

Г. Г. Гарифуллина (к.х.н., доц.), Р. Н. Насретдинова (к.х.н., доц.),
Р. М. Баширова (к.б.н., доц.), А. Д. Ханова (магистрант), А. Я. Герчиков (д.х.н., проф.)

ГИПЕРИЦИН КАК ИНГИБИТОР РАДИКАЛЬНО-ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

Башкирский государственный университет,
кафедра физической химии и химической экологии
450076, Россия, г. Уфа, ул. З. Валиди, 32, тел. 8(347)2299721, e-mail: Garifa@inbox.ru

G. G. Gariphullina, R. N. Nasretdinova, R. M. Bashirova, A. D. Khanova, A. Ya. Gerchikov HYPERICIN AS INHIBITOR OF THE CHAIN-RADICAL OXIDATION OF THE ORGANIC COMPOUNDS

Bashkir State University,
32, Zaki Validi Str., Ufa, 450076, Russia, ph. 8(347)2299721, e-mail: Garifa@inbox.ru

Показано, что гиперичин является ингибитором реакций радикально-цепного окисления органических соединений. Эксперименты проводились на двух моделях реакций инициированного жидкофазного радикально-цепного окисления субстратов – кумола (ИПБ) и изопропилового спирта (ИПС) под действием нафтодиантронового пигмента – гиперичина. С ростом концентрации гиперичина его ингибирующие свойства инвертируются, и он становится инициатором окислительного процесса. Причиной инверсии ингибирующих свойств гиперичина является его гомолитическое взаимодействие с накапливающимися пероксидными продуктами, что приводит к увеличению скорости вырожденного разветвления цепи окисления.

Ключевые слова: антиоксидант; гиперичин; зверобой обыкновенный; прооксидант.

Интерес, проявляемый в последние годы к веществам фотодинамического действия, обуславливает необходимость их более детального изучения. Популярным объектом для исследований фотодинамических эффектов являются нафтодиантроновые пигменты – гиперичин (1,3,4,6,8,13-гидрокси-1 С 0,11-диметилфенантро[1,10,9,8-орqо]перилен 7,14-дион) и псевдогиперичин, свойственные растениям рода *Hypericum*.

Наиболее существенной особенностью строения гиперичина является присутствие гидроксильных групп, атомы водорода которых способны образовывать внутримолекулярные (с атомами кислорода карбонильных групп) или межмолекулярные (с атомами мат-

It was shown the property of hypericin to inhibit the chain-radical oxidation of the organic compounds. The experiments were carried out on two models of reactions initiated by liquid-phase radical-chain oxidation of substrates – cumene (IPB) and isopropyl alcohol (IPA) under the action of naphthodthyrone pigment – hypericin. The inhibitory property of hypericin is inverted with growing the concentration of this compound, and it became the initiator of oxidation processes. The reason of this inversion is the homolitic interaction of hypericin with the peroxide products. The result of it is the increasing of speed of the degenerated branching of the oxidant chain.

Key words: antioxidant; *Hypericum perforatum* L.; hypericin; prooxidant.

ричного окружения) водородные связи. Образование внутримолекулярных водородных связей в структуре гиперичина влияет на относительное положение электронно-колебательных уровней молекулы пигмента и способность к эффективной генерации синглетного кислорода при действии света ¹.

Действие гиперичина на животный организм проанализировано довольно обстоятельно, чего нельзя сказать об изученности функций этого соединения в растениях ². С учетом вышеизложенного, целью наших исследований стало изучение влияния гиперичина на ход радикально-цепных реакций окисления органических веществ и на соотношение процессов перекисного окисления липидов и содержания гиперичина в растениях.

Дата поступления 03.04.19

Материалы и методы исследования

Нами были использованы две модели реакций инициированного жидкофазного радикально-цепного окисления субстратов – кумола (ИПБ) и изопропилового спирта (ИПС).

Действие этанольного экстракта *Hypericum perforatum* (*H. perforatum*) (образец 1) изучали по скорости накопления гидропероксида при окислении кумола кислородом воздуха в присутствии инициатора – азодиизобутиронитрила (АИБН) при 60 °С и скорости инициирования $V_i=6 \cdot 10^{-6}$ моль/л·мин.

