

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля

Российской академии наук

На правах рукописи

Маракулина Ксения Михайловна

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРИРОДНЫХ ФОСФОЛИПИДОВ С
АНТИОКСИДАНТАМИ НОВОГО КЛАССА –
ИЗОБОРНИЛФЕНОЛАМИ**

специальность 02.00.04 – физическая химия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата

химических наук

Научный руководитель:

Доктор химических наук, профессор

Шишкина Л.Н.

Москва – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Глава 1. Литературный обзор	
1.1 Изоборнилфенолы – новый класс антиоксидантов	11
1.2 Физико-химические свойства фосфолипидов	21
Глава 2. Материалы и методы	
2.1 Объекты исследования	33
2.2. Определение фракционного состава фосфолипидов методом тонкослойной хроматографии	35
2.3 Методика йодометрического определения содержания пероксидов в липидах и/или антипероксидной активности липидов	37
2.4 Определение содержания диеновых конъюгатов и кетодиенов в препаратах фосфолипидов	38
2.5 Определение стехиометрии компонентов в комплексах фосфолипидов с фенольными антиоксидантами	38
2.6 Выявление природы связей, участвующих в комплексообразовании	39
2.7 Определение размера мицелл фосфолипидов в присутствии и отсутствии добавок антиоксидантов	40
2.8 Статистическая обработка результатов	42
Результаты и их обсуждение	
Глава 3. Физико-химические свойств природных фосфолипидов	44
3.1 Фракционный состав исследованных фосфолипидов	44
3.2 Анализ УФ-спектров фосфолипидов	48
3.3 Анализ ИК-спектров фосфолипидов: зависимость	

показателей от концентрации, времени экспозиции растворов и полярности растворителя	53
3.4 Способность к самоорганизации препаратов природных фосфолипидов в различных растворителях	59
Глава 4. Физико-химические характеристики фенольных антиоксидантов	63
4.1 Анализ УФ-спектров	64
4.2 Анализ ИК-спектров	72
Глава 5. Физико-химические характеристики комплексов фенольных антиоксидантов с природными фосфолипидами	79
5.1 Взаимодействие лецитина с антиоксидантами	79
5.2 Взаимодействие сфингомиелина с антиоксидантами	88
5.3 Взаимодействие фосфатидилэтаноламина с антиоксидантами	94
Заключение	96
Выводы	106
Список сокращений	108
Список литературы	109

ВВЕДЕНИЕ

Необходимость создания научных основ стабилизации пищевых жиров в процессе их переработки и хранения стимулировала детальное изучение механизма окислительных процессов в системах разной степени сложности. Начало приоритетных исследований процессов окисления жиров и липидов было положено работами, выполненными еще в 50-х – 60-х годах прошлого столетия сотрудниками школы академика Н.М. Эмануэля в ИХФ АН СССР и профессора Б.Н. Тарусова в МГУ [Эмануэль, Лясковская, 1961; Тарусов, 1954]. В настоящее время эти исследования активно продолжаются и в нашей стране, и за рубежом, поскольку была экспериментально установлена общность механизма окислительных процессов в системах *in vitro* и *in vivo* [Владимиров, Арчаков, 1972; Бурлакова, 1975; Frankel 1980, 1984, 1987; Бурлакова, Храпова, 1985] и подтверждена правомочность гипотезы академика Н.М. Эмануэля о возможности использования нетоксичных синтетических антиоксидантов (АО) для предотвращения развития ряда патологий [Бурлакова и др., 1975; Обухова, Эмануэль, 1983]. Наличие широкого спектра биологической активности у АО сейчас является общепризнанным фактом.

Большой массив работ посвящен выявлению взаимосвязей антиоксидантных (АО) свойств различных природных и синтетических веществ и их химической структурой и физико-химическими характеристиками, ингибирующей эффективностью этих соединений при введении в организм. Наконец начался направленный синтез веществ с предполагаемыми АО свойствами и физико-химическими характеристиками. АО очень условно делят на природные и синтетические. У каждой группы имеется ряд достоинств и недостатков, к которым можно отнести уменьшение ингибирующей эффективности у антиоксидантов природного происхождения за счет участия в различных побочных реакциях и выраженную токсичность многих синтетических препаратов, поскольку их

структуры достаточно далеки от структур метаболитов организмов. Поэтому в настоящее время ведется поиск АО, которые бы аккумулировали в своих свойствах положительные характеристики и природных, и синтетических АО. Одним из перспективных в этой области исследований является создание нового класса полусинтетических АО – изоборнилфенолов (ИБФ), которые синтезированы на основе зелени хвойных и представляют собой замещенные фенолы, содержащие в качестве алкильного заместителя изоборнильные группы [Чукичева, Кучин, 2004]. К началу наших исследований было показано, что некоторые ИБФ являются стабилизаторами эластомерных композиций [Новаков и др., 2006], проявляют противомикробную [Cirri M., et al. 2007] противосвертывающую и нейропротекторную активности [Плотников и др., 2008, 2009; Окуневич, Сапронов, 2004]. Однако, данные о физико-химических характеристиках ИБФ, влиянии природы заместителей на их способность взаимодействовать с одними из основных компонентов биологических мембран – фосфолипидами (ФЛ) отсутствовали, в то время как для ряда природных и синтетических фенольных АО обнаружено явление комплексообразования их с ФЛ [Бурлакова и др., 1995; Xu et al., 2009; Шарафутдинова и др., 2008], что существенно модифицирует ингибирующую эффективность АО [Ishikawa et al., 1984; Бурлакова и др., 1995; Мазалецкая и др., 2008; Mazaletskaia et al., 2010; Patel, 2001; Ramadan M. F., 2008]. Необходимо отметить также, что универсальных методов оценки АО активности любых биологически активных веществ (БАВ) не выявлено даже в системах *in vitro* [Бурлакова и др., 1975; Huang et al., 2005; Tabart et al., 2009; Niki, 1987, 2010; Takebayashi et al., 2010]. Это требует комплексного изучения физико-химических характеристик БАВ с использованием различных методов, тем более, что в настоящее время показано, что биологическая активность большинства соединений обусловлена как их способностью влиять на регуляцию

процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), так и воздействовать на структурное состояние клеточных мембран [Бурлакова, 2005].

Актуальность детального изучения свойств ИБФ в различных системах связана и с тем обстоятельством, что их синтез осуществляется с использованием природных монотерпенов, получаемых из отходов лесопромышленного комплекса, что представляет не только фундаментальный интерес, но и практическое значение для экологии.

В связи с вышеизложенным **целью** настоящей работы было изучение механизма взаимодействия изоборнилфенолов и природных фосфолипидов в модельных химических системах и разработка адекватной модели для первичного отбора перспективных БАВ для дальнейшего исследования в более сложных биологических системах.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить физико-химические характеристики природных фосфолипидов методами УФ- и ИК-спектроскопии, динамического светорассеяния в зависимости от полярности среды;
2. Исследовать физико-химические характеристики изоборнилфенолов методами УФ-, ИК-спектроскопии в зависимости от их структуры;
3. Исследовать комплексообразования ИБФ с природными фосфолипидами и изучить роль природы фосфолипида в механизме образования комплексов
4. Исследовать влияние наличия, положения и природы заместителя в местах прямого сопряжения с гидроксильной группой фенолов на параметры комплексообразования с природными фосфолипидами;
5. Разработать модель для оценки поверхностно-активных свойств соединений для первичного отбора наиболее перспективных для практического использования.

Положения, выносимые на защиту:

1. Наличие явления комплексообразования между молекулами фосфолипидов и полусинтетических антиоксидантов – изоборнилфенолов, зависимость масштаба и направленности эффектов взаимодействия как от структуры изоборнилфенолов, так и от природы фосфолипидов.

2. Взаимодействие между молекулами фосфолипидов и изоборнилфенолов осуществляется через полярные группировки: свободные и связанные гидроксильные группы фосфолипидов и изоборнилфенолов, сложноэфирные, амидные и холиновые группировки фосфолипидов.

3. Образование молекулярных комплексов между молекулами изоборнилфенолов и природных фосфолипидов является одной из причин проявления ИБФ цитотоксических и/или мембранопротекторных свойств в биологических модельных системах *in vitro* и *in vivo*.

4. Модель мицеллообразования лецитина в неполярном растворителе является адекватной для первичной оценки и отбора наиболее перспективных соединений для дальнейших испытаний в более сложных системах.

Научная новизна. Впервые детально исследованы физико-химические характеристики соединений ряда изоборнилфенолов методами ИК- и УФ-спектроскопии в растворителях с различным дипольным моментом и доказано явление комплексообразования между молекулами ИБФ и природными фосфолипидами. Показано, что знаки и масштабы комплексообразования ИБФ с ФЛ зависят не только от структуры исходного фенольного АО, но и от природы ФЛ.

Впервые показана способность изоборнилфенолов влиять на мицеллообразование природных фосфолипидов в неполярном растворителе – гексане. Самые сильные изменения параметров мицеллообразования в присутствии ИБФ зафиксированы для их смесей с лецитином. Обнаружено уменьшение размеров агрегатов ЛС в 24,8-29 раз в присутствии ИБФ, в

молекулах которых свободно одно *орто*-положение и в 15,4 раза в присутствии ИБФ, в молекуле которого одно из *орто*-положений занято CH_3 -группой.

Показано, что увеличение количества и электронодонорной способности заместителей, находящихся в местах прямого сопряжения с гидроксильной группой, приводит к батохромному сдвигу всех полос поглощения в УФ-диапазоне при одновременном увеличении их интенсивности. В ИК-спектрах всех ИБФ были обнаружены полосы валентных колебаний ОН-группы в диапазоне частот, характерных для пространственно незатрудненных фенолов.

Максимальные изменения УФ-спектров смесей ИБФ и ФЛ относительно суммарного спектра в области длин волн 275 нм выявлены для смесей ИБФ со сфингомиелином, достоверно превышающие аналогичный показатель для смесей ИБФ с лецитином и кефалином.

Практическая значимость. Адаптирован метод Остромысленского-Жоба для определения соотношения компонентов в бесцветных молекулярных комплексах ИБФ с природными ФЛ. Показано, что модель самоорганизации лецитина в гексане в исследованном диапазоне концентраций является адекватной для первичного отбора наиболее перспективных соединений для дальнейших исследований в более сложных биологических модельных системах, что представляет интерес для практической медицины. Синтез ИБФ на основе камфена, выделенного из экстрактов отходов лесопромышленного комплекса, способствует частичному решению проблемы ее утилизации.

Вклад автора. Личный вклад диссертанта состоял в проведении физико-химических исследований, обработке и анализе полученных данных, формулировании положений и выводов, а также в подготовке статей к опубликованию. Все представленные в работе данные получены автором

лично или при его непосредственном участии в подготовке и проведении эксперимента.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на следующих конференциях и симпозиумах: VIII Всерос. конф. с междунар. участием «Химия и медицина» (г. Уфа, 2010), VIII и IX междунар. конф. Биоантиоксидант (г. Москва 2010, 2015), XXVIII Всерос. школе-симпозиуме молодых ученых по кинетике (Московская область, 2010), X, XI, XII междунар. молодежных конф. ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика» (г. Москва, 2010, 2011, 2012), Всерос. рабочей химической конф. «Бутлеровское наследие-2011» (г. Казань, 2011), XVIII, XIX Междунар. конф. студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (г. Москва, 2011, 2012), I Всерос. симпозиуме по поверхностно-активным веществам с междунар. участием «От коллоидных систем к нанохимии» (г. Казань, 2011), Междунар. конф. "Возобновляемые лесные и растительные ресурсы: химия, технология, фармакология, медицина" (г. Санкт-Петербург, 2011), VII, VIII, IX Всерос. научной конференции с международным участием «Химия и технология растительных веществ» (г. Сыктывкар, 2011 г.; г. Калининград, 2013 г., г. Москва, 2015 г.), Ist «International symposium on secondary metabolites: chemical, biological and biotechnological properties» (Denizli, 2011), Всероссийской молодежной конференции «Успехи химической физики» (г. Черноголовка, 2011), 161 Faraday discussion «Lipids and Membrane Biophysics» (London, 2012), IV Съезде биофизиков России (г. Нижний Новгород, 2012), VIII международном симпозиуме «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (г. Москва, 2012), отчетные конф. Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (г. Москва, 2012, 2013 гг.) IV международной конференции по коллоидной химии и физико-химической механике (г. Москва, 2013), Международной междисциплинарной научно-практической конференции «Biological Active Substances and Materials:

fundamental and applied problems» (г. Судак, 2011, 2013), Всероссийской научной конференции «Химия и фармакология растительных веществ» (г. Сыктывкар, 2014).

Публикации результатов исследований. По результатам исследований опубликовано 35 работ из них: 6 статей в журналах, входящих в Перечень ВАК, 2 статьи в зарубежном журнале, 1 глава в коллективной монографии (Россия), 5 статьи в сборниках трудов конференций, имеющих индекс ISBN и тезисы докладов 21-й научной конференции.

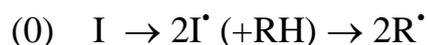
Работа выполнена в соответствии с планами научно-исследовательских работ ИБХФ РАН и поддержана Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки - медицине» (2012 – 2014 гг.)

Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

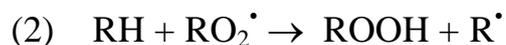
§ 1.1. Изоборнилфенолы – новый класс антиоксидантов

В настоящее время роль свободнорадикальных реакций как в процессах автоокисления пищевых, технических и косметических жиров и масел, так и в регуляции клеточного метаболизма не вызывает сомнения. В связи с этим особое внимания уделяется способам контроля за интенсивностью окислительных процессов в системах различной степени сложности: стабилизация полимеров, сохранение свойств продуктов питания и липидсодержащих медикаментов, поддержание стационарности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в биологических мембранах [Burton et al., 1989, 1998; Denisov, Afanas'ev, 2005; Козлов и др., 1972; Бурлакова и др., 1975; Владимиров, Арчаков, 1972; Владимиров, 1987; Панорама, 2005 а, б; Zhou et al., 2004; Chen, Deuster, 2009]. Эффективными регуляторами окислительных процессов являются природные и синтетические АО. Многочисленные исследования сотрудников школы академика Н.М. Эмануэля показали, что принципиальная кинетическая схема неингибированного окисления органических веществ в жидкой фазе состоит из следующих стадий:

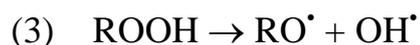
I Зарождение цепи



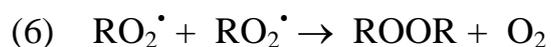
II Продолжение цепи



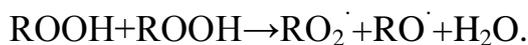
III Разветвление цепи



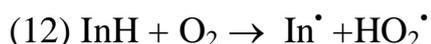
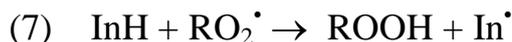
IV Обрыв цепи



Позднее было показано, что в реакциях низкотемпературного автоокисления реакция вырожденного разветвления является бимолекулярной [Хрустова, Шишкина, 2004]:



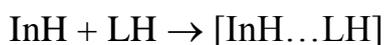
При введении в систему антиоксидантов-ингибиторов (InH) в схеме окисления появляется ряд новых элементарных стадий:



Как известно, в организме одними из основных субстратов окисления являются ненасыщенные жирные кислоты липидов [Владимиров, Арчаков, 1972 г.; Бурлакова, 1975], поэтому схема окислительных процессов в сложных многокомпонентных системах была дополнена следующими элементарными стадиями:



Комплексообразование



Эти схемы окислительных процессов основываются на экспериментальных данных и отражают способность липидов участвовать в образовании радикалов (7', 8', 9'), продолжении цепи (12'), влиять на разложение гидропероксидов на молекулярные продукты, т.е. обладать антипероксидной активностью (АПА) (11'), и образовывать комплексы с АО или их радикалами [Эмануэль, Лясковская, 1961; Barclay et al., 1980, 1983, 1984, 2003; Burton et al., 1989; Denisov, Afanas'ev, 2005; Dwiecki et al., 2009; Foti, Ruberto, 2001; Frankel, 1980, 1987; Hudson, Chavan, 1984; Leopoldini et al., 2004, a, b; Mahoney et al., 1967; Бурлакова и др., 1975, 1992, 1998, 1995, 1990; Денисов, Азатян, 1996; Дмитриев, Верховский, 1990; Денисов, Эмануэль, 1973; Золотова и др., 1975; Ингольд, 1974; Касаикина и др., 1997; Мазалецкая и др., 2008, 2010 а, б, 2012; Mazaletskaya et al., 2012; Панорама современной химии России, 2005 а, б; Рогинский 1988, 1990 а, б; Хрустова, Шишкина, 2004; Шишкина, 2003; Бурлакова, Храпова, 1985; Храпова, 2005; Emanuel et al., 1984, Меньшов и др., 1993].

