительных процессов, протекающих с участием кислорода воздуха остается актуальной. Анализ исследований в этой области показал, что сочетание в одной молекуле антиоксиданта (АО) одновременно несколько различных по строению и химическим свойствам реакционных групп может привести к созданию новых антиоксидантов, обладающих комплексом необходимых полезных свойств и проявляющих биологическую активность [1,2]. Гидразоны используются как лекарственные препараты, например фтивазид – эффективное средство для лечения туберкулеза. Важнейшей характеристикой биологической активности лекарственных препаратов является их эффективность в качестве антиоксидантов. Окислительный стресс играет ключевую роль в патогенезе старения и широкого спектра сердечно-сосудистых заболеваний [3,4]. Поэтому использование антиоксидантов для терапии и профилактики процесса старения и сердечно-сосудистых заболеваний выглядит вполне оправданным.

Цель работы – изучение антирадикальной (АРА) и антиоксидантной (АОА) активности производных пиридилгидразонов ароматических альдегидов при жидкофазном окислении этилбензола (ЭТБ) и модельных водноорганических систем.

### Экспериментальная часть

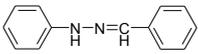
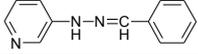
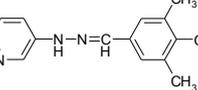
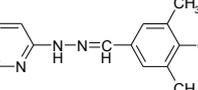
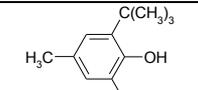
Исследуемые пиридилгидразоны синтезированы в отделе химии биологическиактивных соединений Института физико-органической химии и углехимии им. Л.М. Литвиненко НАН Украины, структурные формулы которых приведены в таблице 1 и 2.

Эффективность ингибиторов при жидкофазном окислении ЭТБ иницированном термическим распадом азодиизобутиронитрила (АИБН), исследовали при помощи хемилюминесцентной установки с фотоэлектронным множителем ФЭУ-38, в присутствии активатора свечения – 9,10-дибромантрацена. АРА активность количественно характеризовали константой скорости взаимодействия исследуемых соединений с  $RO_2^{\cdot}$  радикалами окисляющегося субстрата ( $k_7$ ) и стехиометрическим коэффициентом ингибирования ( $f$  – число цепей, обрывающихся на одной молекуле ингибитора). В качестве параметра АОА использовали отношение периода индукции ( $\tau$ ) накопления пероксидов в присутствии добавок ингибиторов и в их отсутствии ( $\tau_0$ ).

Исследование АОА активности производных пиридилгидразонов в условиях автоокисления ЭТБ проводили в стеклянном реакторе барботажного типа с продувкой воздуха при 393 К.

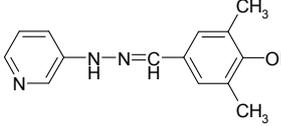
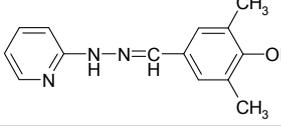
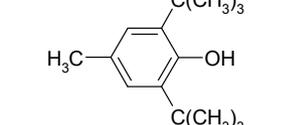
Очистку ЭТБ осуществляли по стандартной методике [5] с помощью серной кислоты с дальнейшей промывкой и перегонкой, АИБН перекристаллизовывали из метанола и сушили под вакуумом.

**Таблица 1.** Антирадикальная ( $k_7$ ;  $f$ ) и антиоксидантная ( $\tau$ ) активность, значения рассчитанных энергий N-H связей ( $D_{N-H}$ ), O-H связей ( $D_{O-H}$ ) пиридилгидразонов, при инициированном АИБН и автоокислении ЭТБ.