Для выявления причин специфического поведения гиперидина (*Hyp*) как предполагаемого ингибитора процесса радикально-цепного окисления было изучено влияние экстракта *H. perforatum* на скорость инициированного окисления изопропанола, при окислении которого в качестве интермедиата образуется H_2O_2 . В этом случае был использован метанольный экстракт цветков *H. perforatum* (образец 2), предварительно обработанных хлороформом с целью делипидизации и освобождения от каротиноидов. Затем растительное сырье экстрагировали ацетоном, после отгонки которого сухой остаток растворяли в метаноле ². При этом концентрация гиперидина в экстракте составила $1.15 \cdot 10^2$ моль/л.

Для выявления возможности увеличения скорости вырожденного разветвления цепи были поставлены специальные опыты, в которых метанольный экстракт, содержащий гиперидин, вводили в развившуюся реакцию, когда накоплено определенное количество H_2O_2 .

Все модельные эксперименты проводились в условиях обычного светового режима.

Исследование взаимосвязи содержания гиперидина и накопления малонового диальдегида проводилось на интактных растениях *H. perforatum*. Малоновый диальдегид (МДА) определяли по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой ³, количество гиперидина – спектрофотометрически при $\lambda=590$ нм ².

Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведены кинетические кривые накопления гидропероксида в отсутствие и в присутствии добавок гиперидина, свидетельствующие об ингибирующем действии этанольного экстракта с гиперидином $3.57 \cdot 10^{-3}$ моль/л, которое проявляется как в появлении периода индукции (τ) в накоплении H_2O_2 , так и в значительном снижении скорости процесса (табл. 1).

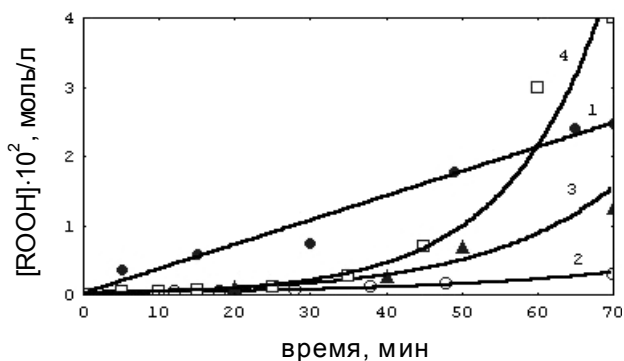


Рис. 1. Кинетические кривые накопления перекисных продуктов окисления кумола, ингибированного этанольным экстрактом *H. perforatum*: $t = 60$ °С, $V_i = 6 \cdot 10^{-6}$ моль/л·мин; 1 – $[Hyp] = 0$; 2 – $[Hyp] = 3.57 \cdot 10^{-3}$ моль/л; 3 – $[Hyp] = 7.14 \cdot 10^{-3}$ моль/л; 4 – $[Hyp] = 14.3 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

Таблица 1

Влияние добавок гиперидина (образец 1) на период индукции и начальную скорость инициированного окисления кумола, 60 °С, $V_i=6 \cdot 10^{-6}$ моль/л·мин

Концентрация гиперидина в образце 1, моль/л	τ , мин	$V_0 \cdot 10^5$, моль/л·мин
0.0	0	36.6
$3.57 \cdot 10^{-3}$	24	2.5
$7.14 \cdot 10^{-3}$	28	3.0
$14.3 \cdot 10^{-3}$	27.5	3.9

Связь начальной скорости процесса окисления ИПБ и концентрации гиперидина наглядно демонстрирует рис. 2: при увеличении концентрации добавки выше $3.57 \cdot 10^{-3}$ моль/л значение практически не изменяется, но начальная скорость процесса несколько возрастает, что может свидетельствовать о вовлечении гиперидина в окислительный процесс.

