

# Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-12-52-55  
© Коллектив авторов, 2020

О. В. Семикашева<sup>1,\*</sup>, Л. Р. Якупова<sup>1</sup>, И. М. Борисов<sup>2</sup>, Р. Л. Сафиуллин<sup>1</sup>

## КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА “МЕКСИДОЛ”

<sup>1</sup> Уфимский институт химии — обособленное структурное подразделение ФГБНУ Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, Башкортостан, 450054, Уфа, Пр-т Октября, 69.

факс: (347) 235-6066.

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО “Башкирский государственный педагогический университет имени М. Акмуллы”, Россия, Башкортостан, 450008, Уфа, ул. Октябрьской революции, 3А;

факс: (347) 272-9034.

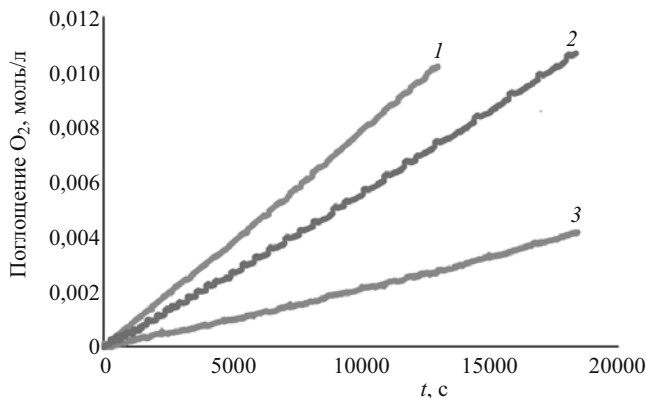
\* e-mail: olesya.semikashewa@yandex.ru

С применением объективного метода проведено количественное измерение антиоксидантной активности лекарственного препарата мексидол. В растворе 1,4-диоксана измерена константа скорости реакции мексидола с пероксильными радикалами 1,4-диоксана. Показано, что препарат является ингибитором окисления 1,4-диоксана, проявляет хорошую антиоксидантную активность, сравнимую с ионолом. Полученные данные представляют интерес для изучения механизма действия антиоксиданта в биологической системе, так как по своим физико-химическим свойствам 1,4-диоксан близок к воде, в среде которой происходят процессы, связанные с окислительным стрессом. Измерение константы скорости реакции ингибитора с пероксильным радикалом имеет также фундаментальное значение для установления взаимосвязи “структура — реакционная способность” с целью прогнозирования антиоксидантной активности соединений.

**Ключевые слова:** радикально-цепное окисление; 1,4-диоксан; мексидол; пероксильный радикал; антиоксидантная активность.

Препарат мексидол является производным 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и янтарной кислоты. 2-Этил-6-метил-3-гидроксипиридин по своей химической структуре может рассматриваться как азотистый гетероциклический аналог ароматических фенолов, проявляет свойства как пиридина, так и фенола. С пероксильным радикалом этилбензола он реагирует с константой скорости  $k_7 = 4,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  [1]. Количественные данные о реакции мексидола, действующим веществом которого является 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат, немногочисленны. В частности, в модельной системе радикально-цепного окисления метилолеата измерена константа скорости реакции мексидола с пероксильным радикалом  $k_7 = 2,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  [2]. Исследования затрудняются тем, что препарат плохо растворяется в субстратах, наиболее распространенных при применении методов количественного определения антиоксидантов. Обычно это — кумол, этилбензол, стирол. Значительное количество антиоксидантов, обрывающих цепь, является водорастворимым, но мало известно об их взаимодействии с пероксильными радикалами из-за ограниченной доступности практических методов исследования. В настоящей работе антиоксидантная активность мексидола изучена в модельной системе контролируемого радикально-цепного окисления 1,4-диоксана, который