Таким образом, АО активностью обладают:

- Соединения, способные взаимодействовать со свободными радикалами, то есть соединения, обладающие антирадикальной активностью (токоферолы, экранированные фенолы и др.);
- Соединения, разрушающие пероксиды до молекулярных продуктов, то есть соединения, обладающие АПА (NH₂- и SH-содержащие соединения, природные АО и др.);
- Соединения, способные образовывать комплекс с окисляющимся агентом и/или его радикалом, а также с инициатором окисления, среди которых ионы металлов переменной валентности;
- Тушители – вещества, инактивирующие активные формы кислорода, например синглетный кислород (каротиноиды и др.).

Ингибирующую активность АО принято характеризовать при помощи констант скорости соответствующих элементарных реакций. Так, об антирадикальной активности соединения судят по величине константы скорости реакции 7 (k_7), а антипероксидную активность оценивают либо по величине константы скорости разложения гидропероксидов на молекулярные продукты под действием АО (k_{II}), либо по разности концентраций пероксидов в окисленном метилолеате до и после внесения АО, отнесенной к 1 г соединения [Меньшов и др., 1994].

В литературе к АО нередко относят вещества, которые снижают интенсивность ПОЛ только в системах *in vivo*. Однако АО активность таких соединений может быть обусловлена их воздействием на другие звенья физико-химической системы регуляции ПОЛ в тканях организма, в том числе влиянием на активность ферментов АО защиты [Бурлакова и др., 1975; Бурлакова, Храпова, 1985; Храпова, 2005; Шишкина и др., 2012; Шишкина, Козлов, 2015]. Поэтому такие соединения принято называть модуляторами систем АО защиты организма.

Наибольшее применение в медицине и пищевой промышленности нашли фенольные АО и пиррофеофорбиды с различными металлами в координационном центре, ввиду их более низкой токсичности для организмов [Ершов др., 1972; Эмануэль, Лясковская, 1961]. Однако, хорошо известно, что ингибирующая активность биологически активных веществ (БАВ) зависит не только от их структуры, физико-химических характеристик и концентрации, но также и от типа выбранной тест-системы [Бурлакова и др., 1975; Исследование природных и синтетических АО, 1992; Huang et al., 2005; Niki, 2010; Tabart, 2009].

В настоящее время все более широкое распространение получают полусинтетические АО, сочетающие в своей структуре и природные, и синтетические группировки, что зачастую позволяет при сохранении АО свойств сделать такие соединения менее токсичными для организма.

Среди перспективных полусинтетических АО рассматриваются замещенные фенолы, содержащие в качестве алкильного заместителя одну или несколько изоборнильных групп, так называемые терпенофенолы или изоборнилфенолы (ИБФ). Широкий спектр препаратов данного ряда активно синтезируется сотрудниками ФГБУН Института химии Коми НЦ УрО РАН под руководством член-корреспондента РАН А.В. Кучина.

В соответствии с их химической структурой (рис. 2.2), данные соединения могут быть отнесены к АО класса пространственно затрудненных фенолов, поскольку в *орто*-положении относительно гидроксильной группы имеется достаточно объемный изоборнильный заместитель, который, помимо электронодонорной способности по отношению к гидроксильной группе, является еще и группировкой, способной экранировать ОН-группу.

Одними из основных потребителей синтетических и полусинтетических АО являются такие области промышленности как производства полимерных материалов и резинотехнических композиций [Новаков и др., 2012-а]. Некоторые соединения ряда ИБФ и их диалкиламидных производных были изучены в качестве возможных стабилизирующих добавок при производстве поливинилхлоридных композиций. Так в работе Новакова и др. [Новаков и др., 2012-б] показано, что введение ТФ-7 и 2-изоборнил-6-метил-4-диметиламинометилфенола резко ингибирует процесс накопления гидропероксидов в условиях автоокисления пластификатора – диалкилфталата кислородом воздуха. Кроме того, соединения ряда ИБФ были изучены как стабилизаторы эластомеров наряду с широко используемыми Диафеном ФП (N'-фенил-N'-изопропил-*n*-фенилендиамин), Нафтамом-2 (фенил-β-нафтиламин) и противостарителем класса фенольных АО – ионолом (4-метил-2,6-дитретбутилфенол, ВНТ). Причина поиска альтернативных антистарителей заключается в том, что Нафтам-2 – канцерогенен, а Диафен улетучивается в

процессе эксплуатации. В качестве параметров действия ИБФ как антистарителей был исследован показатель перепада вязкости (уменьшение разницы вязкости до и после ускоренного старения), который соответствует увеличению стабильности каучука [Новаков и др, 2010]. Было показано, что исследуемые фенолы образуют следующую последовательность по уменьшению показателя перепада вязкости: ВНТ>ТФ-7 \geq ТФ-8>ТФ-6, т.е. наименьшим показателем перепада вязкости характеризуются смеси полимера с ТФ-6. Таким образом, можно сделать вывод, что в данной модели среди исследованных соединений лучше работают менее экранированные фенолы. Температура начала распада образцов и максимальной скорости в присутствии и отсутствии (контроль) добавок ВНТ, ТФ-6, ТФ-7 и ТФ-8 также смещается до 289 ± 2 °С, что выше данного показателя в контроле на 49 ± 2 °С и в смеси с ионолом – на 24 ± 2 °С. По уменьшению температуры максимальной скорости распада каучука исследованные фенолы образуют следующую последовательность: ТФ-7>ТФ-6 \geq ВНТ>ТФ-8. И в данном случае добавка ТФ-8, молекула которого, как и в случае ТФ-6, содержит один изоборнильный заместитель в *орто*-положении, не дает изменений показателя по сравнению с контролем. В целом, авторы делают вывод о том, что ТФ-7 оказался более эффективным стабилизатором каучука в процессе его термоокислительной деструкции, что свидетельствует в пользу использования его в полимерной промышленности [Новаков и др., 2006-а, б, 2010, 2012-а, б].

Соединения ряда ИБФ были исследованы также в модели торможения полимеризации в жидких продуктах пиролиза [Гоготов и др. 2011-а, б]. Показано, что по уменьшению способности тормозить радикальную полимеризацию ИБФ и ВНТ формируют следующий ряд:

ТФ-7 (66%)>ВНТ (30%)>ТФ-6 (28%)>ТФ-5 (16%).

Таким образом, ингибирующая эффективность изученных ИБФ и ВНТ зависит от двух структурных факторов: во-первых, от степени экранирования

гидроксильной группы; во-вторых, от электронодонорной способности заместителей в *орто*- и *пара*-положениях относительно ОН-группы, поскольку повышение электронодонорности не только делает атом водорода гидроксильной группы более кислым, но и увеличивает активность образующегося радикала.

В последние годы проведены комплексные исследования реакционной способности терпенофенолов в различных системах. Так в работах Л.И. Мазалецкой и др. [Мазалецкая и др., 2011, 2012 а-в, 2013-а, б] были определены константы скорости взаимодействия ИБФ, содержащих различные заместители в бензольном кольце, с пероксирадикалами в реакции инициированного окисления этилбензола, измерены начальные скорости расходования ДФПГ в реакции с терпенофенолами в зависимости от полярности среды и исследовано влияние субстрата окисления лецитина на ингибирующую эффективность ИБФ при инициированном окислении этилбензола и метилолеата и автоокислении метилолеата. Было установлено, что природа радикала оказывает существенное влияние как на абсолютную, так и относительную антирадикальную активность терпенофенолов, различающихся составом и природой заместителей.

По увеличению начальной скорости взаимодействия ИБФ с ДФПГ фенолы располагаются в ряд: ТФ-6 < ТФ-1 < ТФ-5 < ТФ-7 [Мазалецкая Л.И. и др., 2012-а] Аналогичные результаты были получены в работе [Плотников и др., 2010], в которой было показано, что по уменьшению оптической плотности раствора ДФПГ в процентах от исходной оптической плотности через 30 минут после добавления фенолов соединения формируют следующую последовательность начала реакции: ТФ-6 (94,3%) > ТФ-5 (51,0%) > ВНТ (48,9%) > ТФ-8 (24,4) > ТФ-7 (15,3). Через час после реакции с ДФПГ ТФ-6 связал лишь 7,9% его начального количества, тогда как введение дополнительной метильной группировки в структуру ТФ-5 привело к 58,2% расходования ДФПГ, с ВНТ восстанавливалось уже 67%, с ТФ-8 – 71,8%, а с

ТФ-7 – 88,9%. Таким образом, наиболее высокой антирадикальной активностью в данной модельной системе проявляет ТФ-7. Необходимо отметить, что данные по ингибированию полимеризации пиролизных производных согласуются с результатами активности ИБФ и ВНТ со стабильным окрашенным радикалом ДФПГ. Это позволяет сделать вывод, что основное влияние ИБФ на полимеризационные процессы жидких пироконденсатов заключается в деактивации свободных радикалов.

Однако, по увеличению значения k_7 (константа скорости взаимодействия АО с пероксирадикалом этилбензола) данные соединения образуют несколько иную последовательность [Мазалецкая и др., 2011]: ТФ-1 ($0,4 \times 10^4$ моль·л⁻¹·с⁻¹) < ВНТ ($2,2 \times 10^4$ моль·л⁻¹·с⁻¹) < ТФ-6 ($2,5 \times 10^4$ моль·л⁻¹·с⁻¹) < ТФ-8 ($5,0 \times 10^4$ моль·л⁻¹·с⁻¹) < ТФ-5 ($6,3 \times 10^4$ моль·л⁻¹·с⁻¹) < ТФ-7 ($11,5 \times 10^4$ моль·л⁻¹·с⁻¹). При этом замена изоборнильного заместителя (ТФ-6) на изоборнилоксильный (ТФ-1) приводит к снижению константы скорости в 6,25 раз, обусловленному образованием внутримолекулярной водородной связи в молекуле ТФ-1, что авторы подтвердили методом ИК-спектроскопии. Введение дополнительной электронодонорной группировки в положение прямого сопряжения с ОН-группой (сравнение ТФ-6 и ТФ-8) приводит к увеличению значения k_7 в два раза, в то время как положение метильной группы существенной роли не играет (сравнение ТФ-5 и ТФ-8), что следует из незначительного увеличения константы скорости взаимодействия ТФ-5 с пероксидными радикалами по сравнению с ТФ-8. Замена двух *tert*-бутильных радикалов на изоборнильные (сравнение ВНТ и ТФ-7) приводит к резкому увеличению константы скорости в 5,6 раза, что еще раз показывает преимущества ТФ-7 как АО перед другими соединениями этого ряда. Однако, несмотря на наличие очень объемных заместителей в обоих *орто*-положениях, ТФ-7 не является истинным представителем класса пространственно затрудненных фенолов. Такое заключение сделано авторами работы на основании аддитивности ингибирующего действия ТФ-7

в смеси с пространственно неэкранированным α -токоферолом в реакции инициированного окисления этилбензола, а также исходя из высоких значений k_7 данных ИБФ в реакции с пероксидными радикалами [Мазалецкая и др., 2011]. Исследование реакционной способности аминотилфенолов и метиленбисфенолов с изоборнилльным заместителем в *орто*-положении позволило обнаружить, что ИБФ с *орто*-аминотильными заместителями, в отличие от *пара*-аминотильного производного, характеризуются гораздо более низкой активностью в реакции с пероксидными радикалами этилбензола, что обусловлено образованием внутримолекулярной водородной связи между атомом водорода ОН-группы и атомом азота аминотильного фрагмента [Мазалецкая и др., 2013-б]. При этом в реакции с ДФПГ выявлено увеличение активности *о*-аминотилзамещенного ИБФ с увеличением полярности среды при замене толуола на этанол. Показано, что из-за образования водородной связи с участием ОН-группы в метиленбисфенолах реакционная способность первой и второй ОН-групп 2,2'-метиленбис(6-*трет*.бутил-4-метилфенола) различаются в 50 раз [Мазалецкая и др., 2013-б]. Это соответствует и данным литературы о неэквивалентности ОН-групп метиленбисфенолов в окислительных процессах [Цепалов и др., 1977]. ИБФ являются хиральными соединениями, а биологическая активность хиральных фенолов существенно зависит от конфигурации их хирального центра [Burton et al., 1998; Lu et al., 2008]. Это побудило авторов работ [Мазалецкая и др., 2012-б; 2013-а] провести сравнительный анализ кинетических параметров изокамфил- и изоборнилзамещенных фенолов и их смесей с ионолом и *дипрет*.бутилфенолом в реакции инициированного окисления этилбензола. Оказалось, что несмотря на близкую антирадикальную активность терпенофенолов с изокамфильными и изоборнилльными заместителями, реакционная способность образующихся из них феноксильных радикалов существенно различается. Последнее следовало из сравнения

закономерностей АО действия терпенофенолов, различающихся по строению терпеновых заместителей, в смесях с пространственно затрудненными фенолами. Было показано увеличение реакционной способности феноксильного радикала, если терпеновый заместитель имеет изокамфильное строение.

