УДК 547.854.4:544.424:544.421.081.7:542.978

DOI: 10.33184/bulletin-bsu-2019.4.11

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА 6-О-ПАЛЬМИТОИЛ-*L*-АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

© С. А. Грабовский*, Ю. С. Грабовская, А. В. Антипин, Н. Н. Кабальнова

Уфимский институт химии УФИЦ РАН

Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, пр. Октября, 71.

Тел.: +7 (347) 235 60 11.

*Email: stas_g@anrb.ru

*Изучена антиоксидантная активность 6-О-пальмитоил-*L*-аскорбиновой кислоты (ПАК) в модельной реакции инициированного азобисизобутиронитрилом окисления стирола в хлорбензоле. Влияние добавок пиридина и трихлоруксусной кислоты так же изучено и обсуждается. Константа скорости ПАК с пероксильными радикалами при 37 °С равна 1.4×10^5 л/(моль·с), однако стехиометрический коэффициент ингибирования значительно ниже, чем в полярных растворителях.*

Ключевые слова: аскорбиновая кислота, окисление, радикалы, кинетика, антиоксиданты.

Введение

Аскорбиновая кислота (витамин С) является биологическим кофактором, который играет важную роль в многочисленных биологических процессах, имеющих фундаментальное значение для клеточных функций [1–3]. При физиологическом рН она диссоциирует ($pK_a = 4.1$), поэтому биологические эффекты витамина С обычно приписывают аскорбат-аниону [4]. Будучи сильным восстановителем, аскорбат действует как ингибитор свободных радикалов непосредственно или регенерирует другие антиоксиданты, таких как альфа-токоферол или глутатион [1–3]. В присутствии переходных металлов, витамин С проявляет прооксидантные свойства, он реагирует с молекулярным кислородом с образованием пероксида водорода и дегидроаскорбиновой кислоты через образование в качестве интермедиата супрокид анион радикала [4]. Некоторые исследователи связывают образование O_2^- с замедлением роста опухолей при введение больших доз аскорбиновой кислоты различным животным на многочисленных моделях [5–6].

Аскорбаты (Na^+ , Ca^{2+}) и сложные эфиры витамина С (пальмитат или стеарат) часто используются в качестве пищевых добавок. 6-О-пальмитоил-*L*-аскорбиновой кислоты (ПАК) является антиоксидантом, который используют для придания определенных функциональных свойств. Например, в косметологии [7] и фармацевтике [8] для стабилизации эмульсий масло-в-воде и антиокислительной стабилизации, т.к. ПАК локализуется в липидной фазе, где обычно содержатся окисляемые материалы [9].

Несмотря на то, что химия аскорбиновой кислоты и аскорбат иона в водных растворах изучается давно [10–14], многие реакции с их участием *in vivo* происходят в активных центрах ферментов или на границах раздела мембран, которые имеют гидрофобную локальную среду, поэтому знание химии аскорбиновой кислоты или ее производных в неводных средах важны для всестороннего понимания их роли. Исследования в апротонном полярном

растворителе ацетонитриле были недавно выполнены для ПАК и изопропилиденового эфира аскорбиновой кислоты [15–17].

В связи с этим, данная работа посвящена изучению антиоксидантной активности ПАК – жирорастворимого производного аскорбиновой кислоты в неполярном растворителе по отношению к пероксильным радикалам и обсуждается механизм ингибирования.

Результаты и их обсуждение

Антиоксидантные свойства 6-О-пальмитоил-*L*-аскорбиновой кислоты исследовали используя надежный метод инициированного окисления стирола в хлорбензоле при 37 °С [18–19].

Окисление стирола, инициированное АИБН в присутствии ингибиторов может быть описано схемой 1.

Схема 1. Общая схема инициированного окисления стирола и ингибирования (P – нерадикальные продукты).

Антиоксидантная активность характеризуется двумя независимыми параметрами – константой скорости реакции отрыва H атома ингибитора пероксильными радикалами (4) и стехиометрическим коэффициентом ингибирования f (число пероксильных радикалов, обрывающих цепь на одной молекуле ингибитора).