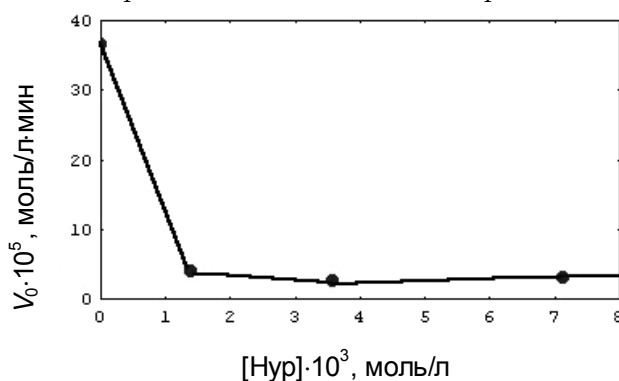


Рис. 2. Зависимость начальной скорости процесса окисления кумола от концентрации гиперидина в этанольном экстракте *H. perforatum*: $t=60$ °С, $V_i=6 \cdot 10^{-6}$ моль/л·мин. $[Hyp] = 0 \Sigma 14.3 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

В условиях эксперимента (70 °С; $V_i=1.85 \cdot 10^{-5}$ моль/л·мин) ИПС окисляется по радикально-цепному механизму. Кинетические кри-

вые накопления гидроперекисных продуктов окисления ИПС представлены на рис. 3.

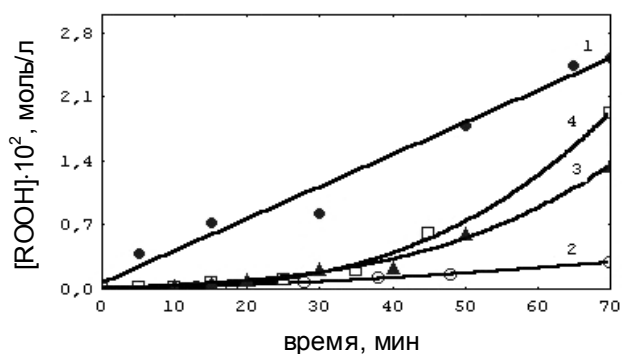


Рис. 3. Кинетические кривые накопления перекисных продуктов окисления изопропанола, ингибированного метанольным экстрактом *H. perforatum*: $t = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $V_i = 1.85 \cdot 10^{-5}$ моль/л·мин; 1 – $[\text{Hyp}] = 0$; 2 – $[\text{Hyp}] = 4.6 \cdot 10^{-4}$ моль/л; 3 – $[\text{Hyp}] = 14.4 \cdot 10^{-4}$ моль/л; 4 – $[\text{Hyp}] = 36.0 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

Введение образца 2 в окисляющийся субстрат приводит к изменению характера накопления продукта окисления: на кинетических кривых появляется период индукции, а начальная скорость реакции в интервале концентраций гиперидина $(0+23) \cdot 10^{-4}$ моль/л снижается. Дальнейшее увеличение концентрации гиперидина приводит к росту скорости реакции окисления. В табл. 2 приведены значения скорости процесса и периодов индукции при окислении ИПС в присутствии различных концентраций гиперидина.

Таблица 2

Влияние добавок гиперидина (образец 2) на период индукции и начальную скорость инициированного окисления изопропанола; $70\text{ }^{\circ}\text{C}$; $V_i = 1.85 \cdot 10^{-5}$ моль/л·мин

Концентрация гиперидина в образце 2, моль/л	τ , мин	$V_0 \cdot 10^5$, моль/л·мин
0.0	0	7.28
$3.45 \cdot 10^{-4}$	32	3.4
$7.19 \cdot 10^{-4}$	42	2.76
$14.4 \cdot 10^{-4}$	45	1.90
$23.0 \cdot 10^{-4}$	40	1.50
$28.8 \cdot 10^{-4}$	0.0	4.97
$57.5 \cdot 10^{-4}$	0.0	5.19

На рис. 4 представлена зависимость начальной скорости окисления от концентрации гиперидина в метанольном экстракте *H. perforatum*.

Видно, что в пределах концентраций гиперидина $(0+23) \cdot 10^{-4}$ моль/л скорость реакции уменьшается. Дальнейшее увеличение его концентрации приводит к росту скорости процесса.