№	Формула	ЭТБ		$\tau$ , час (авто-окисление)	$D_{N-H}$ , кДж/моль	$D_{O-H}$ , кДж/моль
		$f$	$K_7$ , л/(моль с)			
1		1.0	$(1.2 \pm 0.1) \cdot 10^6$	17.0	262.8	—
2'		1.6	$(6.6 \pm 0.3) \cdot 10^5$	—	257.5	—
2		1.5	$(5.2 \pm 0.3) \cdot 10^5$	7.6	261.9	307.0
3		1.6	$(3.5 \pm 0.2) \cdot 10^5$	20.5	283.4	308.7
4		2.0	$(3.1 \pm 0.2) \cdot 10^4$	70.,0	—	294.8

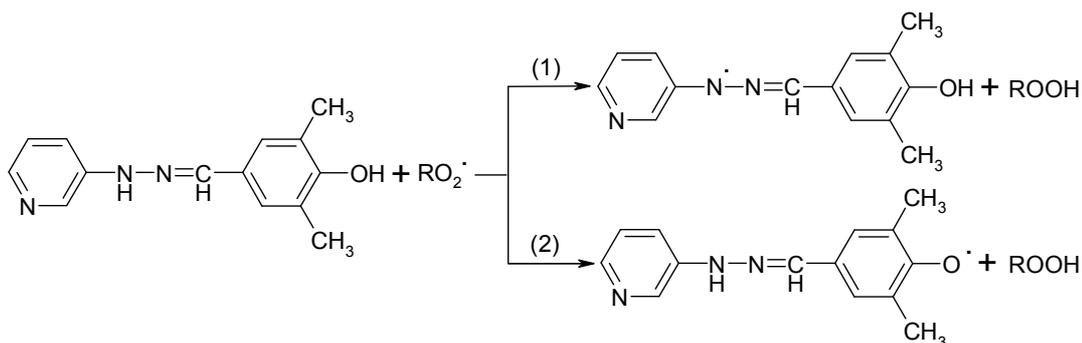
Для исследования ингибирующего действия пиридилгидразонов в гетерогенных системах использованы стабилизированные додецилсульфатом натрия (ДСNa) модельные системы: эмульсия прямого типа ЭТБ:вода (1:3) и дисперсия фосфотидилхолина (ФХ) в воде. Используемый ФХ – представляет собой фармацевтический препарат “Лецитин” (“Фарметикс” Канада), полученный экстракцией из сои. Дисперсию готовили при помощи ультразвуковой установки УЗДН-А, что позволяет достичь однородности системы. Окисление эмульсий проводили в стеклянном реакторе барботажного типа с продувкой воздуха, за ходом процесса следили по кинетике накопления пероксидных соединений с применением йодометрического метода.

**Таблица 2.** Параметры АОА активности, рассчитанные коэффициенты липофильности пиридилгидразонов при инициированном АИБН окислении эмульсии ЭТБ : H<sub>2</sub>O (1:3) и водной дисперсии ФХ.

InH	Формула	$\tau/\tau_0$		IC <sub>50</sub> моль/л	logP
		ЭТБ:вода	ФХ:вода		
1		4.78	4.26	$7.6 \cdot 10^{-6}$	3.2
2		2.95	6.13	$1.2 \cdot 10^{-5}$	2.8
3		4.86	3.21	$3.5 \cdot 10^{-5}$	5.3

### Обсуждение результатов

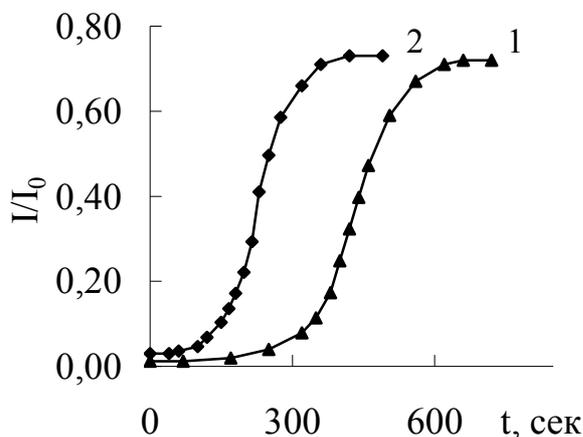
Данная работа является продолжением начатых ранее исследований по поиску эффективных ингибиторов в ряду гидразонов [6]. Исследована АОА следующих соединений: 3-пиридилгидразон-3,5-диметил-4-гидроксибензальдегида и 2-пиридилгидразон-3,5-диметил-4-гидроксибензальдегида, эффективность которых сравнивалась с действием антиоксиданта 3,5-дитрет-бутил-4-метилфенола (ионола). Исследуемые гидразоны имеют несколько вероятных реакционных центров взаимодействия с RO<sub>2</sub>· радикалами: NH-группа гидразонового фрагмента (1) и OH-группа в альдегидной части молекулы (2):