ПАК при концентрации 10^{-5} – 10^{-4} М уменьшает скорость расходования кислорода при окислении стирола (рис. 1). Индукционный период (τ) нелинейно возрастает с увеличением концентрации ПАК (рис. 2). После его завершения скорость реак-

ции поглощения кислорода равна скорости окисления стирола без добавок ингибитора, т.е. продукты превращения ингибитора не влияют на процесс. Константа скорости ингибирования не превышает значения $1.4 \cdot 10^5$ л/(моль·с) (табл. 1). Полученная величина выше, чем в ацетонитриле ($8.4 \cdot 10^4$ л/(моль·с) [17]), что может быть объяснено специфической сольватации НО-группы растворителем. Такое снижение константы скорости вследствие сольватации полярными растворителями наблюдается и для других антиоксидантов с реакционноспособной НО-группой [20].

Рис. 1. Типичные кинетические кривые поглощения кислорода при инициированном АИБН ($R_i = 1.3 \cdot 10^{-8}$ М·с $^{-1}$; $T = 310$ К) окислении стирола (1.7 М) в хлорбензоле (кривая 1) и ингибировании 6-О-пальмитоил-*L*-аскорбиновой кислотой (кривая 2) $1.0 \cdot 10^{-4}$ М, (кривая 3) $2.5 \cdot 10^{-4}$ М.

Для изученного нами производного стехиометрический коэффициент ингибирования (f) значительно меньше 2. Известно, что если радикалы ингибитора реагирует с пероксильными радикалами (реакция (5) в схеме 2), то f равно 2.0. Когда расходование радикалов ингибитора предпочтительно происходит по реакции рекомбинации (реакция 7), то f равно 1.0. Дальнейшее уменьшение величины f может наблюдаться, если происходит окисление ингибитора молекулярным кислородом и/или реакция кислорода с образующимся радикалом ингибитора [21–22]. Исследованное соединение не окисляется молекулярным кислородом в изученных условиях. Мы предполагаем, что низкое значение f обусловлено свойствами радикала инги-

битора, образующегося при отрыве атома водорода пероксильным радикалом. В частности, реакция с радикала ингибитора с кислородом генерирующая $\text{HOO}^\bullet/\text{O}_2^\bullet$ радикалы или реакция с субстратом окисления приводящая к продолжению цепи, как это было показано ранее в ряде работ [17–18; 21–22]. Реакционная способность $\text{O}_2^\bullet$ и гидропероксильного радикала по отношению к антиоксиданту и субстрату окисления, как правило, отличаются в среднем на 1–2 порядка [23]. Таким образом, сместив равновесие $\text{HOO}^\bullet / \text{O}_2^\bullet$ добавлением трихлоруксусной кислоты в сторону образования более реакционноспособного $\text{HOO}^\bullet$ радикала, должно наблюдаться уменьшение значения f за счет продолжения цепи окисления.

Рис. 2. Зависимость индукционного периода при окислении стирола инициированного АИБН ($R_i = 1.3 \cdot 10^{-8}$ М·с $^{-1}$; $T = 310$ К) от концентрации 6-О-пальмитоил-*L*-аскорбиновой кислотой.

Однако согласно полученным результатам этого не происходит, а добавки основания приводят к росту константы скорости и стехиометрического коэффициента ингибирования. В случае экспериментов с добавками основания, рост константы скорости ингибирования и f , по-видимому, связан с образованием ее анионной формы. В случае ингибирования без добавок, нелинейная зависимость (рис. 2) может быть связана с участием окисльного радикала ПАК, образовавшегося после отрыва атома водорода пероксильным радикалом, в реакции продолжения цепи.