Одной из возможных причин наблюдаемого возрастания скорости реакции может

быть передача окислительной цепи на радикал ингибитора или гомолитическое взаимодействие ингибитора с пероксидным продуктом, приводящие к увеличению скорости вырожденного разветвления цепи. Заметим, что инверсия ингибирующих свойств стабилизаторов радикально-цепного окисления при увеличении их концентрации, которое наблюдается в данном случае, представляет собой достаточно распространенное явление⁴. В частности, это характерно для токоферола⁵ и каротиноидов⁶.

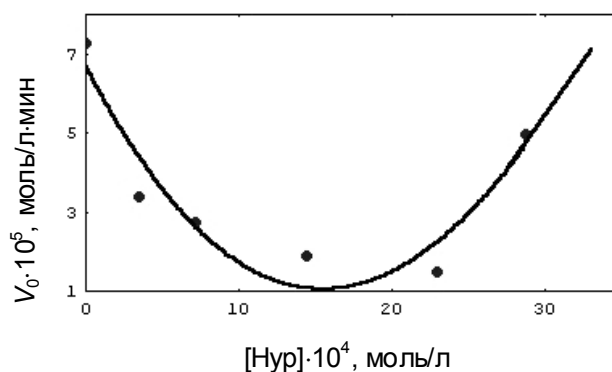


Рис. 4. Зависимость начальной скорости процесса окисления изопропанола от концентрации гиперидина в метанольном экстракте *H. perforatum*: $t = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $V_i = 1.85 \cdot 10^{-5}$ моль/л·мин; $[\text{Hyp}] = (0 \Sigma 49.7) \cdot 10^4$ моль/л.

Анализ кинетических кривых накопления H_2O_2 с вбрасыванием гиперидина на 40-й минуте развившегося процесса показал, что введение гиперидина приводит к увеличению скорости накопления H_2O_2 , т. е. реакция гидропероксида с гиперидином увеличивает скорость вырожденного разветвления окислительной цепи.

Таким образом, в опытах *in vitro* было установлено, что поведение гиперидина в реакциях радикально-цепного окисления органических соединений определяется его концентрацией: при низких концентрациях он ингибирует окисление модельных субстратов, при высоких – его свойства инвертируются, и он становится инициатором окислительного процесса.

Результаты регрессионного анализа, представленные на рис. 5, показали нелинейную зависимость между содержанием гиперидина и малонового диальдегида в листьях *H. perforatum*.

Содержанию гиперидина $< 0.15\%$ на абсолютно сухое сырье соответствует минимальная концентрация МДА в листьях, повышение концентрации гиперидина $> 0.15\%$ сопровождается возрастанием содержания малонового диальдегида, что согласуется с отмеченным в модельных опытах фактом инверсии антиоксидантных свойств гиперидина при увеличении

его концентрации. Для сравнения на рис. 6 представлена кривая зависимости накопления перекисных продуктов в модельной радикально цепной реакции окисления ИПС от концентрации пигмента.

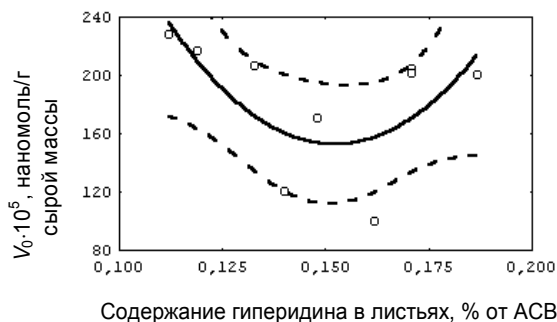


Рис. 5. Зависимость накопления малонового диальдегида от содержания гиперидина в листьях *H. perforatum*