одновременно является и растворителем, и субстратом окисления. В нем лекарственное средство растворяется в достаточно широком интервале концентраций. 1,4-Диоксан является оптимальным субстратом для исследования реакции пероксильного радикала с антиоксидантом, так как по ряду физико-химических свойств диоксановые растворы ближе к воде [3], в среде которой происходят процессы, связанные с окислительным стрессом. Следовательно, найденные закономерности будут справедливы и для биологических объектов. Это важно, так как зачастую активные в органических растворителях (кумол, этилбензол, стирол) ингибиторы не проявляют активности в водном растворе [4]. Так для самого активного ингибитора  $\alpha$ -токоферола в растворе метиллинолеата константа скорости его реакции с пероксильным радикалом этого субстрата составила  $1,3 \cdot 10^6 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ , а в водном растворе константа скорости реакции его с этим же пероксильным радикалом снизилась до  $2,3 \cdot 10^4 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  [5]. Изучение свойств водорастворимых антиоксидантов в среде, имитирующей физиологические условия, представляет практический интерес. Достоверное и объективное измерение антиоксидантной активности имеет фундаментальное значение для оценки антиоксидантов. В связи с этим в настоящей работе использован метод, основанный на



**Рис. 1.** Типичные кинетические кривые поглощения кислорода при окислении 1,4-диоксана без ингибитора (1) и в присутствии мексидола:  $7,3 \cdot 10^{-4}$  (2) и  $27,7 \cdot 10^{-4}$  моль/л (3). Условия реакции: [1,4-диоксан] = 9,7 моль/л,  $w_i = 10^{-7}$  моль  $\cdot$  л $^{-1} \cdot$  с $^{-1}$ , 333 К.

модельной реакции радикально-цепного окисления 1,4-диоксана по скорости поглощения кислорода во время ингибированного окисления. Этот метод является наиболее подходящим методом оценки антиоксидантной активности водорастворимых веществ, применяемых в медицинских целях [6].

Кроме практического значения, актуально изучение зависимости эффективности антиоксиданта от его строения и влияния среды.

#### Экспериментальная часть

1,4-Диоксан очищали согласно [7]. 2,2'-Азо-бис-изобутиронитрил (АИБН,  $C_8H_{12}N_4$ ) фирмы "РЕА-ХИМ" дважды перекристаллизовывали из свежеперегнанного этилового спирта, а затем сушили в вакууме. Использовали водный раствор мексидола (2-этил-6-метил-3-гидрокси-пиридина сукцината,  $C_8H_{11}NO$ ) 50 мг/мл в ампулах по 2 мл производства фирмы "Фармасофт". Воду выпаривали, а затем содержимое растворяли в 1,4-диоксане.

Иницированное 2,2'-азо-бис-изобутиронитрилом окисление 1,4-диоксана проводили при температуре 333 К. Окислителем служил кислород воздуха, поглощение которого контролировали при помощи универсальной дифференциальной манометрической установки [8]. Опыты проводили в стеклянном реакторе: загружали 1,4-диоксан (4,4 – 4,95 мл), после термостатирования добавляли раствор инициатора в хлорбензоле (1 мл), через 15 мин после начала окисления вводили мексидол в растворе 1,4-диоксана (0,05 – 0,6 мл). Концентрация ингибитора варьировалась в интервале  $(0,1 - 2,8) \cdot 10^{-3}$  моль/л. Скорость поглощения кислорода в жидкой фазе рассчитывали по методике [8, 9]. Начальную скорость ингибированного окисления определяли по наклону касательной к кривой зависимости количества поглощенного кислорода от времени.

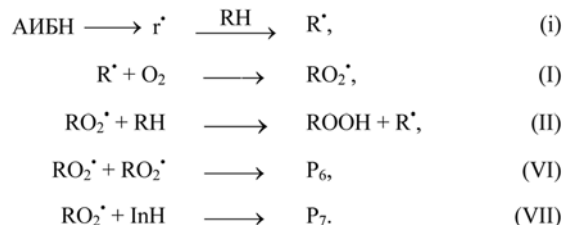
Скорость иницирования рассчитывали по уравнению:  $w_i = k_i [АИБН] = 2ek_p [АИБН]$ . При расчете использовали константу скорости распада АИБН в 1,4-диоксане:  $lgk_p = 15,8 - 132,9/\theta$  [с $^{-1}$ ],  $\theta = 2,303RT \times$

$10^{-3}$  кДж/моль [10]. Использовали следующее значение выхода радикалов в объеме в 1,4-диоксане  $2e = 1$  [11, 12].