При переходе от слабополярной среды этилбензола или толуола к растворителю, способному образовывать водородные связи (метилолеат или этанол), происходит обращение эффектов активности алкил- и алкоксизамещенных монотерпенофенолов. Так, при инициированном окислении метилолеата величина соотношения $fk_7(\text{ТФ-6})/fk_7(\text{ТФ-1})$, где f - это стехиометрический параметр ингибирования, становится меньше 2 [Мазалецкая и др, 2012-в], а в реакции с ДФПГ в этаноле реакционная способность ТФ-1 выше, чем ТФ-6 [Мазалецкая и др, 2013-а]. Авторы связывают данный феномен с разрушением внутримолекулярной и образованием межмолекулярных водородных связей ТФ-1 с молекулами растворителя. При изучении влияния ИБФ и ионола на процесс торможения индуцированного гемолиза эритроцитов крови мышей и накопления в их суспензии продуктов окисления [Шишкина и др., 2012-б; Шевченко и др., 2013; Shishkina et al., 2013; Marakulina et al., 2013-а] также установлено, что ТФ-1 имеет преимущество по сравнению с рядом ИБФ, характеризующихся более высокой реакционной способностью по сравнению с ТФ-1 при проведении процесса окисления в слабополярной среде. Так, по уменьшению степени и индуцированного пероксидом водорода, и спонтанного гемолиза эритроцитов крови мышей все соединения располагаются в одной и той же последовательности: ТФ-5 > ТФ-6 > ТФ-8 > ВНТ \geq ТФ-1 \geq ТФ-7 [Шишкина и др., 2012; Shishkina et al., 2013; Шевченко и др., 2013]. При этом, все ИБФ проявляют АО свойства, ингибируя накопление продуктов окисления, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-АП), в суспензии эритроцитов. Кроме того, соединения ТФ-8, ТФ-6 и ТФ-5 проявляют

цитотоксические свойства, вызывая рост степени спонтанного гемолиза эритроцитов крови мышей. При изучении влияния данных ИБФ на поверхностную архитектуру эритроцитов было показано, что соединения, вызывающие спонтанный гемолиз, способствуют переходу эритроцитов из дискоцитарной формы (норма) в стоматоцитарную форму (необратимая предгемолитическая форма трансформации эритроцитов), а соединения, которые слабо влияют на параметры спонтанного гемолиза эритроцитов, вызвали лишь перераспределение форм эритроцитов между дискоцитами (норма) и эхиоцитами (обратимая форма трансформации эритроцитов) [Шевченко и др., 2013]. Существенное влияние гибридных соединений на физико-химические свойства среды показано и в работах [Рыжкина и др., 2011-а,б].

Таким образом, изоборнилфенолы представляют собой новый класс АО, эффективность ингибирующего действия которых зависит от структуры молекулы, природы заместителей в бензольном кольце и полярности растворителя. АО свойства данных соединений выявлены в различных и химических, и биологических системах. Обнаружены и их поверхностно-активные свойства по способности вызывать изменения структурного состояния биологических мембран. Это позволяет предположить, что при введении в организм ИБФ оказывают влияние на разные звенья физико-химической системы регуляции ПОЛ в тканях животных.

§ 1.2. Физико-химические свойства фосфолипидов

К классу липидов относятся свободные жирные кислоты, нейтральные триглицериды, воски, фосфолипиды, сфинголипиды, стерины, гликолипиды и т.д. В настоящее время признано, что липиды выполняют в организме большое количество различных функций, в том числе участвуют в иммунном ответе, передаче нейрональной информации, регуляции сосудистого и мышечного тонуса; являются предшественниками гормонов –

простагландинов; выполняют энергетическую, теплоизоляционную и структурную функции [Геннис, 1997]. Среди метаболически важных липидов особое место занимают фосфолипиды и сфинголипиды, представляющие собой сложные эфиры глицерина или сфингозина, ацелированные по первому и второму положению (исключение составляют лизоформы ФЛ, в которых ацелировано только первое положение (sn-1) остатками высших карбоновых кислот, а третья гидроксильная группа этерифицирована остатком ортофосфорной кислоты, к которой в свою очередь присоединена группа, определяющая принадлежность ФЛ к той или иной подгруппе (холин, амино и т.д.) [Ansell et al. 1973; Giauert, 1968; Грибанов, 1991]. Таким образом, ФЛ являются поверхностно-активными веществами (ПАВ),

так как сочетают в своей структуре и длинные неполярные жирнокислотные остатки и полярную группу, и способны к мицеллообразованию как в полярных, так и в неполярных растворителях [Barclay, 1984; Barclay, Ingold, 1980; Ивков, Берестовский, 1981; Spector et al., 1996]. Именно ФЛ и сфинголипиды, которые часто объединяют в один класс ФЛ, являются одной из главных составляющих модельных и природных биологических мембран, в которых ФЛ организованы в бислои, при этом жирнокислотные хвосты направлены внутрь мембраны, а полярные головки находятся на ее поверхности. Одним из основных свойств биологической мембраны является ее текучесть, обусловленная тем, что рядом стоящие молекулы ФЛ быстро меняются местами, что приводит к высокой скорости латеральной диффузии (средняя скорость лежит в пределах 10^{-7} - 10^{-9} см²/с), а вот перескоки молекул ФЛ из одного монослоя в другой, так называемые флип-флоп (flip-flop) переходы, напротив, крайне редки (среднее время, за которое каждая молекула совершит флип-флоп переход, равно 1 ч). В последнее время показано, что на скорость flip-flop переходов влияет холестерин [Liu et al., 2013]. Столь существенные различия времен латеральной диффузии и flip-

flor переходов способствуют сохранению асимметричного распределения фракций ФЛ в природных биологических и модельных мембранах [Балли и др., 1989; Геннис, 1997; Ивков, Берестовский, 1981]. Было показано, что такое распределение фракций ФЛ сохраняется и в липосомах, сформированных из липидов тканей животных [Crane et al., 2005; Hubbell, 1990; Jong, Ott, 1993.; Laurinavičius et al., 2007; Ohvo-Rekilä et al., 2002; Quinn, 2002].

Основными фракциями всех биологических мембран клеток эукариот является фосфатидилхолин (ФХ) и фосфатидилэтаноламин (ФЭ), среди минорных фракций в норме достаточно высокая доля принадлежит СМ. ФХ и СМ, в виду своей более высокой насыщенности по сравнению с другими фракциями ФЛ [Крепс, 1981], характеризуются более низкой окисляемостью [Ramplona, 2008] и преимущественно локализуются во внешнем слое биологических и модельных мембран. Индивидуальные СМ и ФХ в полярных растворителях образуют ламелярные структуры, стремящиеся замкнуться на себя, что обуславливает их структурообразующие свойства в биологических и модельных мембранах. Амино-ФЛ, которые по сравнению с холиновыми ФЛ характеризуются более высокой степенью ненасыщенности, преимущественно локализуются во внутреннем слое и биологических, и модельных мембран. Представителем амино-ФЛ, который будет рассмотрен в рамках данной работы, является ФЭ, который в полярных растворителях самоорганизуется в гексагональную фазу [Геннис, 1997; Ивков, Берестовский, 1981, Teaque et al., 2013].

Большинство длинноцепочечных ФЛ самоорганизуются в сферические бислойные агрегаты (липосомы). Некоторые синтетические ФЛ с модифицированной полярной головкой самоорганизуются в иные структуры. Так, экспериментально доказано, что синтетический диацетиленфосфатидилхолин самоорганизуется в полые цилиндрические трубки за счет того, что хиральная упаковка индуцирует кручение в бислое

[Spector et al., 1996]. Предполагают, что размер агрегатов зависит как от соотношения диаметра неполярной «головки» и длины неполярного «хвоста» [Холмберг и др., 2007], так и от взаимодействий притяжения и электростатического отталкивания между головками ФЛ, наличия водородных связей, что было экспериментально показано на примере биполярных синтетических ФЛ [Blume et al., 2013]. Кроме того, важную роль в образовании бислоя могут играть соотношение диаметра полярной головки и расстояние между жирнокислотными цепями ФЛ. В связи с этим в работе [Atkinson et al., 2008]. ФЛ были разделены на три условные группы: 1 - диаметр полярной головы ФЛ значительно меньше, чем расстояние между углеводородными цепями (рис 1.1-а); 2 – данные структурные показатели ФЛ приблизительно одинаковы (рис. 1.1-б); 3 - диаметр полярной фосфорной головки ФЛ превышает расстояние между жирнокислотными цепями (рис. 1.1-с).

Возможно, соотношение геометрических параметров и степени насыщенности отдельных фракций ФЛ и определяют преимущественное положение ФЛ в мембране. Расчеты показывают, что домены фракций ФЛ-а (рис. 1.1) обуславливают вогнутость внутреннего слоя мембраны, а домены фракций ФЛ-с – выпуклость внешнего слоя [Sommerharju et al., 2009].

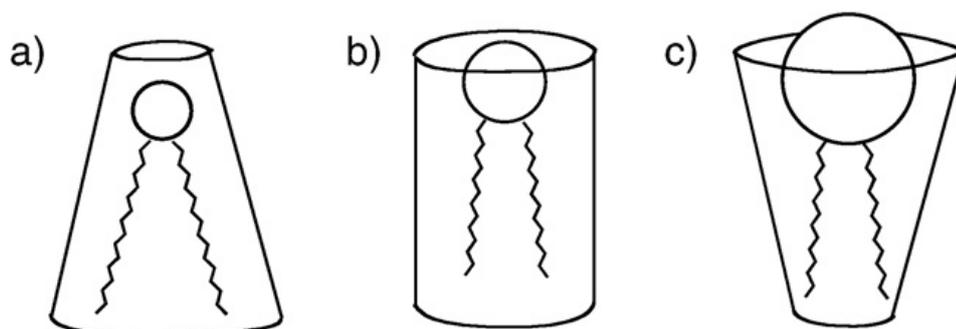


Рисунок 1.1. Схематическое изображение трех типов молекул фосфолипидов: а – усеченный конус; б – цилиндр; в – перевернутый усеченный конус [Atkinson et al., 2008].

Исследование физико-химических характеристик ФЛ является непростой задачей, что обусловлено рядом обстоятельств. Во-первых, даже выделение индивидуальных препаратов не всегда позволяет получить химически однородные соединения. Это следует из того, что у коммерческих препаратов от партии к партии изменяется фракционный состав и доля ФЛ в составе общих липидов [Sotirhos et al., 1986; Hiellscher, Hiellig, 2012], а от этого зависит размер мицелл как в полярных, так и в неполярных растворителях [Марголис, Бергельсон, 1986; Маракулина и др., 2011; Мартовщук и др., 1978; Корнена, 1984; Корнена и др., 1983; Левчук, Воловик, 1983; Макаренко и др., 1987]. Во-вторых, существенно затрудняет интерпретацию полученных экспериментальных данных и сложность молекул ФЛ, и широкий спектр молекулярных видов отдельных фракций ФЛ. Например, в экстрактах зерен арахиса было выявлено пять молекулярных видов ФЭ и по шесть молекулярных видов фосфатидилинозита (ФИ) и ФХ [Singleton et al., 1999]. Поэтому большинство исследований проведено на модельных синтетических ФЛ с известным составом жирных кислот [Blume, 2013; Teague, 2013].

В УФ-спектрах как различных синтетических ФЛ, так и экстрактов липидов из биологических объектов выявлены три полосы поглощения в диапазонах длин волн 195 – 210 нм, 225 – 236 нм и 260 – 280 нм [Каган и др., 1986; Шведова, Полянский, 1992; McHowat et al., 1996; Stector et al., 1996; Zabelinskii et al., 2005]. Наиболее интенсивной и более широкой является полоса поглощения в области от 195 до 210 нм, положение максимума которой зависит от природы растворителя. Наличие данной полосы поглощения, как предполагают, обусловлено несколькими факторами: $n \rightarrow \sigma^*$ переходами, которые характерны для сложных эфиров [Свердлова, 1985; Хмельницкий, 1985] и $\pi \rightarrow \pi^*$ переходов несопряженных $-C=C-$ связей [McHowat et al., 1996]. Количественный анализ синтезированных 37 индивидуальных молекулярных видов диацил-, алкилацил- и

алкенилацилхолин глицерофосфолипидов, содержащих 16 атомов углерода в sn-1 положении и 20 атомов углерода с четырьмя двойными связями в sn-2 положении, показал, что интенсивность полосы поглощения с длиной волны 203 нм увеличивается за счет взаимодействия $-O-CH=C-$ группы sn-1 положения и несопряженными двойными связями в sn-2 положении, а коэффициент линейной зависимости площади полосы от концентрации ФЛ увеличивается с увеличением количества несопряженных двойных связей в sn-2 положении [McHowat et al., 1996].

Полоса поглощения в области 225 – 236 нм обусловлена наличием сопряженных двойных связей и так называемых диеновых конъюгатов (ДК), образующихся при свободнорадикальном окислении ненасыщенных жирных кислот ФЛ. Наличие этой полосы обусловлено $\pi \rightarrow \pi^*$ переходами [Свердлова, 1985; Каган и др., 1986; Lezerovich, 1986]. В синтетических препаратах ФЛ при отсутствии остатков ненасыщенных жирных кислот в sn-2 положении данная полоса поглощения отсутствует. В липидных экстрактах из биологических объектов, вследствие достаточно низкой концентрации ДК и большой интенсивности основного пика, часто эта полоса проявляется в виде плеча [Каган и др., 1986]. Полоса поглощения в УФ-спектрах ФЛ в диапазоне длин волн от 260 до 280 нм обусловлена как $\pi \rightarrow \pi^*$ переходами неподеленной электронной пары атома кислорода, сопряженной с двойной связью жирнокислотной цепи ($-O-CH=C-$), так и $n \rightarrow \pi^*$ переходами, характерными для карбонильной группы $C=O$ [Свердлова, 1985; Хмельницкий, 1985]. Обычно эту полосу поглощения связывают в наличии в составе липидов так называемых кетодиенов (КД) и используют в качестве одного из показателей степени окисленности липидов [Шведова, Полянский, 1992].

Поскольку в области $\lambda_{\max} > 250$ нм практически отсутствуют полосы других переходов, то это позволяет их идентифицировать, несмотря на малую интенсивность $n \rightarrow \pi^*$ переходов. В последнее время было установлено, что на величину максимальной длины волны данной полосы

поглощения оказывает влияние природа головки ФЛ: наиболее высокая λ_{\max} обнаружена во фракциях ФЛ головного мозга крыс, содержащих ФХ [Zabelinskii et al., 2005]. Необходимо отметить, что в литературе практически отсутствуют работы, в которых бы анализировались УФ-спектры природных ФЛ.

Как известно, поглощение веществом в области инфракрасного излучения вызывает переходы между различными колебательными состояниями атомных группировок в молекулах, что позволяет выявлять наличие в них функциональных групп. С точки зрения ИК-спектроскопии ФЛ являются сложными веществами, поскольку содержат большое количество взаимно влияющих друг на друга атомов и групп атомов, что существенно затрудняет детальный анализ ИК-спектров природных ФЛ и направляет усилия исследователей на анализ ИК-спектров различных модельных ФЛ и родственных им соединений [Макаренко и др., 1987; Pohle et al., 2001; Watry et al., 2003; Lewis, McElhaney, 2006; Hielscher, Hellwig, 2012]. Характеристические частоты симметричных и асимметричных валентных колебаний CH_3 - и CH_2 -связей в длинноцепочечных алифатических соединениях обнаруживается в области $3000 - 2800 \text{ см}^{-1}$ [Беллами, 1963; Пентин, Вилков, 2009]. Данные колебания выявлены и в синтетических ФЛ и родственных им соединениях, частота которых зависит и от структуры соединения, и от окружения [Arrondo, 1998; Pohle et al., 2001]. Так, в ИК-спектрах порошка димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ) обнаружены только полосы асимметричных и симметричных CH_2 колебаний с волновыми числами 2920 см^{-1} и 2850 см^{-1} соответственно [Pohle et al., 2001], в то время как в водной суспензии дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) выявлены асимметричные и симметричные валентные колебания CH_3 -группы при 2957 см^{-1} и 2871 см^{-1} и CH_2 -групп при 2924 см^{-1} и 2853 см^{-1} соответственно [Arrondo, 1998]. При этом характеристические частоты асимметричных и симметричных валентных колебаний CH_2 -групп в молекуле модельного

соединения метилфосфатидилхолина (в природе обнаружен в яйцах морского ежа) увеличиваются от 2910 см^{-1} и 2850 см^{-1} соответственно до 3040 и 2850 см^{-1} с ростом гидратации среды [Pohle et al., 2001].