Таблица 1

Параметры, характеризующие антиоксидантные свойства 6-О-пальмитоил-*L*-аскорбиновой кислоты в ингибированном окислении стирола (растворитель хлорбензол, 37°C, в атмосфере воздуха; инициатор АИБН; добавки: пиридин (ПИР) и трихлоруксусная кислота (ТХК))

[ПАК] 10^5 , М	Условия	$W_0(\text{O}_2) \cdot 10^{-7}$, М/с	$k_4 \cdot 10^{-4}$, М $^{-1}$ ·с $^{-1}$	f
0	—	8.4	—	—
5.0	—	1.0	14±1	0.15±0.02
10.0	—	1.5	4.7±0.4	0.12±0.02
20.0	—	2.3	1.5±0.1	0.08±0.01
25.0	—	2.6	1.0±0.1	0.07±0.01
20.0	[ТХК] $_0 = 2.0 \cdot 10^{-4}$ М	2.9	1.1±0.1	0.06±0.01
20.0	[ПИР] $_0 = 2.0 \cdot 10^{-4}$ М	~ 0	—	0.36±0.04
7.5	[ПИР] $_0 = 7.6 \cdot 10^{-5}$ М	0.4	24±1	0.28±0.03
7.5	[ПИР] $_0 = 2.0 \cdot 10^{-3}$ М	0.3	30±1	0.30±0.03
7.5	[ПИР] $_0 = 4.0 \cdot 10^{-3}$ М	0.3	34±1	0.30±0.03

Выводы

Антиоксидантные свойства жирорастворимого производного 6-О-пальмитоил-*L*-аскорбиновой кислоты изучены в модельной системе окисления стирола в неполярном растворителе. Константа скорости реакции с пероксильными радикалами в хлорбензоле выше, по сравнению с наблюдаемой в ацетонитриле, однако эффективность ингибирования снижается с ростом концентрации, что, по-видимому, связано с участием окисильного радикала 6-О-пальмитоил-*L*-аскорбиновой кислотой в реакции продолжения цепи.

Экспериментальная часть

2,2'-Азобисизобутиронитрил (АИБН) очищали двукратной перекристаллизацией из 96%-ного этилового спирта. Стирол очищали от ингибитора на колонке с окисью алюминия с последующей вакуумной перегонкой при 40°C. Коммерчески доступные реагенты – пиридин (ч.д.а.), трихлоруксусная кислота (>98%), 6-О-пальмитоил-*L*-аскорбиновая кислота (98%) использовали без дополнительной очистки. Хлорбензол (ч.д.а.) сушили над CaCl₂ и перегоняли непосредственно перед использованием.

Антиоксидантную активность производного аскорбиновой кислоты изучали в модельной системе инициированного азобисизобутиронитрилом (АИБН) окисления стирола в хлорбензоле при 37°C в атмосфере воздуха ($P_0 = 1$ атм) [21]. В предварительных экспериментах с использованием УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ было установлено, что соединения не расходуются в насыщенных кислородом растворах в отсутствие АИБН и в присутствии АИБН без кислорода. Количество поглощенного кислорода определяли с помощью манометрической дифференциальной установки с датчиком перепада давления в кинетическом режиме, коэффициент Генри = 0.198 для смеси хлорбензол – стирол при 37°C как описано ранее [21]. Скорость инициирования R_i измеряли предварительно в серии экспериментов по определению периода индукции (τ), используя α -токоферол (α -ТР) в качестве эталонного антиоксиданта: $R_i = 2[\alpha\text{-ТР}]/\tau$ [27]. Определение периода индукции, расчет констант скорости реакции с пероксильными радикалами и стехиометрического коэффициента ингибирования проводили аналогично [28].

Работа выполнена по теме «Окислительные процессы с участием активных форм кислорода» №АААА-А17-117011910035-5 гос. задания.