#### Результаты и их обсуждение

Жидкофазное ингибированное окисление 1,4-диоксана в условиях нашего эксперимента (333 К,  $w_i = 1,0 \cdot 10^{-7}$  моль  $\cdot$  л $^{-1} \cdot$  с $^{-1}$ , концентрация субстрата 9,7 моль/л) протекает согласно схеме 1 [13].

#### Схема 1



Здесь АИБН — инициатор 2,2'-азо-бис(изобутиронитрил), RH — окисляемый субстрат 1,4-диоксан,  $RO_2^{\bullet}$  — пероксильный радикал, образующийся из 1,4-диоксана,  $P_6$  и  $P_7$  — продукты, неактивные в реакции продолжения цепи, InH — ингибитор (в данном случае "мексидол").

Типичные кинетические кривые поглощения кислорода представлены на рис. 1.

Индукционный период ( $\tau$ ) рассчитывали, обрабатывая кинетические кривые интегральным методом по формуле [14]:

$$\tau = \int_0^{\infty} \left( 1 - \left( \frac{w}{w_0} \right)^2 \right) dt, \quad \text{(1)}$$

где  $w$  — скорость ингибированного окисления,  $w_0$  — скорости неингибированного окисления.

Экспериментальные значения  $\tau$  представлены в таблице.

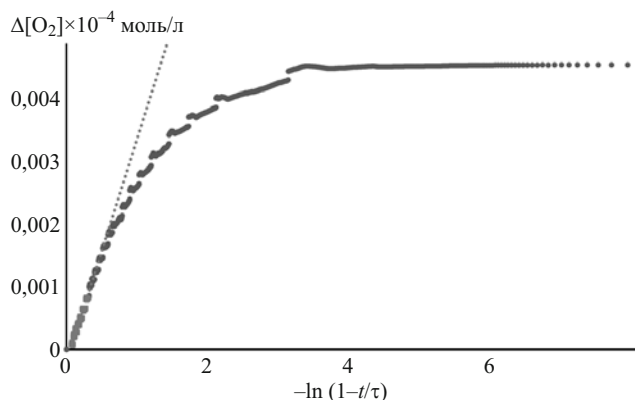
Для расчета константы скорости  $k_7$  применимо уравнение [15, 16]:

$$\Delta[O_2] = -k_2 (k_7)^{-1} [RH] \ln \left( 1 - \frac{t}{\tau} \right), \quad \text{(2)}$$

где  $\Delta[O_2]$  — количество поглощенного кислорода,  $k_2$  — константа скорости продолжения цепи (реакция (II) на схеме),  $k_7$  — константа скорости обрыва цепи окисления на молекулах ингибитора (реакция (VII) на схеме).

В рамках уравнения (2) обрабатывали кинетические зависимости, полученные в опытах, в которых длина цепи в ингибированном окислении составляла не менее  $\sim 3$  звеньев (таблица) [15]. Константу скорости ингибирования рассчитывали по тангенсу угла наклона участка зависимости  $\Delta[O_2]$  от  $\ln(1 - t/\tau)$ , соответствующего  $\sim 80\%$  длины индукционного периода (рис. 2) [11].

Для расчета константы скорости  $k_7$  использовали  $k_2 = 9,48$  л  $\cdot$  моль $^{-1} \cdot$  с $^{-1}$  [7]. В результате статистической обработки полученных результатов было найдено



**Рис. 2.** Обработка кинетической кривой 2 (рис. 1) в координатах уравнения (1). Пунктирная линия продолжает участок зависимости, длина которого не превышает ~ 80 % продолжительности индукционного периода. Константу скорости ингибирования рассчитывали по тангенсу угла наклона этой линии.