Деформационные колебания CH_3 - и CH_2 -групп, наблюдаемые у алканов в области 1465 - 1375 см^{-1} [Беллами, 1963; Пентин, Вилков, 2009], обнаружены и в препаратах ДМФХ и ДПФХ, и в их водных суспензиях [Макаренко и др., 1987; Arronda, 1998; Pohle et al., 2001]. При этом гидратация вызывает рост интенсивности и полуширины полосы деформационных колебаний при 1469 см^{-1} в 1,5 раза [Макаренко и др., 1987]. В ИК-спектрах метиловых эфиров жирных кислот гидрогенизированных растительных масел характеристические частоты асимметричных (2961 см^{-1} и 2935 см^{-1}) и симметричных (2880 см^{-1} и 2863 см^{-1}) валентных колебаний CH_3 - и CH_2 -групп соответственно, как и деформационных колебаний ($\nu_{\text{CH}_2}=1463\text{ см}^{-1}$ и $\nu_{\text{CH}_3}=1381\text{ см}^{-1}$) аналогичны значениям, обнаруженным для синтетических ФЛ [Mossoba et al., 2001]. При этом использование ИК-Фурье спектроскопии как детектора для газовой хроматографии позволило авторам выявить различия характеристических частот валентных колебаний $=\text{C}-\text{H}$ групп различных цис- и транс- изомеров жирных кислот различной структуры [Mossoba et al., 2001]. В области волновых чисел от 1380 см^{-1} до 1100 см^{-1} в сухих и гидратированных препаратах ДПФХ и ДМФХ были выделены серии полос с различной частотой и интенсивностью, которые были отнесены авторами к симметричным деформационным колебаниям CH_3 -группы (1380 см^{-1}), асимметричным валентным колебаниям эфирной $\text{C}-\text{O}$ -группы (1169 - 1171 см^{-1}) и скелетным валентным колебаниям $\text{C}-\text{C}$ связи (1159 см^{-1}) [Макаренко, 1987; Arronda, 1998; Pohle et al., 2001]. Гидратация вызывала уширение полосы $\text{C}-\text{O}$ в ДПФХ при 1169 см^{-1} с 26 см^{-1} до 48 см^{-1} , что авторы связывали с образованием водородных связей с молекулами воды [Макаренко и др., 1987]. Частота валентных колебаний карбонильной группы $\text{C}=\text{O}$ во всех изученных препаратах варьировала от 1793 см^{-1} до 1732 см^{-1} и

ее значение практически не зависело от гидратации, а также от геометрической изомерии жирных кислот [Макаренко и др., 1987; Mossoba, 2001; Arronda, 1998], что соответствует данным литературы о высокой стабильности характеристической частоты C=O группы [Беллами, 1963; Socrates, 1994]. Наиболее сильное влияние гидратация оказывала на полярную головку ФЛ, что авторы связывают с образованием водородной связи между молекулами воды и атомом кислорода PO₂⁻-группы [Макаренко и др., 1987; Pohle et al., 2001]. Так, в процессе гидратации ФЛ частота PO₂⁻ группы в молекуле ДМФХ смещается с 1260 см⁻¹ до 1230 см⁻¹, а в молекуле ДПФХ полоса при 1257 см⁻¹ исчезает, внося изменения в частоту и интенсивность соседних полос. При этом в спектре гидратированного ДПФХ частота симметричных колебаний PO₂⁻ группы смещается с 1091 см⁻¹ до 1089 см⁻¹ при уменьшении полуширины полосы на 4,4 см⁻¹. Гидратация вызывала и смещение частот колебаний P-O-C-C-фрагмента в молекуле ДПФХ с 1067 см⁻¹ до 1062 см⁻¹ и с 1053 см⁻¹ до 1051 см⁻¹ с одновременным уширением полос поглощения обоих компонентов. Гидратация оказывала влияние и на конформацию холиновой группировки, что следует из смещения частоты асимметричных колебаний N-C связи в -N⁺(CH₃)₃ с 969 см⁻¹ до 974 см⁻¹, увеличения полуширины полос на 11 см⁻¹ и роста интегральной интенсивности почти в 1,5 раза.

В работе [Watry et al., 2003] исследовали ориентацию и конформацию молекул насыщенных ФЛ в монослоях и образованной H-связями сетке молекул воды, ассоциированной с монослоем, на границе раздела фаз пар/монослой/вода. Объектами изучения служили диацилФХ, диацилФЭ, диацилФГ и диацилФС, у которых в обоих *sn*₁ и *sn*₂ положениях находились остатки миристиновой (C₁₄), пальмитиновой (C₁₆) и стеариновой (C₁₈) жирных кислот. Было обнаружено, что упорядоченность ацильных цепей увеличивается с ростом длины цепи для диацилФХ, диацилФГ и диацилФС и остается неизменной для диацилФЭ. Установлено также, что на

взаимодействие молекул воды и головки ФЛ на границе раздела фаз существенное влияние оказывает не концентрация хлористого натрия, а рН среды. Авторы считают, что полученные ими результаты могут иметь значение при анализе функций ФЛ в биологических мембранах.

При анализе ИК-спектров синтетических ДМФХ и ДМФЭ и коммерческих препаратов фосфатидилинозита (ФИ), ФХ, ФЭ, ФГ и СМ из разных биологических объектов в дальней области ($\nu < 700 \text{ см}^{-1}$) были обнаружены полосы поглощения в трех диапазонах частот; которые авторами были интерпретированы как вклад головки ФЛ ($600 \text{ см}^{-1} - 480 \text{ см}^{-1}$), частоты торсионных колебаний углеводородного остова ($460 \text{ см}^{-1} - 180 \text{ см}^{-1}$) и участие водородной связи (ниже 300 см^{-1}).

Необходимо отметить, что на все физико-химические характеристики ФЛ (УФ-, ИК-спектры, фазовое поведение и способность к самоорганизации) влияет наличие и интенсивность окислительных процессов [Barclay et al., 1984; Владимиров, 1987; Wallgreen et al., 2013]. Показано также, что при окислении липидов уменьшается количество цис-конформаций С=С связей, удлиняется цепь сопряжения и, соответственно, наблюдается смещение максимума поглощения в сторону меньших значений частот [Хмельницкий, 1985].

В соответствии с приведенной ранее схемой окисления экспериментально доказано, что участие ФЛ в процессах окисления многогранно. Они являются не только основными субстратами окисления в биологических мембранах [Бурлакова, Храпова, 1985; Frankel, 1987], но и выступают в роли АО, их синергистов и антагонистов [Hudson, 1984; Ishikawa et al., 1984; Бурлакова и др., 1990; Богуславская и др., 1990; Бурлакова и др., 1995, Мазалецкая и др., 2008, 2010 а-в; 2012а-в; Mazaletskaia et al., 2012; Антошина и др., 2005; Уткина и др., 2004]. В зависимости от скорости зарождения радикалов, природы ФЛ (яичный ФХ, ДПФХ и лецитин) и физико-химических характеристик АО и их концентрации

природные и синтетически АО по их влиянию на продолжительность периода индукции при окислении с ФЛ были условно разделены на три группы [Мазалецкая и др., 2010 а, б; Mazaletskaya et al., 2012]:

- АО, для которых наблюдается увеличение периода индукции (α -токоферол, 4-метоксифенол, этоксихин);
- АО, для которых период индукции не изменяется (ВНТ);
- АО, для которых период индукции уменьшается (кверцетин, дигидрокверцетин).

В работе Л.И. Мазалецкой и соавторов [Мазалецкая и др, 2012-в] исследовано влияние субстрата окисления (этилбензол, метилолеат) и лецитина на эффективность ингибирующего действия четырех ИБФ (ТФ-1, ТФ-5, ТФ-6 и ТФ-7) при инициированном окислении этилбензола и метилолеата, и в автоокислении метилолеата. Выявлено, что в зависимости от природы субстрата, режима окисления и вклада побочных реакций добавки лецитина снижают, увеличивают или практически не изменяют эффективность ингибирования ИБФ. На основании величины изменения поглощения в электронных спектрах растворов лецитина в н-гексане и смеси ИБФ с лецитином в н-гексане авторы обнаружили, что степень взаимодействия ИБФ с лецитином согласуется с рядом антирадикальной активности изученных ИБФ в реакции инициированного окисления этилбензола и сделали вывод об образовании комплексов, отличающихся по активности от ИБФ как в реакциях ингибирования, так и в побочных реакциях. Образование комплексов α -токоферола с жирными кислотами описано ранее в ряде работ [Ерин и др., 1983, 1987]. Впоследствии было обнаружено образование комплексов α -токоферола, флавоноидов и ряда синтетических АО с ДФПГ, яичным ФХ и лецитином [Бурлакова и др., 1995; Мазалецкая и др., 2008; Xu et al., 2008; Шарафутдинова и др., 2008]. Было показано, что в результате комплексообразования флавоноидов с ФЛ не

происходит образования новых химических связей, что позволяет предположить молекулярную природу таких комплексов [Xu et al., 2008; Шарафутдинова и др., 2008].

Таким образом, к началу постановки данной работы в литературе практически отсутствовали данные о влиянии фракционного состава природных фосфолипидов на их поверхностно-активные свойства, способность образовывать комплексы с ИБФ в зависимости как от структуры терпенофенола, так и природы ФЛ, физико-химических свойствах самих природных фосфолипидов и ИБФ различного строения. Это и обусловило необходимость проведения данного исследования, так как ряд изоборнилфенолов – АО нового класса – являются перспективными фармакологическими препаратами [Плотников и др. 2008, 2009], что требует детального изучения механизма их активности в различных системах.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

§ 2.1 Объекты исследования

В качестве источников природных ФЛ в работе исследованы: 10%-ый спиртовой раствор соевого лецитина (ЛС) (Харьков, Украина), хлороформный раствор сфингомиелина (СМ) из мозга быка (Владивосток, Россия), хлороформный раствор L- α -кефалина (КФ) из мозга быка (Sigma), L- α -фосфатидилхолин в виде лиофилизованного порошка (Sigma), сфингомиелин из мозга быка в виде лиофилизованного порошка (Fluka) и лиофилизированный L- α -фосфатидилэтаноламин (Sigma). Структурные формулы основных фракций исследованных ФЛ представлены на рисунке 2.1.

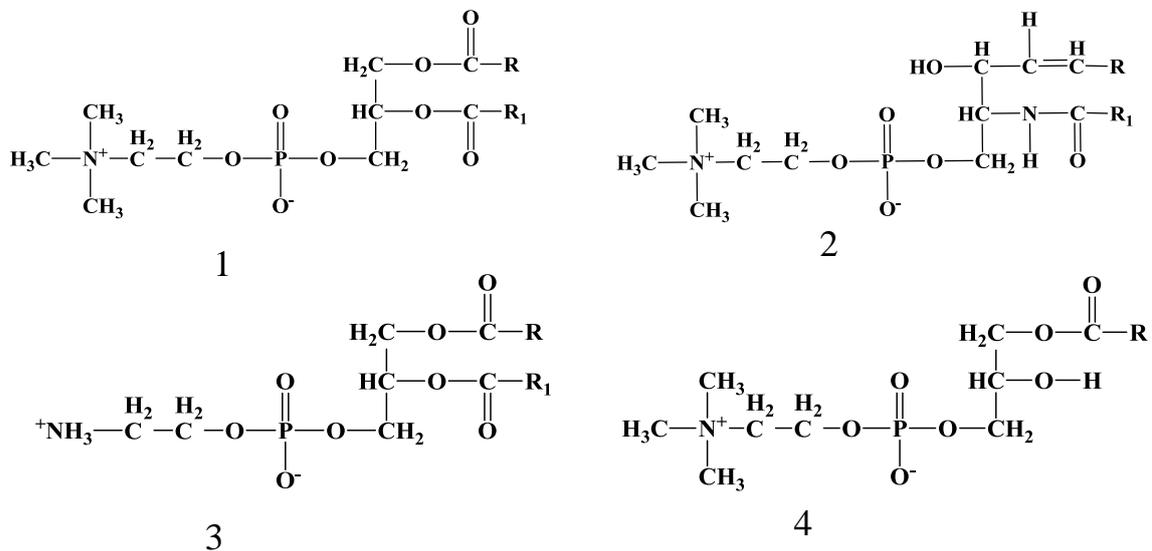


Рис. 2.1. Структурные формулы фосфолипидов: 1 – фосфатидилхолин; 2 – сфингомиелин; 3 – фосфатидилэтаноламин; 4 – лизофосфатидилхолин

В качестве препаратов фенольных АО исследовали ИБФ, содержащие одну или несколько изоборнильных групп (1,7,7-триметилбицикло[2,2,1]гепт-2-экзо-ил), а также гибридные фенольные АО, содержащие в *орто*- и *пара*-положениях относительно ОН-группы и изоборнильные, и *трет.*бутильные группировки. Данные препараты синтезированы на основе отходов лесопромышленного комплекса методом алкилирования фенола природным терпеном – камфеном на различных

катализаторах сотрудниками Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химии Коми НЦ УрО РАН под руководством чл.-корр. РАН Кучина А.В. и любезно предоставлены нам для исследований. В работе препараты использовали без дополнительной очистки. Для сравнения был выбран ионол – стандартный липофильный антиоксидант из класса пространственно затрудненных фенолов (4-метил-2,6-дипрет.бутилфенол, ВНТ). Структурные формулы исследованных фенолов представлены на рисунке 2.2.