Известно, что хемилюминесценция (ХЛ) – явление, основанное на возникновении свечения ( $I_0$ ) в актах рекомбинации пероксирадикалов в процессах окисления органических веществ [5].

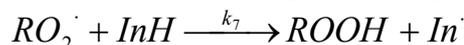


Экспериментально установлено, что введение в иницированное АИБН окисление этилбензола (RH) исследуемых антиоксидантов снижает концентрацию  $RO_2 \cdot$  радикалов, что снижает скорость диспропорционирования  $RO_2 \cdot$  и приводит к снижению интенсивности хемилюминесцентного свечения (I). Кривые ингибирования окисления RH



**Рисунок 1.** Кинетические кривые изменения относительной интенсивности ХЛ при иницированном АИБН окислении ЭТБ в присутствии 2-пиридилгидразона-4-гидрокси-3,5-диметилбензальдегида;  $T = 343 \text{ K}$ ,  $[AIBN] = 1 \cdot 10^{-2} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$ ,  $[InH] \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1} : 1 - 1 \cdot 10^{-4} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}; 2 - 5 \cdot 10^{-5} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$ .

( $v_i = \text{const}$ ) имеют S-образный характер, по мере расходования антиоксиданта восстанавливается прежний уровень хемилюминесценции (рис. 1). С увеличением концентрации антиоксиданта эффект усиливается. Аналогичные закономерности наблюдаются и для других исследованных гидразонов (табл. 1). Соответственно пиридилгидразоны взаимодействуют с пероксирадикалами (с константой скорости  $k_7$ ) окисляющегося субстрата RH по реакции:



Константы скорости реакции гидразонов с пероксирадикалами ЭТБ рассчитаны по концентрационным зависимостям  $I_0/I$  с использованием уравнения [7]:

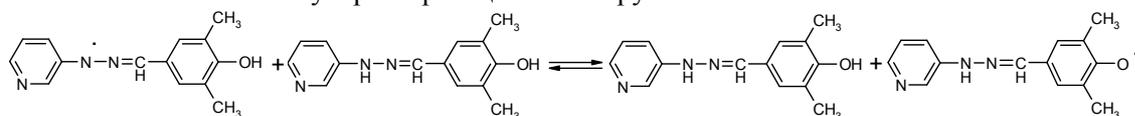
$$\sqrt{\frac{I_0}{I}} = 1 + 1,1 \frac{k_7}{\sqrt{k_6 \cdot W_i}} [InH]$$

Стехиометрический коэффициент ингибирования определяли по формуле:

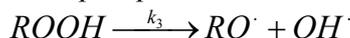
$$f = \frac{\tau W_i}{[InH]}$$

где  $\tau$  – период индукции окисления, определенный из ХЛ кривых (рис. 1),  $W_i$  – скорость иницирования процесса. Рассчитанные величины исследования представлены в таблице 1.