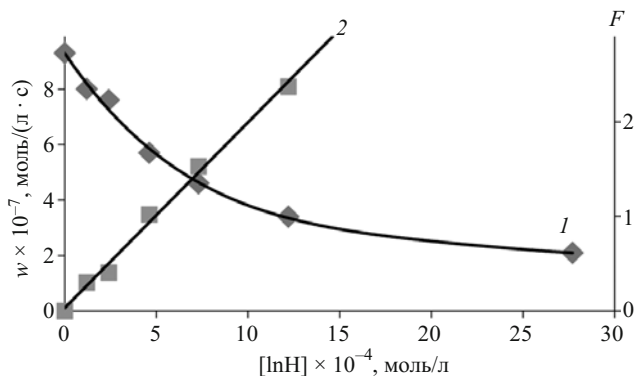
среднее значение константы скорости реакции пероксильного радикала с мексидолом  $k_7^{cp} = 2,92 \cdot 10^4 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ , стандартное отклонение  $1,97 \cdot 10^3 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ . Стандартная ошибка среднего составила  $9,8 \cdot 10^2 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ . В результате был определен доверительный интервал  $k_7^{cp} = 2,92 \cdot 10^4 \pm (1,96 \cdot 9,8 \cdot 10^3) \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1} = (2,9 \pm 0,2) \cdot 10^4 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ .

Для определения эффективной константы скорости  $fk_7$  зависимость начальной скорости окисления 1,4-диоксана от концентрации мексидола обрабатывали в координатах уравнения [16]:

$$F = w_0 w^{-1} - w (w_0)^{-1} = fk_7 [\text{InH}] (2k_6 w_i)^{-0,5}, \quad (3)$$

где  $w_0$  и  $w$  — начальная скорость поглощения кислорода в отсутствие и в присутствии ингибитора соответственно,  $f$  — стехиометрический коэффициент ингибирования,  $[\text{InH}]$  — начальная концентрация мексидола,  $2k_6$  — константа скорости обрыва цепи окисления по реакции рекомбинации пероксильных радикалов 1,4-диоксана (реакция (VI) на схеме 1), в нашем случае  $10^9 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$  [13].

Как видно из рис. 3, наблюдается удовлетворительная линейная зависимость параметра  $F$  от начальной



**Рис. 3.** Зависимость (1) начальной скорости окисления 1,4-диоксана от концентрации мексидола и анаморфоза (2,  $r = 0,99$ ) этой зависимости в координатах уравнения (3). Условия реакции:  $[\text{RH}] = 9,7 \text{ моль/л}$ ,  $w_i = 10^{-7} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ , 333 К.

концентрации мексидола, из тангенса угла наклона которой определена эффективная константа скорости. С учетом 95 % доверительного интервала получено  $fk_7 = (2,1 \pm 0,3) \cdot 10^4 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ . Таким образом, по своей антиоксидантной активности мексидол сравним с ионолом, для которого в этих же условиях  $fk_7 = 2,8 \cdot 10^4 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$  [13].

Стехиометрический коэффициент ингибирования измеряли, опираясь на значение индукционного периода из соотношения:

$$\tau = f[\text{InH}]/w_i. \quad (4)$$

Найдено, что параметр  $f = 1,2 \pm 0,1$  (таблица), согласно этому на молекуле мексидола гибнет один пероксильный радикал.

Как правило, стехиометрический коэффициент ингибирования составляет  $f = 2$  при условии, что кроме реакции (VII) протекает реакция:



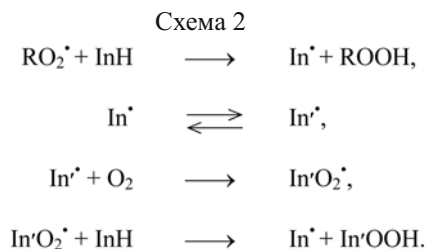
Если параметр  $f \leq 1$ , следовательно, либо: а) образующийся из мексидола радикал является относительно стабильным и реакция (VIII) не протекает; либо б) ингибитор расходуется в побочных реакциях. Так для систем радикально-цепного окисления 1,4-диоксана и этилбензола в присутствии производных 5-амино-6-метилурацила параметр  $f \leq 1$ , и наблюдается расходование  $\text{InH}$  по реакции с пероксильным радикалом самого ингибитора [17]. Отмечалось [2], что окисление 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сопровождается образованием достаточно активных радикалов, следовательно, нельзя исключить возможность его реакции с пероксильным радикалом (VIII). В то же время для гидроксиимидинов характерно образование таутомерных форм. Возможно, что образующийся из ингибитора радикал ( $\text{In}^*$ ) может находиться в равновесии со своей углеродцентрированной формой ( $\text{In}^*$ ). В присутствии кислорода образуется новый пероксильный радикал ( $\text{In}^* \text{O}_2^*$ ), который может отрывать атом водорода от молекулы ингибитора. В результате появляется дополнительный канал расходования ингибито-