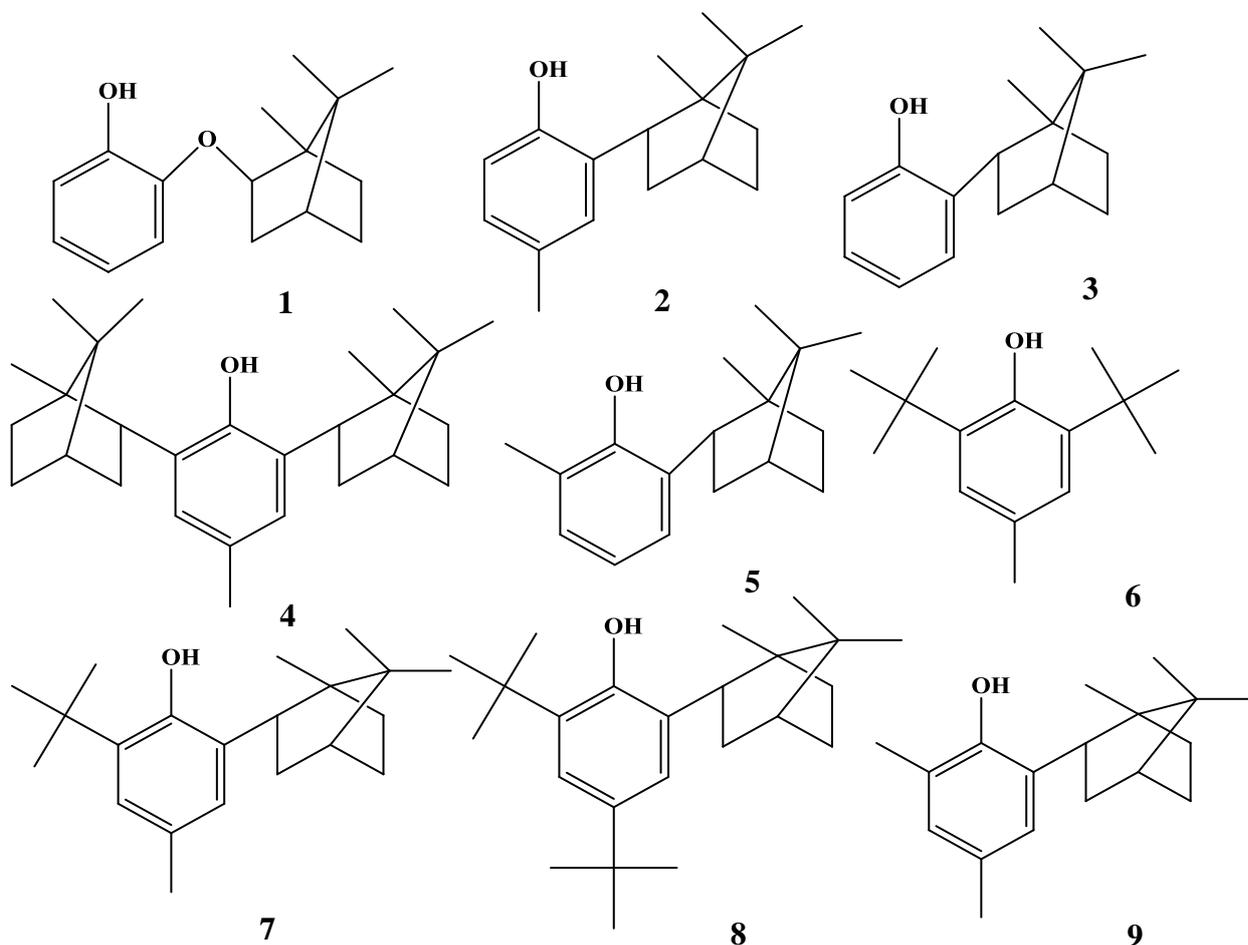


Рис. 2.2. Структурные формулы фенольных антиоксидантов: 1 – 2-изоборнилоксифенол (ТФ-1); 2 – 4-метил-2-изоборнилфенол (ТФ-5); 3 – 2-изоборнилфенол (ТФ-6); 4 – 4-метил-2,6-диизоборнилфенол (ТФ-7); 5 – 2-метил-6-изоборнилфенол (ТФ-8); 6 – 4-метил-2,6-дипрет.бутилфенол (ВНТ); 7 – 4-метил-2-прет.бутил-6-изоборнилфенол (ТФ-37); 8 – 2,4-дипрет.бутил-6-изоборнилфенол (ТФ-47); 9 – 2,4-диметил-6-изоборнилфенол (ТФ-50).

§ 2.2 Определение фракционного состава фосфолипидов методом тонкослойной хроматографии

Фракционный состав использованных препаратов ФЛ контролировали методом тонкослойной хроматографии по Шталю [*Биологические мембраны: методы*, 1990]. Для этого использовали стеклянные пластины размером 90×120 мм, силикагель типа G (Sigma).

Обезжиренные хромовой смесью пластины промывали дистиллированной водой и высушивали. В бюкс с 1,5 г силикагеля добавляли 5 мл водного раствора Na_2CO_3 с концентрацией 6,8 мг/л, полученную однородную суспензию переносили на стеклянную пластинку и быстро разравнивали. Далее пластины высушивали на специальном выравненном горизонтально по уровню столике. Активирование пластин проводили путем нагревания до 140° С в сушильном шкафу и последующим охлаждением до комнатной температуры. На линию старта, отстоящую на 10 мм от нижнего края подготовленной пластины, наносили микрошприцем 5 равноотстоящих друг от друга проб по 20 мкл, представляющих собой хлороформные растворы липидов в концентрации 10 мг/мл. В отдельные 2 – 3 пробирки отбирали по 10 мкл хлороформных растворов липидов в указанной выше концентрации для дополнительного определения содержания фосфолипидов в составе общих липидов. В качестве подвижной фазы использовали смесь хлороформ : метанол : ледяная уксусная кислота : дистиллированная вода в объемном соотношении 12,5 : 7,5 : 2 : 1 соответственно. Все растворители характеризовались степенью чистоты х.ч. либо ос.ч. Хроматографическая камера предварительно насыщалась парами растворителей в течение 20 – 30 минут. По достижении фронтом системы растворителей линии финиша, отстоящей на 10 мм от верхнего края, пластины вынимали, сушили под тягой до исчезновения запаха уксусной кислоты и проявляли в парах йода. Затем хроматограммы зарисовывали, быстро и аккуратно "обкалывали" иглой пятна отдельных фракций фосфолипидов.

Для определения количественного содержания отдельных фракций ФЛ, пятна снимали специальной лопаточкой, сделанной из лезвия бритвы, и переносили в маркированные пробирки по одному пятну для анализа основных фракций ФЛ в препаратах (ФХ, СМ и ФЭ), а для анализа минорных фракций по 2 – 3 пятна с параллельных дорожек. Затем в пробирки, добавляли по 0,1 мл хлорной кислоты и прокаливали в течение 2 часов до полного разложения фосфолипидов и образования неорганического фосфата.

После остывания в каждую пробирку добавляли по 2,1 мл смеси, состоящей из 0,33 мл хлорной кислоты 65-67 %, 0,97 мл дистиллированной воды, 0,4 мл 1,25% водного раствора молибдата аммония и 0,4 мл 5% водного раствора аскорбиновой кислоты. Затем пробирки в течение 5 минут нагревали на кипящей водяной бане. Количественный анализ фракций ФЛ проводили на фотоэлектроколориметре КФК-3 (Россия) при длине волны 800 нм по образованию фосфорномолибденового комплекса в присутствии аскорбиновой кислоты.

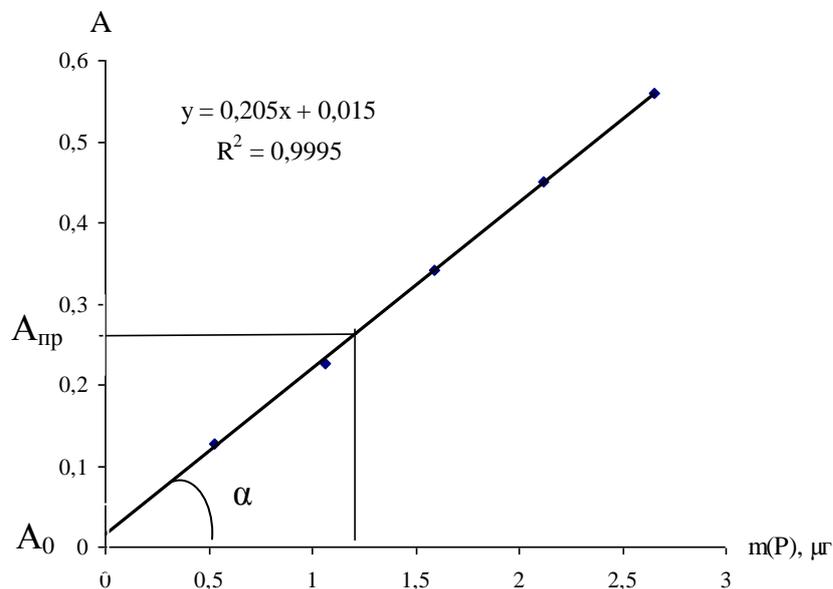


Рис. 2.3. Типичная калибровочная прямая

Для построения калибровочных прямых (рис. 2.3) использовали однозамещённый фосфорнокислый калий (марка ос. ч.). Исходя из данных

калибровочной прямой, количество неорганического фосфора в пробе на общий фосфор рассчитывали по формуле:

$$m(P)_{\text{пр}}=(A_{\text{пр}}-A_0)/\text{tg}\alpha,$$

где: $m(P)_{\text{пр}}$ – масса элементарного фосфора, обнаруженная в пробе;

$A_{\text{пр}}$ – поглощение пробы

A_0 – поглощение нулевой пробы (проба силикагеля);

$\text{tg}\alpha$ - тангенс угла наклона калибровочной кривой.

Далее полученные значения массы фосфора пересчитывали на массу фосфолипидов по формуле:

$$m(\text{ФЛ})=m(P)\times 700/31,$$

где 700 – средняя молярная масса фосфолипидов;

31 – атомная масса фосфора

Долю отдельных фракций ФЛ рассчитывали из отношений оптических плотностей растворов фракций к суммарному поглощению растворов всех фракций одной дорожки и выражали в процентах.

§ 2.3 Методика йодометрического определения содержания пероксидов в липидах и/или антипероксидной активности липидов

Методом йодометрического титрования (ГОСТ 26593-85) измеряли количество гидропероксидов в липидах.

В колбу с известной массой вносили и взвешивали анализируемую пробу добавляли 4 мл смеси ледяной уксусной кислоты и хлороформа (1:1 по объему) и приливали 0,1 мл насыщенного свежеприготовленного водного раствора йодистого калия (ос. ч.). Пробу закрывали, перемешивали и выдерживали 3 минуты. Затем в каждую колбу добавляли не менее 10 мл дистиллированной воды для остановки реакции и выделившийся йод титровали раствором тиосульфата натрия (0,01 N). Количество пероксидов (ммоль/г×г липидов) определяли по формуле:

$$[\text{ROOH}] = \frac{N \times V}{2 \times p},$$

где:

N- нормальность тиосульфата; V - объем тиосульфата, пошедший на титрование; p - навеска; 2 – фактор эквивалентности тиосульфата натрия в реакции с йодом.

Об антипероксидной активности (АПА) липидов, т. е способности липидов разлагать гидропероксиды, судили по разности концентраций гидропероксидов в окисленном метилолеате и при добавлении к нему исследуемых препаратов и отнесённой к 1 г препаратов [Меньшов и др., 1993]. В том случае, если концентрация пероксидов в растворе липидов в окисленном метилолеате превышала аналогичный показатель в самом метилолеате, то оценивалось содержание пероксидов в липидах [Шишкина, Хрустова, 2006].

§ 2.4 Определение содержания диеновых конъюгатов и кетодиенов в препаратах фосфолипидов

Анализ диеновых конъюгатов (ДК) и кетодиенов (КД) в составе липидов проводили с помощью УФ-спектрометрии. Спектры поглощения растворов липидов в гексане регистрировали на спектрофотометре "Unico 2800" (США) в диапазоне от 190 до 400 нм. Максимум в спектре поглощения ДК и КД приходился на 232±2 нм и 272±2 нм соответственно. Расчет содержания ДК и КД проводили относительно значения поглощения основной полосы при 200±5 нм [Шведова, Полянский, 1992]. Концентрация липидов в гексане составляла 0,1 мг/мл.

§ 2.5 Определение стехиометрии компонентов в комплексах фосфолипидов с фенольными антиоксидантами

Для определения стехиометрии комплексов нами был адаптирован метод Остромысленского – Жоба, известный, как метод изомолярных серий и широко используемый для определения стехиометрии окрашенных комплексов с переходным металлом в координационном центре [Колычев, Парамонова, 1964, Костромина, Кумок, Скорик, 1990]. В работе готовились серии изомолярных растворов ФЛ, АО и их смесей при различном мольном соотношении компонентов, но при постоянной суммарной мольной концентрации. Измерения проводились при $\lambda=270\pm 5$ нм по полосе поглощения бензольного кольца фенолов в диапазоне концентраций: $8,8\times 10^{-6}$ – $8,8\times 10^{-5}$ моль/л для лецитина, $5,0\times 10^{-6}$ – $5,0\times 10^{-5}$ моль/л для растворов L- α -кефалина и $4,4\times 10^{-5}$ – $4,4\times 10^{-4}$ моль/л для растворов сфингомиелина. Об образовании комплексов судили по отклонению оптической плотностей растворов смесей ФЛ с фенольными АО от аналогичного показателя для суммарного спектра. Под суммарным спектром понимается алгебраическая сумма оптических плотностей спектров отдельных компонентов в тех же концентрациях. Наличие отклонений (ΔA) свидетельствует о взаимодействии молекул. Следует отметить, что предполагается образования молекулярного комплекса, под которым понимается продукт ассоциации нескольких молекул под действием сил притяжения между их полярными группировками. О стехиометрии компонентов в комплексе судили по максимальной величине зависимости ΔA от мольного соотношения компонентов.

§ 2.6. Выявление природы связей, участвующих в комплексообразовании

Функциональные группировки, участвующие в комплексообразовании, определяли методом ИК-Фурье спектроскопии с приставкой НПВО (Perkin-Elmer, Германия). Спектры растворов как индивидуальных компонентов, так и их смесей в различных растворителях (гексан, хлороформ, этанол) записывали в диапазоне частот от 4000 см^{-1} до 600 см^{-1} . По изменению

характеристик полос поглощения в спектрах смесей относительно спектров отдельных компонентов судили о степени вовлеченности группировки в процесс образования комплекса.

§ 2.7. Определение размера мицелл фосфолипидов в присутствии и отсутствии добавок антиоксидантов

Определение размера агрегатов ФЛ в гексане (неполярная среда) и 0,8%-м водном растворе этанола (полярная среда) растворе проводили методом динамического рассеяния света. Измерения выполнялись на приборе Zetasizer Nano (Zetasizer Nano Series, User Manual; UK, 2005), оснащенным He-Ne лазером, в диапазоне концентраций от 20 до 90 мкг/мл. Измерения проводились при постоянной температуре 25° С и фиксированном угле рассеяния 173°. Измерения каждой пробы проводили, как правило, в пяти повторностях. Статистическая ошибка результатов менее 2 %. Следует отметить, что размер частиц оценивался как гидродинамический радиус по интегральной кривой интенсивности светорассеяния.

Динамическое рассеяние света (или фотон-корреляционная спектроскопия) позволяет оценить броуновское движение и отыскать его взаимосвязь с размером частиц посредством облучения последних лазерным лучом и анализа интенсивности флуктуаций в рассеянном свете.

Взаимосвязь между размером частицы и скоростью ее движения, благодаря броуновскому движению, определена уравнением Стокса-Эйнштейна:

$$F_{тр} = 6\pi\eta r u,$$

где: η – динамическая вязкость среды; r – радиус частицы, u – скорость движения частиц.

Типичная система динамического рассеяния света (рис. 2.4 и 2.5) состоит из 6 основных компонентов. Лазер 1, с помощью которого происходит облучение частиц данного образца в ячейке 2. Большая часть

лазерного потока проходит прямо через образец, но часть его рассеивается частицами в образце. Детектор 3 позволяет измерить интенсивность рассеиваемого света. Поскольку частицы рассеивают свет во всех направлениях, то теоретически возможно поместить детектор в любое положение, и он будет улавливать рассеянный свет.

В данной модели Zetasizer Nano детектор установлен под углом 173° .