ЛИТЕРАТУРА

- Beyer R. E. The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: Interaction with vitamin E and coenzyme Q // Arch. Bioenerg. Biomembr. 1994. Vol. 26. No. 4. Pp. 349–358.
- Monteiro G., Horta B. B., Pimenta D. C., Augusto O., Netto L. E. S. Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2007. Vol. 104. No. 12. Pp. 4886–4891.
- Foti M., Amorati R. Non-phenolic radical-trapping antioxidants. // J. Pharm. Pharmacol. 2009. Vol. 61. No. 11. Pp. 1435–1448.
- Buettner G. R. In the absence of catalytic metals ascorbate does not autoxidize at pH 7: ascorbate as a test for catalytic metals // J. Biochem. Biophys. Methods. 1988. Vol. 16. No. 1. Pp. 27–40.
- Chen Q., Espey M. G., Sun A. Y., Pooput C., Kirk K. L., Krishna M. C., Khosh D. B., Drisko J., Levine M. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008. Vol. 105. No. 32. Pp. 11105–11109.
- Verrax J., Calderon P. B. Pharmacologic concentrations of ascorbate are achieved by parenteral administration and exhibit antitumoral effects // Free Radical Biol. Med., 2009. Vol. 47. No. 1. Pp. 32–40.
- Carlotti M. E., Ugazio E., Gastaldi L., Sapino S., Vione D., Fenoglio I., Fubini B. Specific effects of single antioxidants in the lipid peroxidation caused by nano-titania used in sunscreen lotions. // J. Photochem. Photobiol. B, 2009. Vol. 96. No. 2. Pp. 130–135.
- Moribe K., Maruyama S., Inoue Y., Suzuki T., Fukami T., Tomono K., Higashi K., Tozuka Y., Yamamoto K. Ascorbyl dipalmitate/PEG-lipid nanoparticles as a novel carrier for hydrophobic drugs // Int. J. Pharm. 2010. Vol. 387. No. 1–2. Pp. 236–243.
- Frankel E. N., Huang S.-W., Kannerl J., German J. B. Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils vs Emulsions // J. Agric. Food Chem. 1994. Vol. 42. Pp. 1054–1059.
- Cabelli D. E., Bielski H. J. Kinetics and mechanism for the oxidation of ascorbic acid/ascorbate by HO₂/O₂⁻ (hydroperoxyl/superoxide) radicals. A pulse radiolysis and stopped-flow photolysis study // J. Phys. Chem. 1983. Vol. 87. No. 10. Pp. 1809–1812.
- Neta P., Huie R. E., Mosseri S., Shastri L. V., Mittal J. P., Maruthamuthu P., Steenken S. Rate constants for reduction of substituted methylperoxyl radicals by ascorbate ions and N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine. // J. Phys. Chem. 1989. Vol. 93. No. 10. Pp. 4099–4104.
- Alfassi Z. B., Huie R. E., Kumar M., Neta P. Temperature dependence of the rate constants for oxidation of organic compounds by peroxyl radicals in aqueous alcohol solutions. // J. Phys. Chem. 1992. Vol. 96. No. 2. Pp. 767–770.
- Njus D., Kelley P. M. Vitamins C and E donate single hydrogen atoms in vivo // FEBS Lett. 1991. Vol. 284. No. 2. Pp. 147–151.
- Njus D., Kelley P. M. The secretory-vesicle ascorbate-regenerating system: A chain of concerted H⁺/e⁻-transfer reactions // Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg., 1993. Vol. 1144. No. 3. Pp. 235–248.
- Warren J. J., Mayer J. M. Surprisingly Long-Lived Ascorbyl Radicals in Acetonitrile: Concerted Proton-Electron Transfer Reactions and Thermochemistry // J. Am. Chem. Soc. 2008. Vol. 130. No. 24. Pp. 7546–7547.
- Warren J. J., Mayer J. M. Tuning of the Thermochemical and Kinetic Properties of Ascorbate by Its Local Environment: Solution Chemistry and Biochemical Implications // J. Am. Chem. Soc. 2010. Vol. 132. No. 22. Pp. 7784–7793.
- Amorati R., Pedulli G. F., Valgimigli L. Kinetic and thermodynamic aspects of the chain-breaking antioxidant activity of ascorbic acid derivatives in non-aqueous media // Org. Biomol. Chem. 2011. Vol. 9. No. 10. Pp. 3792–3800.
- Burton G. W., Doba T., Gabe E. J., Hughes L., Lee F. L., Prasad L., Ingold K. U. Autoxidation of biological molecules. 4. Maximizing the antioxidant activity of phenols // J. Am. Chem. Soc. 1985. Vol. 107. Pp. 7053–7065.
- Loshadkin D., Roginsky V., Pliss E. Substituted p-hydroquinones as a chain-breaking antioxidant during the oxidation of styrene // Int. J. Chem. Kin. 2002. Vol. 34. No. 3. Pp. 162–171.