**Зависимость скорости окисления 1,4-диоксана ( $w$ ) и индукционного периода ( $\tau$ ) от концентрации мексидола. Условия реакции:  $[\text{RH}] = 9,7 \text{ моль/л}$ ,  $w_i = 10^{-7} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ , 333 К**

$[\text{InH}] \cdot 10^{-4}$ , моль/л	$w \cdot 10^7$ , моль · л <sup>-1</sup> · с <sup>-1</sup>	$\tau$ , с	$k_7 \cdot 10^{-4}$ *, л · моль <sup>-1</sup> · с <sup>-1</sup>	$f$ **
0	9,3	—	—	—
1,2	8,0	2400	—	1,5
2,4	7,6	4550	3,7	1,3
4,6	5,7	6262	3,1	1,1
7,3	4,6	9527	2,5	1,1
12,2	3,4	13200	2,4	1,1
27,7	2,1	—	—	—

\* Константу  $k_7$  рассчитывали по уравнению (2).

\*\* Коэффициент ингибирования  $f$  определяли с использованием уравнения (4).



ра, что приводит к снижению параметра  $f$ . Процесс может быть выражен схемой 2, доказанной ранее для аминорауцила [17].

Отсюда следует, что при достаточно высокой концентрации мексидол вместо антиоксидантных свойств может проявлять прооксидантную активность, что следует учитывать при его применении. В то же время это свойство присуще также и  $\alpha$ -токоферолу [18]. Причина в том, что пероксильные радикалы играют и положительную роль в жизнедеятельности организма [19]. Если их концентрация становится ниже необходимого уровня, токоферол проявляет прооксидантные свойства. При заболеваниях концентрация пероксильных радикалов превышает предельно допустимую норму. Результатом этого и является окислительный стресс. Тогда антиоксидантные свойства токоферола выходят на первый план.

В печати появились сообщения о том, что “ни сам мексидол, ни его дженерики доказательств эффективности не имеют” [20]. В настоящей работе применен метод измерения антиоксидантной активности, который хорошо зарекомендовал себя в зарубежной практике [6, 18, 21]. Для изучения действия водорастворимых антиоксидантов применяется этот метод, основанный на радикально-цепном окислении тетрагидрофурана — соединения, родственного 1,4-диоксану [22]. Проведенное нами исследование убедительно показывает, что мексидол является эффективным антиоксидантом. Он применим при таких заболеваниях, при которых образуется избыточное количество пероксильных радикалов. По своей силе не уступает иону.

Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ УФИХ УФИЦ РАН по

теме “Кинетические закономерности и механизмы реакций с участием нитрозооксидов и пероксильных радикалов” АААА-А20-120012090019-1.