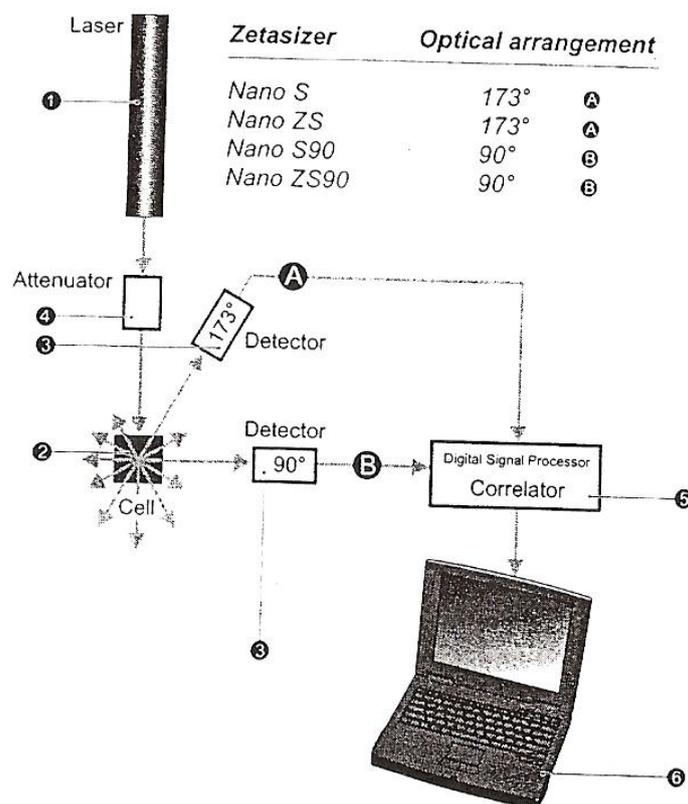


Рис. 2.4. Схема динамического светорассеяния

Интенсивность светорассеяния должна лежать в определенном диапазоне для того, чтобы детектор мог ее успешно зафиксировать. Если фиксируется слишком много света, то детектор будет перегружен. Чтобы преодолеть это явление используется аттенюатор 4, который уменьшает интенсивность лазера, и, следовательно, интенсивность рассеяния снижается. Сигнал об интенсивности рассеяния преобразуется в цифровой сигнал обрабатывающего устройства, называемого коррелятором 5. Коррелятор сравнивает интенсивность рассеяния в последовательные промежутки

времени для установления скорости, с которой меняется интенсивность. Эти данные затем поступают в компьютер 6, где соответствующая программа их анализирует и выдает информацию о размерах.

Как уже было упомянуто, Zetasizer Nano S измеряет светорассеяние под углом, близком к 180° . Такое светорассеяние называется обратным.



Рис. 2.5. Принцип обратного светорассеяния

Существует несколько преимуществ обратного рассеяния:

При измерении обратного рассеяния исходный луч не будет проходить сквозь однородный раствор. Это сократит эффект, называемый многократным рассеянием, когда свет, рассеянный одной частицей, также отражается и другими частицами. Так как свет проходит через более короткий оптический путь образца, то можно измерить растворы более высоких концентраций.

Загрязняющие вещества, такие как, частицы пыли в диспергирующем агенте являются очень большими по сравнению с размером частиц данного раствора. Большие частицы, в основном, рассеивают в прямом направлении. Поэтому, благодаря измерению обратного рассеяния, эффект от наличия пыли значительно уменьшается.

2.8. Статистическая обработка результатов

Экспериментальные данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики [Лакин, 1990] и с помощью компьютерного пакета программ KINS [Брин, Травин, 1991]. На рисунках и в таблицах данные представлены в виде среднеарифметических значений с указанием их средней квадратичной ошибки ($M \pm m$). Вариабельность показателей

рассчитывали как отношение средней квадратичной ошибки и его арифметического значения в %. Для построения графических зависимостей был использован Excel из пакета программ Microsoft Office 2010. В работе были использованы программные модули, разработанные в работе [Козлов, 2012] для многофакторного анализа экспериментальных данных.

В ходе работы были использованы приборы, находящиеся в научном Центре коллективного пользования ИБХФ РАН «Новые материалы и технологии».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 3. Физико-химические свойства природных фосфолипидов

Как уже было отмечено, одними из основных компонентов биологических мембран являются фосфолипиды (ФЛ), организованные в бислои. При этом распределение различных ФЛ в бислое мембран является ассиметричным. Такие ФЛ как ФХ и СМ, преимущественно локализуются во внешнем слое, а аминофосфолипиды – во внутреннем. Поэтому для данной работы были выбраны препараты, содержащие в качестве основных фракций ФХ, СМ и ФЭ.

Показано, что такие физико-химические характеристики природных липидов, как степень их ненасыщенности или способность разлагать пероксиды существенно влияют на их участие в регуляции перекисного окисления липидов в системах различной степени сложности [Шишкина, Хрустова, 2006; Козлов и др. 2007; Хрустова, Козлов, Шишкина, 2011-б; Хрустова, Шишкина 2011-а]. Однако, как отмечалось в литературном обзоре, детальному изучению физико-химических характеристик природных ФЛ посвящены единичные исследования из-за сложности интерпретации данных в связи с непостоянством их фракционного состава [Sotirhos et. al., 1986; Niellscher, Hillig, 2012]. Поэтому первым этапом данной работы явилось изучение фракционного состава, УФ-спектроскопии, ИК-спектроскопии, мицеллообразования в гексане и водно-этанольном растворе и способности взаимодействовать с пероксидами препаратов фосфолипидов из различных биологических объектов.

§ 3.1. Фракционный состав исследованных фосфолипидов

Высокая лабильность состава природных липидов обуславливает необходимость детального анализа фракционный состав препаратов ФЛ, результаты которого представлены в таблицах 3.1 – 3.4. Прежде всего необходимо отметить, что различные партии исследованных препаратов, в

соответствии с данными литературы (§1.2) существенно различаются по содержанию ФЛ в составе общих липидов, а также по количественному соотношению фракций в составе фосфолипидов [Маракулина и др. 2011, 2016]. Как известно, лецитин представляет собой смесь природных липидов, в составе ФЛ которого преобладает ФХ. Действительно, из данных, представленных в таблице 3.1, видно, что в разных партиях лецитин-стандарта (ЛС) доля ФЛ в составе общих липидов варьирует от 41 до 82 %, а доля основной фракции – ФХ в исследованных препаратах ЛС изменялась в диапазоне от 80,0 % до 92,2 %. Среди минорных фракций в препаратах ЛС преобладают лизоформы фосфолипидов и СМ, суммарные доли которых варьируют в пределах от 5,8 % до 9,8 % от общего количества ФЛ. Как видно из таблицы 3.4, доля ФХ в коммерческом препарате L- α -ФХ фирмы Sigma выше (95 % и 96,5 %), при этом относительное содержание СМ не превышало 2,3 %, а доля ФЛ в составе общих липидов составляла 59 % и 66 %.

Из таблицы 3.2 видно, что доля ФЛ в составе общих липидов для препаратов СМ из мозга быка (ДВГУ) варьировала от 44 % до 81 % при этом относительное содержание основной фракции СМ изменялось в диапазоне от 91,1 % до 97,2 %. Как видно из таблицы 3.4, в исследованном коммерческом препарате СМ (Fluka) относительное содержание СМ в ФЛ составляет 93,3 %, а содержание ФЛ в составе общих липидов 62 %.

Препараты L- α -Кефалина, по данным ТСХ (таблица 3.3) характеризуются наименьшим содержанием основной фракции в составе ФЛ: доля ФЭ в данных препаратах изменялась в диапазоне от 64 % до 70 %, при этом содержание ФЛ в составе общих липидов варьировало от 44 % до 77 %. Как видно из таблицы 3.4, препараты ФЭ (Sigma) характеризуются очень низким (21 %) содержанием ФЛ в составе общих липидов, из которых 70 % приходится на ФЭ, 6% на ФИ, 5% на КЛ и 6 % на ФГ.

**Таблица 3.1. Фракционный состав липидов исследованных партий
Лецитин-Стандарта**

Фракция, % Р	1	2	3	4	5
ЛФХ	4,1±0,1	4,3±0,1	3,6±0,1	3,4±0,4	3,1±0,3
СМ	4,5±0,8	4,3±0,3	2,6±0,1	4,0±0,4	2,7±0,3
ФХ	86,8±0,8	88,5±0,5	92,2±0,3	87±1	88,2±0,9
ФИ	0,43±0,04	0,28±0,01	-	0,58±0,09	2,0±0,5
ФС		0,3±0,1	-	0,9±0,5	
ФЭ	-	1,80±0,03	1,5±0,3	2,9±0,8	2,4±0,1
ФГ	-	0,5±0,3	0,04±0,02	0,6±0,1	0,59±0,06
КЛ	1,6±0,5			0,4±0,2	
ФК	1,3±0,4	0,034±0,003		0,6±0,1	1,07±0,09
Доля ФЛ в составе общих липидов, %	82±6	70±2	66±3	52±3	59±3

Фракция, % Р	6	7	8	9	10	11
ЛФХ	3,9±0,2	5,7±0,2	3,00±0,07	4,3±0,3	4,7±0,1	4,6±0,2
СМ	4,2±0,3	4,1±0,2	5,4±0,1	4,0±0,3	3,19±0,06	4,3±0,1
ФХ	80±1	84,5±0,9	84,7±0,6	87±1	90,4±0,2	85±1
ФИ	2,5±0,4	1,8±0,4	2,4±0,1	0,9±0,2	0,02±0,01	2,5±0,9
ФС	1,6±0,2			0,4±0,1	0,17±0,07	1,2±0,2
ФЭ	3,4±0,4	2,04±0,09	2,5±0,5	1,6±0,3	0,93±0,05	1,5±0,1
ФГ	0,9±0,1	0,44±0,04	1,36±0,05	0,4±0,2	0,09±0,05	0,67±0,01
КЛ	1,3±0,2	0,9±0,2		0,7±0,4	-	-
ФК	1,9±0,1	0,4±0,2	0,58±0,05	0,53±0,05	0,5±0,2	0,5±0,3
Доля ФЛ в составе общих липидов, %	71±4	41±2	79,9±0,9	42,3±0,3	59±4	56±4

Таблица 3.2. Фракционный состав сфингомиелина из мозга быка (ДВГУ)

Фракция, % Р	1	2	3	4	5	6	7
ЛФХ	1,2±0,3	0,82±0,03	0,66±0,05	0,8±0,1	2,6±0,1	0,8±0,2	0,84±0,06
СМ	92 ±1	97,2±0,5	95,7±0,4	95,0±0,3	91,1±0,6	92,8±0,4	96,7±0,4
ФХ	1,0±0,1	1,0±0,3	0,71±0,03	0,89±0,05	1,3±0,3	0,3±0,1	0,8±0,1
ФИ	2,0±0,7	0,3±0,2	0,7±0,16	0,5±0,1	1,2±0,2	0,3±0,1	0,3±0,1
ФС				0,6±0,1			0,2±0,1
ФЭ			1,3±0,5	0,6±0,1	1,15±0,07		1,6±0,1
ФГ	1,6±0,6	0,05±0,02	0,3±0,1	0,48±0,01	1,1±0,1	1,1±0,3	0,4±0,2
КЛ	1,1±0,5	0,02±0,01	0,10±0,04	0,7±0,2	0,9±0,3	1,7±0,5	0
ФК	0,6±0,2	0,63±0,09	0,5±0,1	0,48±0,07	0,68±0,04	1,4±0,1	0,26±0,04
Доля ФЛ в составе общих липидов, %	52±1	75±4	56±2	81±2	50±2	71±3	44±1

Таблица 3.3. Фракционный состав препаратов L-α-Serphalin из мозга быка (Sigma)

Фракция, % Р	1	2	3	4	5	6
ЛФХ	2,8±0,2	1,1±0,1	4,0±0,2	3,5±0,4	3,2±0,1	4,2±0,1
СМ	3,8±0,4	1,5±0,2	2,4±0,1	4,5±0,3	2,9±0,3	5,2±0,4
ФХ	14,2±0,8	2,8±0,1	12,4±0,4	2,5±0,3	3,5±0,3	3,1±0,3
ФИ	2,29±0,08	16,1±0,3	5,2±0,2	13±1	12,7±0,08	13,6±0,9
ФС	4,5±0,4	4,5±0,2		5,8±0,4	3,8±0,3	1,4±0,1
ФЭ	64±1	65,8±0,6	70±1	65,2±0,9	66,2±0,5	67±1
ФГ	2,19±0,09	2,0±0,1	-	2,4±0,2	2,0±0,2	1,3±0,1
КЛ	5,0±0,3	4,56±0,08	1,69±0,09		3,2±0,4	1,4±0,2
ФК	1,8±0,3	1,73±0,05	4,1±0,2	3,6±0,3	2,5±0,6	2,8±0,2
Доля ФЛ в составе общих липидов, %	52±3	70±2	77±3	53±4	44±3	44±0,4

Смесь природных липидов по данным ТСХ (таблица 3.4) характеризуется самым высоким содержанием лизоформ ФЛ по сравнению с другими изученными препаратами.

Таблица 3.4. Фракционный состав различных препаратов ФЛ: 1 столбец - смесь природных липидов; 2 и 3 столбцы - яичный L- α -Phosphatidylcholine (Sigma); 4 столбец - Sphingomielin из мозга быка (Fluka); 5 столбец - L- α -Phosphatidylethanolamine из яичного желтка (Sigma)

Фракция, % Р	1	2	3	4	5
ЛФХ	34±1	1,4±0,3	-	0,48±0,07	3±2
СМ	11,8±0,3	0,6±0,2	2,3±0,2	93,3±0,4	2,2±0,5
ФХ	36±1	95±1	96,5±0,7	0,49±0,09	3±1
ФИ	7,3±0,3	1,3±0,4	-	2,06±0,08	6±2
ФС	4,2±0,3	-	-	-	3,0±0,8
ФЭ	2,8±0,2	0,6±0,1	-	0,9±0,2	70±8
ФГ	1,6±0,2	0,6±0,1	-	0,66±0,03	6±1
КЛ	0,86±0,06	-	-	1,1±0,2	5,0±0,9
ФК	0,89±0,09	0,7±0,3	1,2±0,5	1,0±0,1	1,7±0,2
Доля ФЛ в составе общих липидов, %	53±4	59±3	66±3	62±4	21±2

Кроме того, следует отметить достаточно высокое содержание в составе ее ФЛ наиболее трудноокисляемых фракций ФХ (36 %) и СМ (11,8 %). Столь существенную лабильность качественного и количественного состава препаратов природных ФЛ необходимо учитывать при анализе их физико-химических характеристик.

§ 3.2 Анализ УФ-спектров фосфолипидов

Методом УФ-спектроскопии были исследованы следующие препараты ФЛ: ЛС, СМ и кефалин. Несмотря на определенные различия, в УФ спектрах

всех изученных ФЛ (рис. 3.1) наблюдается интенсивная полоса поглощения в диапазонах длин волн при 196 ± 3 , 198 ± 3 и 202 ± 3 для препаратов ЛС, СМ и кефалина соответственно. Как уже отмечалось, максимум полосы в области $\lambda=200\pm 5$ нм, как считается, обусловлен $n\rightarrow\sigma^*$ переходом, характерным в частности для соединений, содержащих гетероатомы с неподеленной электронной парой, а также $\pi\rightarrow\pi^*$ переходами несопряженных двойных связей. Поскольку в составе любых липидов присутствуют атомы О и N, а также двойные связи в β -жирнокислотных цепях ФЛ, то появление интенсивной полосы в данной области длин волн закономерно, а величину максимума рассматривают как количественную меру содержания липидов в биологическом материале [Каган и др. 1986; Шведова, Полянский, 1992].