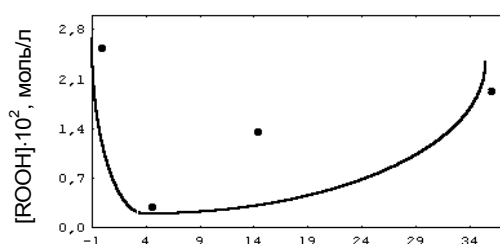


Рис. 6. Зависимость накопления перекисных продуктов окисления изопропанола от концентрации гиперидина [Hyp] в реакционной среде.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что в зависимости от концентрации нафтодиантронового пигмента в среде он может проявлять не только прооксидантные, но и антиоксидантные свойства, по-видимому, за счет способности полициклических хинонов к обратимой фотоагрегации молекул. Заметим, что подобное явление характерно, вероятно, для многих фенольных соединений, в частности для димерного фенольного пигмента - госсипола ⁷. Альтернативная смена свойств с фо-

топротекторных на фотосенсибилизирующие в зависимости от концентрации отмечена также у настойки *H. perforatum* ⁸. Полученные результаты позволяют объяснить результаты фармакологических исследований, проведенных V.Butterweck с соавт. ⁹. В экспериментах на крысах ими была показана инверсия антидепрессантных свойств нафтодиантроновых пигментов при повышении концентрации гиперидина на противоположные. По-видимому, благодаря рассмотренным свойствам гиперидина участвует в регуляции метаболических процессов.

Вариации реакций радикально-цепных реакций окисления органических веществ показаны также при аутоокислении адреналина и в модельных системах, когда отвар из корневища с корнями дягиля лекарственного проявляет себя как антиоксидант, а настой из листьев - как прооксидант ¹⁰.

Полученные результаты, свидетельствуют об объективной невозможности определения общей антиоксидантной активности сложных смесей и растительных объектов в пересчете на гидрофильный аналог α -токоферола - «Тролокс» (TEAC), так как это предлагают Yizhong Cai с соавт. ¹¹. Указанная задача становится практически невыполнимой, если в смеси фенольных соединений присутствуют тритерпеновые соединения, существенно модифицирующие ход реакций окисления, как например в *Glycyrrhiza Korshinskyi Gr.* И связано это, очевидно, с многообразием протекающих радикальных процессов, когда любое фенольное соединение в зависимости от ситуации может вести себя как анти- или прооксидант.

Литература

1. Арабей С.М. Тонкоструктурные спектры флуоресценции и поглощения гиперидина в полимерной матрице при температуре 4.2 К // Журнал прикладной спектроскопии. - 1998. - Т.65, №4. - С.539-545.
2. Ломаченко Н.В., Баширова Р.М. Фармакологические свойства гиперидина (обзор) / Итоги биологических исследований Башкирского университета за 1998 год. - Уфа, 1999. - С.105-108.
3. Жигалова Т.В. Характеристика активности процессов перекисного окисления липидов по образованию малонового диальдегида в растительных тканях / В кн. Малый практикум по физиологии растений. Под ред. А.Т. Мокроносова. - М.: Изд-во МГУ, 1994. - С.13-116.

References

1. Arabey S.M. *Tonkostrukturnyye spektry fluo-restsentsii i pogloshcheniya giperitsina v polimernoy matritse pri temperature 4.2 K* [Fine-structured spectra of fluorescence and absorption of hypericin in the polymer matrix at a temperature of 4.2 K]. *Zhurnal prikladnoy spektroskopii* [Journal of Applied Spectroscopy], 1998, vol.65, no.4, pp.539-545.
2. Lomachenko N.V., Bashirova R.M. *Farmakologicheskiye svoystva giperitsina (obzor)* [Pharmacological properties of hypericin (review)]. *Itogi biologicheskikh issledovaniy Bashkirskogo universiteta za 1998 god* [Results of biological research of the Bashkir University for 1998], Ufa, 1999, pp.105-108.