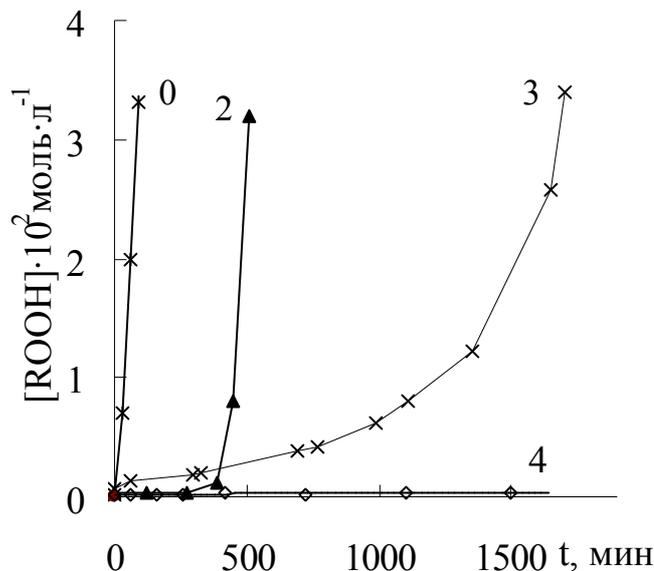
Анализ полученных данных позволяет сделать вывод о том, что замена фенила на пиридил в молекуле гидразона (соед. 1 и 2' табл. 1) приводит к снижению на порядок величины константы  $k_7$  (с  $10^6$  до  $10^5$  л·моль<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup>), но при этом наблюдается возрастание значения стехиометрического коэффициента ингибирования  $f$  с 1 до 1,6. Положение азота в пиридиновом кольце так же влияет на параметры АРА пиридилгидразонов. Так соединение 3 по сравнению с соединением 2 (табл. 1) имеет меньшую электронную плотность на реакционном центре (NH-группа) из-за более сильного отрицательного индукционного эффекта пиридинового кольца, в котором атом азота находится в  $\alpha$  – положении к заместителю, что и обуславливает некоторую разницу в величинах констант  $k_7$  этих соединений. Характер изменения стехиометрического коэффициента ингибирования, вероятно, зависит от механизма обрыва цепей на ингибиторе [8]. Так в процессе иницированного окисления ЭТБ соединение 1 (табл. 1) имеет значение  $f=1$ , что может свидетельствовать о наличии элементарных реакций диспропорционирования гидразонильных радикалов ( $In\cdot$ ). Введение экранированной алкильными группами гидроксильной группы в молекулы пиридилгидразонов приводит к увеличению величины  $f$ , что может быть обусловлено восстановлением реакционного центра молекулы антиоксиданта в процессе ингибированного окисления ЭТБ по бимолекулярной реакции с OH-группой:



Особенностью не иницированного цепного вырожденно-разветвленного процесса, протекающего при высокотемпературном окислении этилбензола (RH) и других органических веществ, является автоускоренное протекание реакции [9;10]. Такой ход процесса обусловлен низкой начальной скоростью зарождения цепей и автоиницированием за счет распада на радикалы образующихся при окислении гидропероксидов.



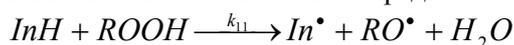
Пиридилгидразоны ингибируют жидкофазное окисление ЭТБ, но их эффективность значительно ниже по сравнению с ионолом (рис. 2) который уступает им по эффективности ингибирования иницированного окисления ЭТБ (табл. 1). Это по видимому связано с влиянием реакций антиоксидантов с молекулярными окислителями такими как кислород и гидропероксиды приводящих к их непродуктивному расходованию.



**Рисунок 2.** Кинетические кривые накопления гидропероксида при окислении ЭТБ без (0) и в присутствии  $[AO] = 5 \cdot 10^{-4}$  моль·л<sup>-1</sup>: 2 – соединение 2; 3 – соединение 3; 4 – соединение 4.  $T = 393K$ . Номера соединений соответствуют таблице 1.