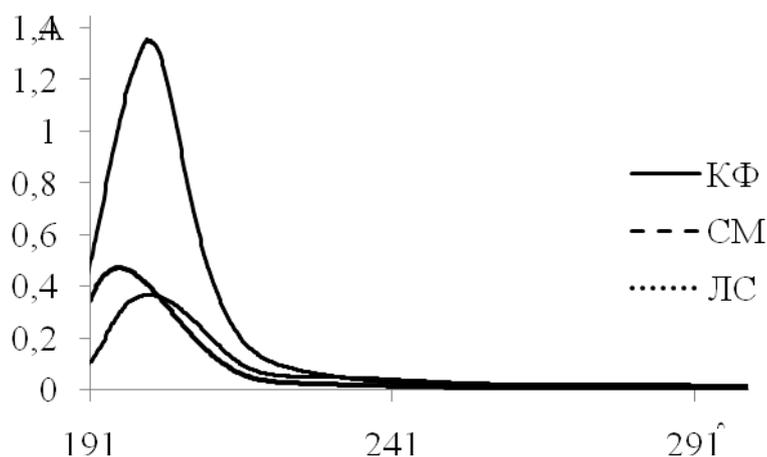


Рис. 3.1. УФ-спектры исследованных препаратов фосфолипидов :
 $[ЛС]=4,4\times 10^{-6}$ моль/л, $[СМ]=2,2\times 10^{-5}$ моль/л, $[КФ]=4,4\times 10^{-6}$ моль/л

Изучение концентрационных зависимостей поглощения растворов данных ФЛ в гексане показало, что прямолинейная зависимость между оптической плотностью растворов и концентрацией ФЛ в области основной полосы поглощения ФЛ сохраняется в относительно узком диапазоне концентраций [Маракулина и др, 2011]. Так, сохранение закона Бугера-Ламберта-Бера обнаружено для КФ и ЛС в диапазоне концентраций $(0,88 - 8,8)\times 10^{-5}$ моль/л и $(0,44 - 3,08)\times 10^{-4}$ моль/л для СМ (рис. 3.2). Различие

диапазона концентраций, в котором сохраняется выполнение закона Бугера-Ламберта-Бера, обусловлено, по-видимому, природой молекул и различными коэффициентами молярной экстинкции. Снижение оптической плотности растворов с ростом концентрации ФЛ, возможно, связано с агрегацией их молекул. Кроме того, был обнаружен батохромный сдвиг основной полосы поглощения при повышении концентрации ФЛ в гексане, что проиллюстрировано на рис. 3.3 на примере растворов КФ. Наличие батохромного сдвига, возможно, обусловлено увеличением полярности раствора с ростом концентрации ФЛ в гексане, поскольку в молекулах ФЛ присутствуют полярные группы.

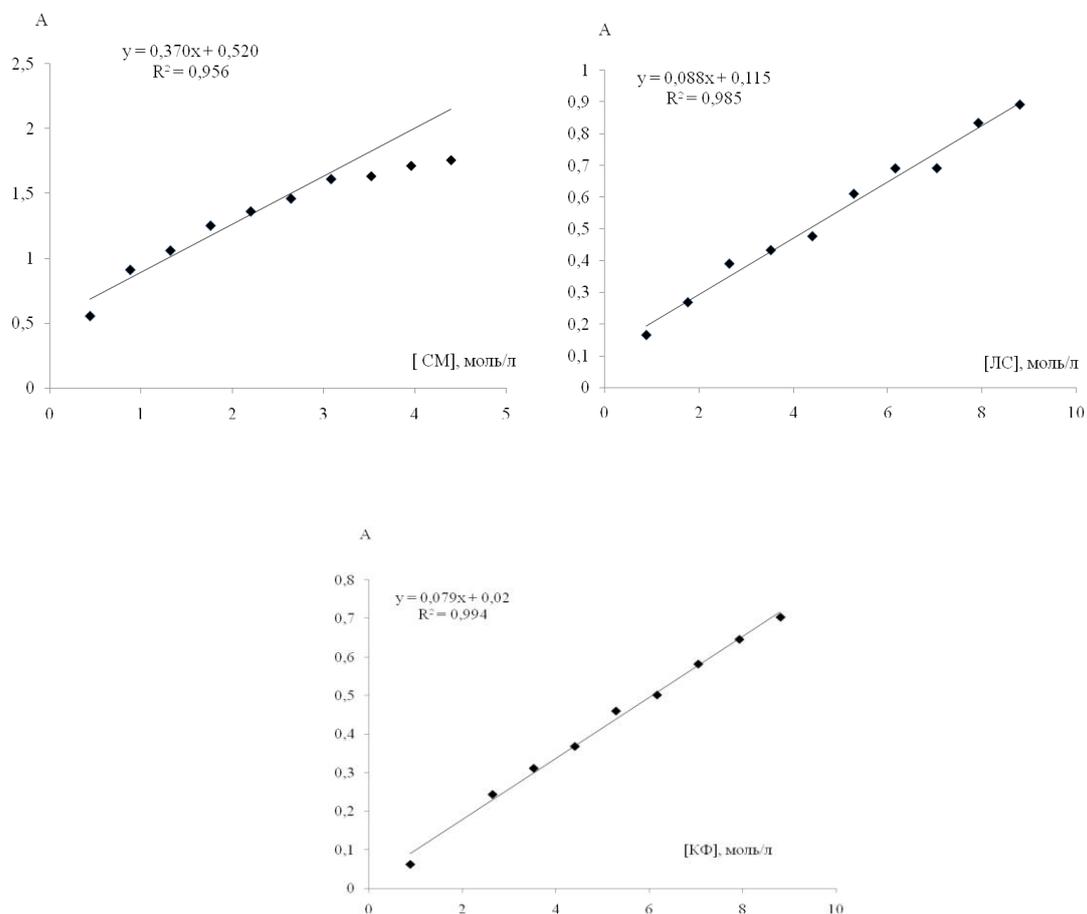


Рис. 3.2. Концентрационные зависимости поглощения растворов исследованных препаратов ФЛ: а – СМ (партия № 2); б – ЛС (партия № 3), в – КФ (партия № 3) в области длин волн близких к 200 нм.

В зависимости от количества сопряженных двойных связей в жирнокислотных цепях ФЛ наблюдается пик или плечо при $\lambda=230\pm 2$ нм. Данную полосу поглощения ассоциируют с $\pi\rightarrow\pi^*$ переходами сопряженных π -электронов (§1.2). По отношению поглощения при 230 нм к поглощению основной полосы обычно судят об относительном содержании диеновых конъюгатов (ДК) в липидах [Шведова, Полянский, 1992]. В связи с вариабельностью относительного содержания фракций ФЛ в коммерческих препаратах, уровень ДК в них также не является постоянным [Маракулина и др., 2016], что видно из данных обобщенных в таблице 3.5.

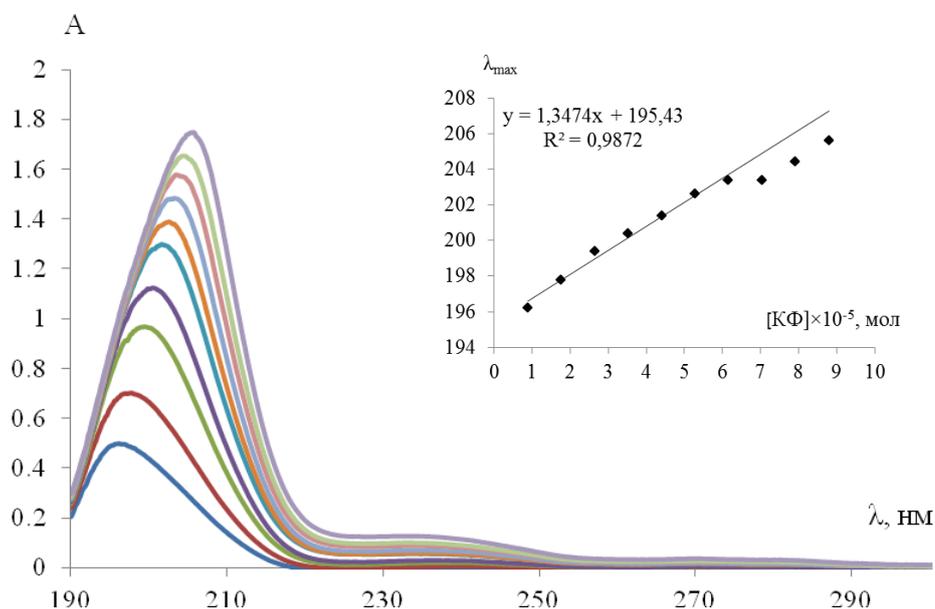


Рис. 3.3. Батохромный сдвиг при повышении концентрации КФ от $8,8\times 10^{-6}$ моль/л до $8,8\times 10^{-5}$ моль/л (партия 2).

При характеристике препаратов ФЛ также необходимо учесть относительное количество кетодиенов (КД), наличие которых определяется полосой поглощения в диапазоне длин волн 270 ± 3 нм, обусловленной $\pi\rightarrow\pi^*$ переходами π -электронов неподелённых электронных пар кислорода. Результаты анализа содержания кетодиенов, которые обычно оценивают по отношению A_{270}/A_{200} , также приведены в таблице 3.5.

Известно, что СМ является одной из наиболее насыщенных фракций ФЛ, в связи с этим в УФ-спектрах растворов синтетического СМ не наблюдается полос поглощения при длинах волн, характерных для поглощения ДК и КД. Однако анализ данных таблицы 3.5 показывает, что величины отношения поглощения в области 230 и 270 нм к поглощению максимума отличны от нуля, а содержание ДК и КД существенно зависит от фракционного состава препарата ФЛ [Маракулина и др., 2016]. Существенное различие в содержании ДК и КД между партиями СМ 2 и 3, возможно, связано со значительным отличием в суммарном содержании более легко окисляемых фракций ФЛ. Так, отношение $\Sigma\text{ЛОФЛ}/\Sigma\text{ТОФЛ}$ в партии 2 составляет 0,0099, а в партии 3 – 0,030. А достаточно близкие значения ДК в препаратах СМ и ЛС, возможно, связано с тем, что исходные препараты ФЛ получены из разных биологических объектов. Однако, анализ результатов таблицы 3.5 показал, что среди исследованных препаратов соевый ЛС и СМ характеризуются более низким уровнем ДК и КД по сравнению с КФ, основной фракцией которого является ФЭ (таблица 3.3).

Таблица 3.5. Относительное содержание диеновых конъюгатов и кетодиенов в изученных фосфолипидах

	ЛС	СМ	КФ
ДК	0,065±0,008 (партия 3)	0,072±0,007 (партия 2)	0,09±0,02
	0,042±0,006 (партия 5)	0,095±0,004 (партия 3)	
КД	0,030±0,006 (партия 3)	0,029±0,004 (партия 2)	0,041±0,004
	0,013±0,004 (партия 5)	0,04±0,01 (партия 3)	

Как известно, состав жирных кислот ФЭ наименее насыщен по сравнению со СМ и ФХ [Крепс, 1981], поэтому ФЭ обладает более высокой окисляемостью, чем ФХ и СМ [Аристархова и др., 1976]. Высокая степень насыщенности СМ обуславливает его чрезвычайную устойчивость к

окислению, и, возможно, является одной из причин его преимущественной локализации во внешнем слое биологических мембран.

§ 3.3 Анализ ИК-спектров фосфолипидов: зависимость показателей от концентрации, времени экспозиции растворов и полярности растворителя

Как отмечалось в литературном обзоре, ИК-спектры ФЛ чрезвычайно сложны в связи со сложностью строения их молекул. На рис. 3.4 представлены типичные ИК-спектры растворов препаратов ЛС и СМ в неполярном растворителе *n*-гексане. Как видно, наблюдаются полосы колебаний следующих связей:

C_{sp^3} -H: валентные 2998 см^{-1} , деформационные при 1470 см^{-1} и 1380 см^{-1} ; валентные колебания метиленовых групп (-CH₂-) при 2920 см^{-1} ;

C_{sp^3} - C_{sp^3} : валентные при 1123 см^{-1} , деформационные 1375 см^{-1} ;

C=O (сложноэфирная): валентные при 1742 см^{-1} , деформационные 1198 см^{-1} (кроме растворов СМ);

N-C: валентные при 967 см^{-1} ;

C-P: валентные при 810 см^{-1} .

В ИК-спектрах СМ в гексане помимо выше перечисленных были обнаружены валентные колебания N-H связи амидной группировки в области 3400 см^{-1} – 3300 см^{-1} , связанной водородными связями. А вот полоса валентных колебаний C=O связи при амидной группировке смещается в более длинноволновую область и обнаруживается при 1640 см^{-1} , что соответствует данным литературы [Пентин, Вилков, 2009; Беллами, 1963]. Следовательно в ИК-спектрах всех препаратов природных ФЛ было обнаружено большое число полос колебаний. Однако в дальнейших исследованиях максимальные изменения параметров были выявлены для валентных колебаний C=O связи сложноэфирной и амидной групп, N-H связи амидной группы и колебания N-C связи холиновой группировки

[Маракулина и др, 2012-а], характеристические частоты колебаний которых располагаются в следующих областях. Полоса валентных колебаний N-H связи аминогруппы (свободной и связанной внутри- и межмолекулярными N-связями) в диапазоне частот от 3200 см^{-1} до 3500 см^{-1} ; полоса валентных колебаний сложноэфирной C=O группы, которая, по данным литературы, для индивидуальных химических соединений является одной из наиболее устойчивых и слабо зависит от полярности растворителя и заместителей при данной группировке и проявляется при частоте 1742 см^{-1} ; полоса валентных колебаний N-C связи холиновой группировки при 970 см^{-1} .

Как видно из рис. 3.4-а, полоса поглощения при 3500 см^{-1} в области валентных колебаний N-H практически отсутствует, что соответствует химическому строению основной фракции ЛС – фосфатидилхолина (рис 2.1). Тогда как в ИК-спектрах растворов СМ наблюдается полоса поглощения в диапазоне частот от 3400 см^{-1} до 3300 см^{-1} , что соответствует валентным колебаниям N-H группы, связанной межмолекулярными водородными связями (рис. 3.4-б). При условии, что между молекулами в растворе нет взаимодействия, интенсивность колебаний в ИК диапазоне в зависимости от концентрации должна иметь линейный характер. Однако было установлено, что рост интенсивности полос поглощения при повышении концентрации ФЛ носит нелинейный характер (рис. 3.5 и 3.6), что свидетельствует об участии данных группировок в процессе ассоциации молекул ФЛ. Предполагая, что об участии данных группировок свидетельствует степень их отклонения от линейной зависимости, можно сделать вывод, что наибольшая вовлеченность в процесс ассоциации была обнаружена для N-C связи холиновой головки (рис. 3.6).

Кроме того было установлено, что ИК-спектры растворов ЛС и СМ в гексане во всех исследованных концентрациях изменяются во времени. Детально динамика ИК-спектров растворов ЛС во всех исследованных концентрациях представлена на рис. 3.7 и 3.8. Как видно, во времени сильнее

всего изменяются характеристики колебаний сложноэфирной C=O группы, что свидетельствует о ее вовлеченности в процесс агрегации молекул ФЛ.