20. Tikhonov, I., Roginsky, V., Pliss, E. The chain-breaking antioxidant activity of phenolic compounds with different numbers of O-H groups as determined during the oxidation of styrene // *Int. J. Chem. Kin.*, 2009. Vol. 41. No. 2. Pp. 92–100.
21. Ingold K. U., Pratt D. A. Advances in Radical-Trapping Antioxidant Chemistry in the 21st Century: A Kinetics and Mechanisms Perspective // *Chem. Rev.* 2014. Vol. 114. No. 18. Pp. 9022–9046.
22. Grabovskiy S.A., Antipin A.V., Grabovskaiy Y.S., Andriyashina N.M., Kabal'nova N.N. Effect of the 6-Methyl Group on Peroxyl Radical Trapping by 5-Hydroxyand 5-Amino- Derivatives of 1,3-Dimethyluracil // *Lett. Org. Chem.* 2017. Vol. 14. No. 1. Pp. 24–32.
23. Bielski, B. H. J., Cabelli, D. E., Arudi, R. L., Ross, A. B. Reactivity of HO_2/O_2^- Radicals in Aqueous Solution. // *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 1985. Vol. 14. Pp. 1041–1100.

Поступила в редакцию 09.10.2019 г.

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF 6-O-PALMITOIL-L-ASCORBIC ACID

© S. A. Grabovskii*, Yu. S. Grabovskaia, A. V. Antipin, N. N. Kabalnova

*Ufa Institute of Chemistry, Ufa Federal Research Center of RAS
71 Oktyabrya Avenue, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.**Phone: +7 (347) 235 60 11.***Email: stas_g@anrb.ru*

Ascorbic acid (vitamin C) is a biological cofactor that plays an important role in numerous biological processes that are fundamental to cellular functions. Despite the fact that the chemistry of ascorbic acid and ion ascorbate in aqueous solutions was being studied for a long time, many reactions with their participation in vivo occur in the active sites of enzymes or at the interfaces of membranes that have a hydrophobic local environment, therefore knowledge of ascorbic acids chemistry or its derivatives in non-aqueous media are important for a comprehensive understanding of their role. Styrene is a good substrate for the testing of chain-breaking antioxidants and the determination of antioxidant reactivity. The antioxidant activity of 6-O-palmitoil-L-ascorbic acid (PAA) in the model reaction of autoxidation of styrene initiated by azobis(isobutyronitrile) (AIBN) in chlorobenzene was studied. This reaction initiated by the thermal decomposition of AIBN at 37 °C under air atmosphere was followed by monitoring the oxygen consumption with a recording gas-absorption apparatus, which uses differential pressure transducer as a detector. The rate of initiation was measured in a preliminary set of experiments from the length of the induction period, using alpha-tocopherol as a reference antioxidant. The effects of pyridine and trichloroacetic acid additives were also studied and discussed. The rate constant of PAA with peroxy radicals at 37 °C is 1.4×10^5 L/(M s). However, the stoichiometric inhibition coefficient is much lower than in polar solvents. The rate constant of the reaction with peroxy radicals in chlorobenzene is higher than in acetonitrile; however, the inhibition efficiency decreases with increasing concentration, which is apparently due to a reaction of the oxyl-radical of PAA in the chain-propagation.

Keywords: oxidation, free radical, kinetics, antioxidant, ascorbic acid derivative.

Published in Russian. Do not hesitate to contact us at bulletin_bsu@mail.ru if you need translation of the article.