## ЛИТЕРАТУРА

1. И. Ф. Русина, О. Н. Карпунин, О. Т. Касаикина, *Хим. физика*, **32**(8), 49 – 64 (2013).
2. М. Г. Перевозкина, *Хим.-фарм. журн.*, **40**(8), 35 – 40 (2006).
3. Н. Р. Соколова, Е. В. Никитина, Л. Б. Кочетова и др., *Буллеров. сообщ.*, **29**(1), 7 – 14 (2012).
4. В. Н. Ушкалова, Л. А. Журавлева, *Хим.-фарм. журн.*, **40**(11), 11 – 14 (2006).
5. В. А. Рогинский, *Биол. мембраны*, **7**(3), 297 – 305 (1990).
6. R. Amorati and A. Baschieri, and L. Valgimigli, *J. Chem.*, 1 – 12 (2017).
7. Л. Р. Якупова, А. В. Иванова, Р. Л. Сафиуллин и др., *Изв. АН. Сер. хим.*, № 3, 507 – 511 (2010).
8. Л. Р. Якупова, С. Г. Проскураков, Р. Л. Сафиуллин и др., *Буллеров. сообщ.*, **28**(19), 71 – 78 (2011).
9. Р. Н. Зарипов, Р. Л. Сафиуллин, В. Д. Комиссаров и др., *Кинетика и катализ*, **31**(5), 1086 – 1091 (1990).
10. A. F. Moroni, *Makromol. Chem.*, **105**(6), 43 – 48 (1967).
11. G. Henrici-Olive and S. Olive, *Makromol. Chem.*, **58**(1), 188 – 194 (1962).
12. Е. Т. Денисов, *Константы Скорости гомолитической жидкофазных реакции*, Наука, Москва (1971), сс. 51 – 64.
13. Л. Р. Якупова, В. Р. Хайруллина, Р. Л. Сафиуллин и др., *Кинетика и катализ*, **49**(3), 387 – 391 (2008).
14. D. Loshadkin and V. Roginsky, and E. Pliss, *J. Chem. Kinet.*, **34**(3), 162 (2002).
15. В. Ф. Цепалов, *Исследование синтетических и природных антиоксидантов in vitro и in vivo*, Сб. науч. статей, Наука, Москва (1992), с. 16.
16. Е. Т. Денисов, В. В. Азатян, *Ингибирование ценных реакций*, Черноголовка (1997), сс. 65, 68.
17. Р. А. Насибуллина, Л. Р. Якупова, Р. Л. Сафиуллин, *Кинетика и катализ*, **57**(6), 767 – 776 (2016).
18. K. U. Ingold and D. A. Pratt, *Chem. Rev.*, **114**(18), 9022 – 9046 (2014).
19. Е. С. Северин (ред.), *Биохимия*, ГЭОТАР-Медиа, Москва (2008), с. 419.
20. “[https://journal.tinkoff.ru/list/medicines-analogues/?utm\\_campaign=arbitr-pulse&utm\\_referrer=https%3A%2F%2Fpulse.mail.ru&utm\\_source=pulse\\_mail\\_ru#meksidol](https://journal.tinkoff.ru/list/medicines-analogues/?utm_campaign=arbitr-pulse&utm_referrer=https%3A%2F%2Fpulse.mail.ru&utm_source=pulse_mail_ru#meksidol)”.
21. E. Niki, *Free Rad. Biol. Med.*, **49**(4), 503 – 515 (2010).
22. R. Amorati, A. Baschieri, G. Morroni, et al., *Chem. Eur. J.*, **22**(23), 7924 – 7934 (2016).

Поступила 02.10.20

## QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF MEXIDOL

O. V. Semikashewa<sup>1,\*</sup>, L. R. Yakupova<sup>1</sup>, I. M. Borisov<sup>2</sup>, and R. L. Safiullin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ufa Institute of Chemistry, Ufa Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Bashkortostan, 450054 Russia

<sup>2</sup> M. Akmulla Bashkir State Pedagogical University, Ufa, Bashkortostan, 450008 Russia

\* e-mail: olesya.semikashewa@yandex.ru

Using a correct and unbiased method, a quantitative measurement of the antioxidant activity of drug Mexidol was carried out. The rate constant of the reaction of Mexidol with peroxy radicals of 1,4-dioxane was measured in a 1,4-dioxane solution. Mexidol was found to act as inhibitor of 1,4-dioxane oxidation and showed good antioxidant activity comparable to that of ionol. The obtained data are of interest for studying the mechanism of antioxidant action of in biological systems, since 1,4-dioxane in its physicochemical properties is close to water, in which processes associated with oxidative stress occur. Measurement of the rate constant of the reaction of inhibitor with peroxy radical is also of fundamental importance for establishing the structure – reactivity relationship in order to predict the antioxidant activity of compounds.

**Keywords:** radical chain oxidation; 1,4-dioxane; Mexidol; peroxy radical; antioxidant activity.