Было проведено исследование взаимодействия пиридилгидразонов с гидропероксидом кумила (ГПК) при 393 К, в реакторе барботажного типа. Соединение 1, в отличие от соединения

2 взаимодействует с ГПК вероятно с образованием радикалов (рис. 3), что и обуславливает его меньшую АО активность в условиях автоокисления ЭТБ по предполагаемой схеме:



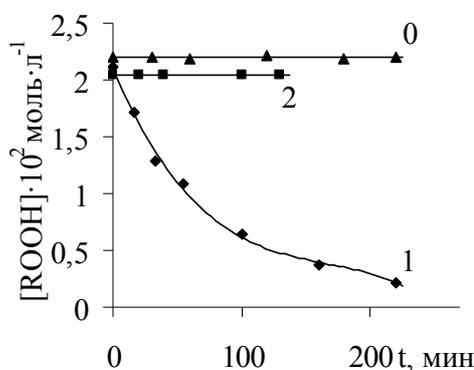
Квантово-химические расчеты проводились в приближении АМ1 с использованием пакета Huger Chem. Для всех рассчитанных структур производилась оптимизация геометрии по всем независимым переменным, системы с открытыми электронными оболочками рассчитывались в приближении неограниченного метода Хантри-Фока. Энергии N-H и O-H связей ( $D_{\text{X-H}}$ ) рассчитывались по уравнению:

$$D_{\text{X-H}} = \Delta H_{\text{In}^{\bullet}} + \Delta H_{\text{H}^{\bullet}} - \Delta H_{\text{InH}},$$

где  $\Delta H_{\text{In}^{\bullet}}$  – стандартная энтальпия образования радикала ингибитора;

$\Delta H_{\text{H}^{\bullet}}$  – стандартная энтальпия образования радикала водорода;

$\Delta H_{\text{InH}}$  – стандартная энтальпия образования молекулы;



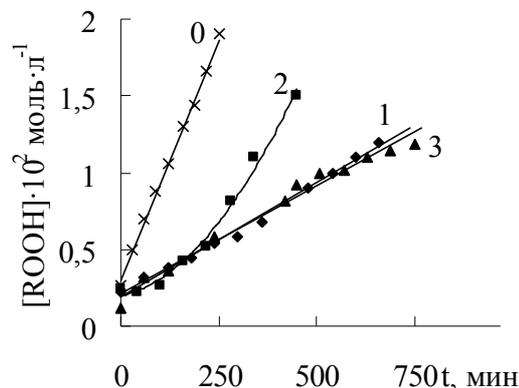
**Рисунок 3.** Взаимодействие пиридилгидразонов с ГПК в хлорбензоле без (0) и в присутствии АО: 1 – соединение 1, 2 – соединение 2.  $[\text{InH}] = 1 \cdot 10^{-3}$  моль·л<sup>-1</sup>,  $T=393$  К. Номера соединений соответствуют таблице 2.

Сравнивая  $D_{\text{N-H}}$  и  $D_{\text{O-H}}$  исследуемых пиридилгидразонов (табл. 1) можно сделать вывод о том, что N-H связь является менее прочной, а значит более реакционно-способной по отношению к пероксирадикалу. Поэтому первоочередной вклад в АОА гидразонов гидроксibenзальдегидов вносит NH-группа гидразонового фрагмента. Так соединение 3 имеет прочность N-H связи выше на 21,5 кДж/моль (табл. 1) в отличие от соединения 2, что с одной стороны приводит к некоторому снижению константы  $k_7$ , но при этом увеличивается устойчивость АО к действию молекулярных окислителей.

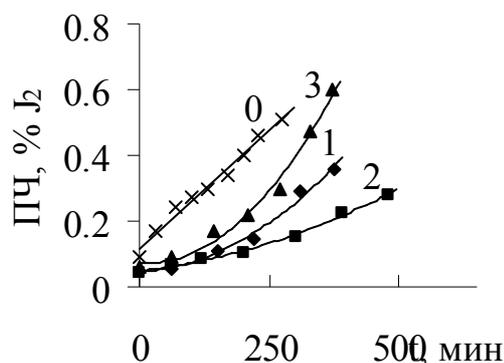
Пиридилгидразоны показали высокую АРА по отношению к активным формам кислорода (табл. 2), а именно HO· радикалам в системе  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$  в присутствии усилителя свечения люминола. Эффективность АО характеризовали параметром  $\text{IC}_{50}$  – концентрация АО при которой дезактивируется 50% образующихся в системе радикалов. Так соединение 1 имеет наибольшее значение параметра  $\text{IC}_{50}$ , которое на порядок выше чем у ионола.