4. Эмануэль Н.М., Денисов Е.Т., Майзус З.К. Цепные реакции окисления углеводородов в жидкой фазе. – М.: Наука, 1965. – 376 с.
5. Сторожок Н.М., Кутузова И.В. Исследование проявлений антагонизма в совместном антиоксидантном действии β -каротина и витамина А с α -токоферолом // Химико-фармацевтический журнал. – 1995. – №2. – С.37-41.
6. Миненкова Е.А., Барсель В.А., Пичугин В.В. и др. Дозозависимые эффекты комбинаций антиоксидантов разных классов на примере дибунула и бета-каротина // Известия РАН. – 1996. – №2. – С.147-152.
7. Тыщенко А.А., Гусакова С.Д., Назарова И.П., Глушенкова А.И. Фотодинамические эффекты в компонентах семян хлопчатника // Химия природных соединений. – 1987. – №3. – С.354-360.
8. Большакова И.В., Лозовская Е.Л., Сапезинский И.И. Фотосенсибилизирующие и фотопротекторные свойства экстрактов группы лекарственных растений // Биофизика. – 1997. – Т.42, №4. – С.926-931.
9. Butterweck V., Petereit F., Winterhoff H., Nahrstedt A. Solubilized hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity in the forced swimming test // *Planta med.* – 1998. – V.64, №4. – Pp.291-294.
10. Мазнев Н.И. Энциклопедия лекарственных растений. – М.: Мартин, 2004. – С.59-60.
11. Cai Y. et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer // *Life Sciences.* – 2004. – №74. – Pp.2157-2184.
3. Zhigalova T.V. *Kharakteristika aktivnosti protsessov perekisnogo okisleniya lipidov po obrazovaniyu malonovogo dial'degida v rastitel'nykh tkanyakh* [Characteristic of the activity of lipid peroxidation processes on the formation of malonic dialdehyde in plant tissues]. *V kn. Malyy praktikum po fiziologii rasteniy. Pod red. A.T. Mokronosova* [Small Practicum on Plant Physiology. Ed. A.T. Mokronosov]. Moscow State University Publishing House, 1994, pp.113-116.
4. Emanuel' N.M., Denisov Ye.T., Mayzus Z.K. *Tsepnyye reaktsii okisleniya uglevodorodov v zhidkoy faze* [Chain reactions of oxidation of hydrocarbons in the liquid phase]. Moscow, Nauka Publ., 1965, 376 p.
5. Storozhok N.M., Kutuzova I.V. *Issledovaniye proyavleniy antagonizma v sovместном antioksidantnom deystvii β -karotina i vitamina A s α -tokoferolom* [Study of the manifestations of antagonism in the combined antioxidant effect of β -carotene and vitamin A with α -tocopherol]. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal* [Journal of Chemical Pharmaceutics], 1995, no.2, pp.37-41.
6. Minenkova Ye.A., Barsel' V.A., Pichugin V.V. i dr. *Dozozavisimyye efekty kombinatsiy antioksidantov raznykh klassov na primere dibunola i beta-karotina* [Dose-dependent effects of combinations of antioxidants of different classes on the example of dibunol and beta-carotene]. *Izvestiya RAN* [Proceedings of the RAS], 1996, no.2, pp.147-152.
7. Tyshchenko A.A., Gusakova S.D., Nazarova I.P., Glushenkova A.I. *Fotodinamicheskiye efekty v komponentakh semyan khlopchatnika* [Photodynamic effects in the components of cotton seeds]. *Khimiya prirodnykh soyedineniy* [Chemistry of Natural Compounds], 1987, no.3, pp.354-360.
8. Bol'shakova I.V., Lozovskaya Ye.L., Sapozhinskiy I.I. *Fotosensibiliziruyushchiye i fotoprotekturnyye svoystva ekstraktov gruppy lekarstvennykh rasteniy* [Photosensitizing and photoprotective properties of extracts of the group of medicinal plants]. *Biofizika* [Biophysics], 1997, vol.42, no.4, pp.926-931.
9. Butterweck V., Petereit F., Winterhoff H., Nahrstedt A. [Solubilized hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity on the forced swimming test]. *Planta med.*, 1998, vol.64, no.4, pp.291-294.
10. Maznev N.I. *Entsiklopediya lekarstvennykh rasteniy* [Encyclopedia of medicinal plants]. Moscow, Martin Publ., 2004, pp.59-60.
11. Cai Y. et al. [Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 Chinese medicinal plants associated with anticancer]. *Life Sciences*, 2004, no.74, pp.2157-2184.