REFERENCES

1. Beyer R. E. Arch. Bioenerg. Biomembr 1994. Vol. 26. No. 4. Pp. 349–358.
2. Monteiro G., Horta B. B., Pimenta D. C., Augusto O., Netto L. E. S. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2007. Vol. 104. No. 12. Pp. 4886–4891.
3. Foti M., Amorati R. J. Pharm. Pharmacol. 2009. Vol. 61. No. 11. Pp. 1435–1448.
4. Buettner G. R. J. Biochem. Biophys. Methods. 1988. Vol. 16. No. 1. Pp. 27–40.
5. Chen Q., Espey M. G., Sun A. Y., Pooput C., Kirk K. L., Krishna M. C., Khosh D. B., Drisko J., Levine M. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008. Vol. 105. No. 32. Pp. 11105–11109.
6. Verrax J., Calderon P. B. Free Radical Biol. Med., 2009. Vol. 47. No. 1. Pp. 32–40.
7. Carlotti M. E., Ugazio E., Gastaldi L., Sapino S., Vione D., Fenoglio I., Fubini B. J. Photochem. Photobiol. B, 2009. Vol. 96. No. 2. Pp. 130–135.
8. Moribea K., Maruyama S., Inoue Y., Suzuki T., Fukami T., Tomono K., Higashi K., Tozuka Y., Yamamoto K. Int. J. Pharm. 2010. Vol. 387. No. 1–2. Pp. 236–243.
9. Frankel E. N., Huang S.-W., Kannerl J., German J. B. J. Agric. Food Chem. 1994. Vol. 42. Pp. 1054–1059.
10. Cabelli D. E., Bielski H. J. J. Phys. Chem. 1983. Vol. 87. No. 10. Pp. 1809–1812.
11. Neta P., Huie R. E., Mosseri S., Shastri L. V., Mittal J. P., Maruthamuthu P., Steenken S. J. Phys. Chem. 1989. Vol. 93. No. 10. Pp. 4099–4104.
12. Alfassi Z. B., Huie R. E., Kumar M., Neta P. J. Phys. Chem. 1992. Vol. 96. No. 2. Pp. 767–770.
13. Njus D., Kelley P. M. FEBS Lett. 1991. Vol. 284. No. 2. Pp. 147–151.
14. Njus D., Kelley P. M. Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg., 1993. Vol. 1144. No. 3. Pp. 235–248.
15. Warren J. J., Mayer J. M. J. Am. Chem. Soc. 2008. Vol. 130. No. 24. Pp. 7546–7547.
16. Warren J. J., Mayer J. M. J. Am. Chem. Soc. 2010. Vol. 132. No. 22. Pp. 7784–7793.
17. Amorati R., Pedulli G. F., Valgimigli L. Org. Biomol. Chem. 2011. Vol. 9. No. 10. Pp. 3792–3800.
18. Burton G. W., Doba T., Gabe E. J., Hughes L., Lee F. L., Prasad L., Ingold K. U. J. Am. Chem. Soc. 1985. Vol. 107. Pp. 7053–7065.
19. Loshadkin D., Roginsky V., Pliss E. Int. J. Chem. Kin. 2002. Vol. 34. No. 3. Pp. 162–171.
20. Tikhonov, I., Roginsky, V., Pliss, E. Int. J. Chem. Kin., 2009. Vol. 41. No. 2. Pp. 92–100.
21. Ingold K. U., Pratt D. A. Chem. Rev. 2014. Vol. 114. No. 18. Pp. 9022–9046.
22. Grabovskiy S.A., Antipin A.V., Grabovskaia Y.S., Andriayshina N.M., Kabal'nova N.N. Lett. Org. Chem. 2017. Vol. 14. No. 1. Pp. 24–32.
23. Bielski, B. H. J., Cabelli, D. E., Arudi, R. L., Ross, A. B. J. Phys. Chem. Ref. Data. 1985. Vol. 14. Pp. 1041–1100.

Received 09.10.2019.