Изучена АОА производных пиридилгидразонов в стабилизированной ДСNa модельной эмульсии ЭТБ:вода, окисление которой инициировали АИБН (рис. 4). Из рисунка видно, что соединение 1 имеет большую АОА нежели соединение 2 в данной модельной системе, при близких значения параметров  $f$  и  $k_7$ , это может быть связано с распределением ингибиторов между фазами водно-органической системы, которое зависит от липофильности соединений. Для объяснения полученных результатов, с помощью программного обеспечения ACD Labs были теоретически рассчитаны коэффициенты липофильности соединений ( $\log P$ ) и представлены в (табл. 2). Из таблицы видно, что при наличии гидрофобных заместителей в молекулах пиридилгидразонов увеличиваются значения  $\log P$ , и возрастает период индукции ( $\tau/\tau_0$ ). Увеличение липофильности АО способствует их ориентации в органическую фазу, где и происходит

окисление ЭТБ. Таким образом, в гетерофазном процессе окисления существенное влияние на АОО пиридилгидразонов оказывают коллоиднохимические факторы.



**Рисунок 4.** Кинетические кривые накопления гидропероксидов при инициированном АИБН окислении эмульсии ЭТБ:  $H_2O$  (1:3)  $[AIBN] = 1 \cdot 10^{-2}$  моль·л $^{-1}$ ;  $[DCNa] = 0,5$  моль·л $^{-1}$ ;  $T = 343K$ ; без (0) и в присутствии ингибиторов 1 – соединение 1, 2 – соединение 2, 3 – соединение 3. Номера соединений соответствуют таблице 2.



**Рисунок 5.** Кинетические кривые накопления перекисных соединений при инициированном АИБН окислении водной дисперсии ФХ (2 мас. %).  $[AIBN] = 1 \cdot 10^{-2}$  моль·л $^{-1}$ ;  $T = 333K$ ;  $[InH] = 5 \cdot 10^{-4}$  моль·л $^{-1}$ ;  $[DCNa] = 2$  мас. %; без (0) и в присутствии ингибиторов: 1 – соединение 1, 2 – соединение 2, 3 – соединение 3. Номера соединений соответствуют таблице 2.

При ингибировании окисления дисперсии ФХ инициированной АИБН пиридилгидразоны проявляют практически вдвое большую эффективность, чем ионол (рис. 5). Это возможно связано с существованием вероятного альтернативного механизма ингибирующего действия пиридилгидразонов, не связанного с антирадикальной активностью, например их взаимодействием с продуктами окисления ФХ (энаминами), которые сами по себе являются АО. Характер ингибирования окисления ФХ по сравнению с эмульсией ЭТБ :  $H_2O$  меняется, так соединение 2 имеет наибольший период индукции. Наблюдается обратная зависимость АОО от коэффициентов липофильности АО. Система ФХ :  $H_2O$  представляет собой бислойную липосомную дисперсию, в которой вклад процессов протекающих в приповерхностных слоях значительно выше чем в эмульсии ЭТБ. Таким образом различия в природе модельных систем обуславливают разный механизм действия ингибиторов.

#### Литература / References

1. Denisov E., Afanas'ev I. Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology. Boca Raton, FL: Taylor & Francis, 2005.
2. Дюбченко О.И., Никулина В.В., Марков А.Ф. и др. //Хим.-фарм. журн. 2006. Т. 40. № 5. С. 10.
3. Cheraskin E. Antioxidants in health and disease. J Am Optom Assoc 1996; 67(1):50–57

4. Bagchi D, Sen CK, Ray SD, Das DK, Bagchi M, Preuss HG, Vinson JA. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutat Res* 2003; 523–524:87–97
5. Органические растворители / Вайсбергер А., Проскауэр Э., Риддик Д.Ж., Тупс Э. - М.: ИЛ, 1958. - 385с.
6. А.Н. Николаевский, О.П. Книга, Е.И. Хижан, Г.А. Тихонова, В.В. Виноградов, А.И. Хижан // Журн. физ. хим. 2012. Т. 86. № 12. С. 1953-1957.
7. Шляпинтох В.Я., Карпухин О.Н., Постников Л.М. и др. Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов. М.: Наука, 1966. 300с.
8. Денисов Е.Т., Азатян В.В. Ингибирование цепных реакций. Черногловка: ИХФЧ РАН, 1979. 286 с.; Васильев Р.Ф., Кънчева В.Д., Федорова Г.Ф. и др. // Кинетика и катализ. 2010. Т. 51. № 4. С. 533
9. Эмануэль Н. М., Денисов Е. Т., Майзус З. К. Цепные реакции окисления углеводов в жидкой фазе. - М.: Наука, 1965. - 270 с.
10. Кнорре Д. Г. О некоторых особенностях действия ингибиторов в цепных реакциях с вырожденным разветвлением при квадратичном обрыве цепей // Журн. физ. химии. - 1955. - Т. 29, №7. - С. 1285-1291

*Поступила в редакцию 09 октября 2013 г.*

В. В. Виноградов, А. М. Николаевский, О. И. Хижан. Антиоксидантна активність піридилгідразонів ароматичних альдегідів.

Визначені кінетичні параметри антиоксидантної активності похідних піридилгідразонів ароматичних альдегідів при ініційованому окисленні етилбензолу хемілюмінесцентним методом. Досліджені антиоксиданти мають більші значення констант швидкості реакції з пероксильними радикалами  $k_7$  у порівнянні з іонолом. В умовах високотемпературного автоокислення етилбензолу ефективність досліджених антиоксидантів знижується. Встановлено, що 3-піридилгідразон-3,5-диметил-4-гідроксибензальдегіду взаємодіє з гідропероксидом кумілу.

Хемілюмінесцентним методом показано, що піридилгідразони виявляють високу активність щодо  $\text{HO}^\bullet$  радикалів у водному розчині. Вивчено закономірності інгібуючої дії піридилгідразонів в гетерогенних системах. Встановлено залежність антиокислювальної активності гідразонів від значень показників ліофільності антиоксидантів. При інгібуванні ініційованого окислення дисперсії фосфатидилхоліну піридилгідразони проявляють практично вдвічі більшу АОА ніж іонол.

**Ключові слова:** піридилгідразон, антиоксидант, стехіометричний коефіцієнт інгібування, період індукції, окислення в емульсії.

V. V. Vinogradov, A. N. Nicholas, E. I. Khigan. Antioxidant activity of piridilgidrazones aromatic aldehydes.

The kinetic parameters of anti-radical activity of piridilhidrazones aromatic aldehydes in initiated oxidation of ethylbenzene have been investigated from chemiluminescence method. The studied antioxidants have considerably great values of constants of speed  $k_7$  in comparison with the ionol. In the conditions of autooxidation of ethylbenzene the efficiency of the studied antioxidants a reduce.

It was found that 3-piridilgidrazon-3,5-dimetil-4- hydroxy benzaldehyde interacts with cumene hydroperoxide. Regularities of inhibiting action of piridilhidrazones in heterogeneous systems are studied. Interaction of piridilhidrazones with  $\text{HO}^\bullet$  radicals is investigated by a hemilyuminescentny method in water solution. It is defined that piridilhidrazones show high activity towards  $\text{HO}^\bullet$  radicals.

At the initiated azodiizobutironitril oxidation emulsion of ethylbenzene : water derivative of piridilhidrazones showed high antioxidant activity. In the presence of hydrophobic deputies in molecules antioxidants, increase the values of  $\log P$  and increases induction period ( $\tau/\tau_0$ ). The inhibition of the initiated oxidation of dispersion phosphatidylcholine, piridilhidrazones show practically twice higher antioxidant activity in comparison with the ionol.

**Key words:** piridilgidrazon, antioxidant, the stoichiometric ratio of inhibition, the period of induction, the oxidation of the emulsion.