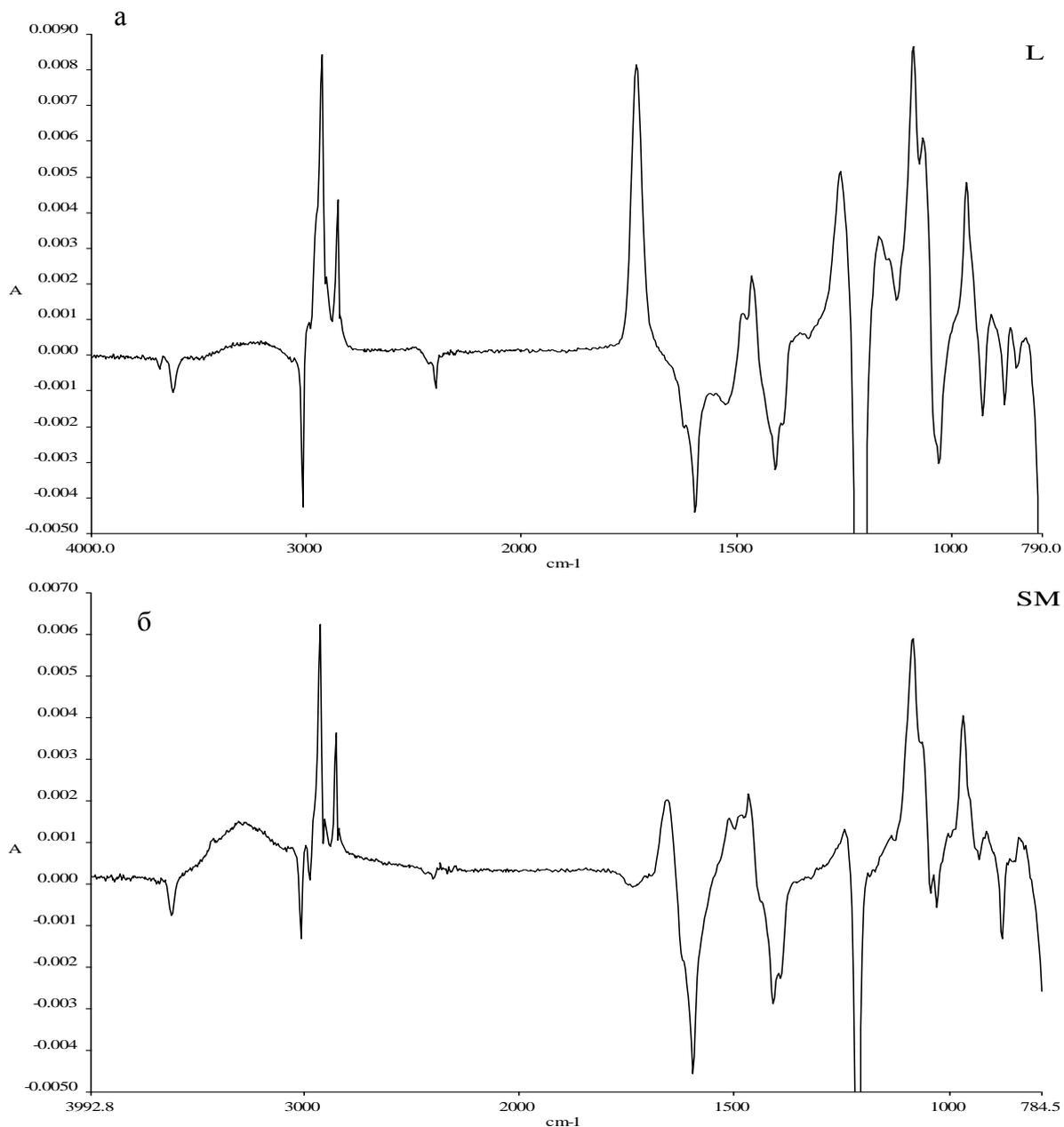


Рис. 3.4. Типичные ИК-спектры препаратов ФЛ в гексане при концентрации 10^{-2} моль/л при времени экспозиции растворов не более 15 минут: а – ЛС (партия № 7), б – СМ (партия № 6).

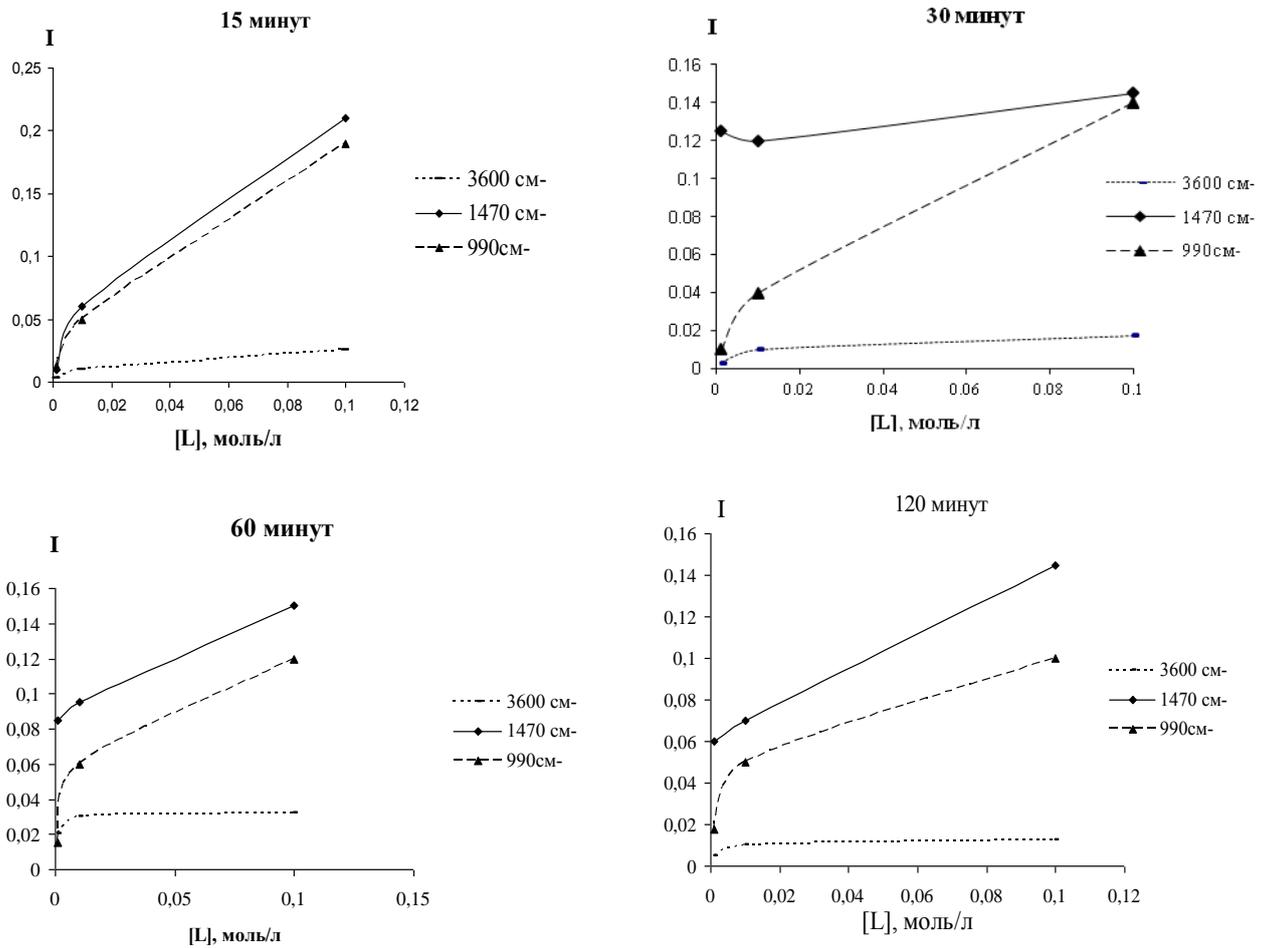


Рис. 3.5. Зависимость интенсивности колебания О-Н, C_{SP3} -Н, N-C связей от концентрации ЛС (партия № 7) при различных временах экспозиции растворов.

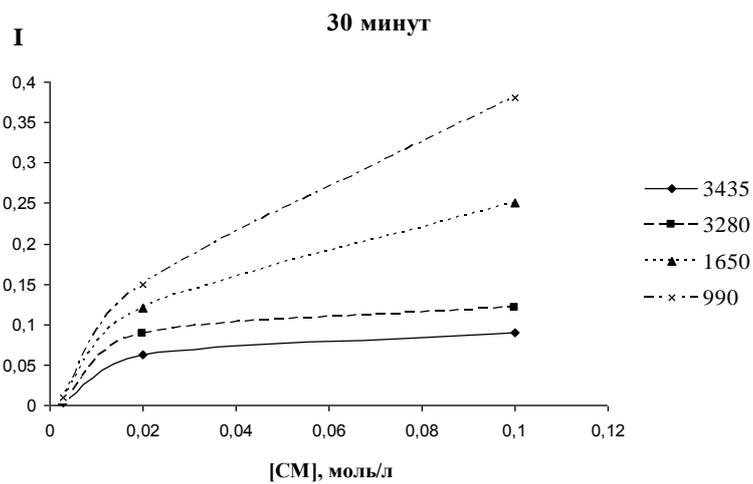


Рис. 3.6. Зависимость интенсивности колебания О-Н, N-Н, C_{SP3} -Н, N-C связей от концентрации СМ (партия № 6) в растворе, время экспозиции раствора 30 минут.

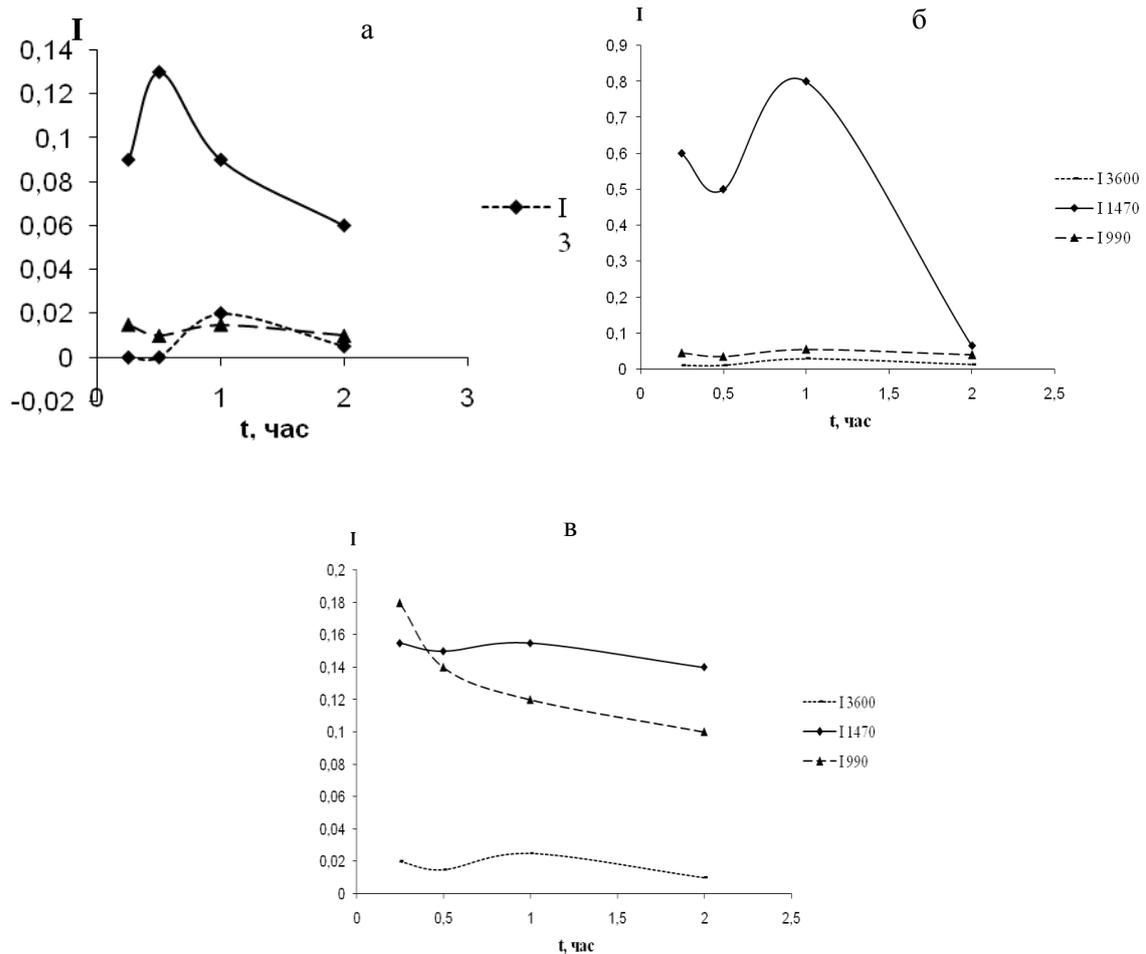


Рис. 3.7. Изменение интенсивности валентных колебаний растворов ЛС (партия № 7) во времени при концентрации: а – 0,001 моль/л; б – 0,01 моль/л; в – 0,1 моль/л.

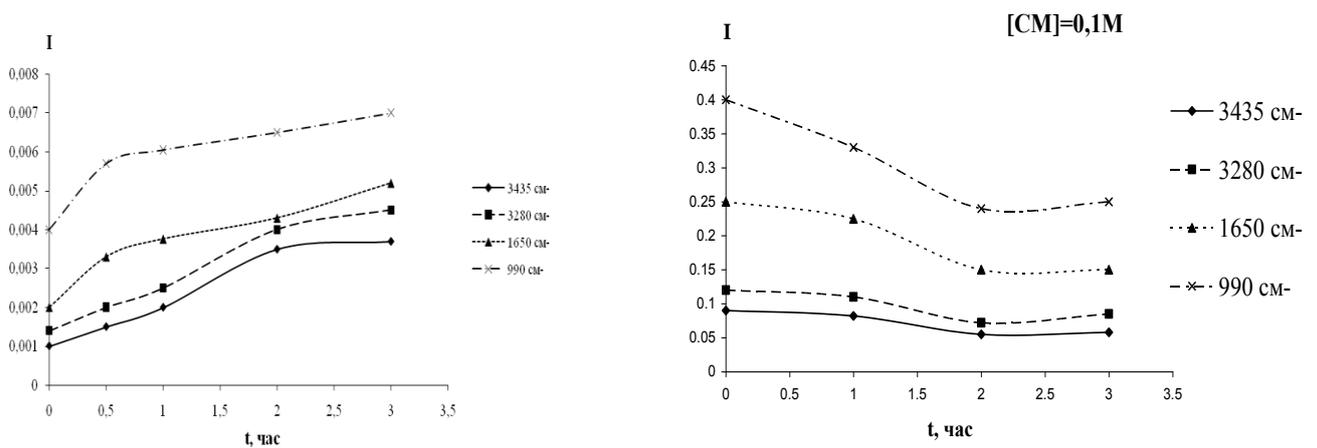


Рис. 3.8. Изменение интенсивности валентных колебаний растворов СМ (партия № 6) во времени при концентрации: а – 0,003 моль/л; б – 0,1 моль/л.

Следующим этапом работы явилось изучение влияния полярности растворителя на ИК-характеристики растворов ФЛ [Маракулина и др., 2012-б]. Данные обобщены в таблицах 3.6 и 3.7.

Таблица 3.6. Характеристики полос ИК-спектров ЛС (партия № 7) при $[ЛС]=10^{-2}$ моль/л в различных растворителях.

	С-О связь валентные		С=О группа (сложноэфирная) валентные		N-С связь валентные	
	ν , см ⁻¹	I	ν , см ⁻¹	I	ν , см ⁻¹	I
Гексан	3398	0,0025	1740	0,0092	970	0,0075
Хлороформ	3303	0,0021	1733	0,0024	967,5	0,015
Этанол	3434 3211	0,12 0,09	1650	0,10	910	0,05

Как видно из представленной таблицы, при увеличении полярности, но сохранении апротонности растворителя (при переходе от гексана к хлороформу) интенсивность колебаний сложноэфирной С=О группы уменьшается 3,8 раза, а интенсивность валентных колебаний N-С связи увеличивается в два раза.

Значительный рост интенсивности колебаний вышеупомянутых полос наблюдается в ИК-спектрах ЛС в полярном растворителе – этаноле. Наибольший рост интенсивности, практически в 50 раз, обнаружен для полосы валентных колебаний С-О связи ЛС при переходе от апротонных растворителей к этанолу, что свидетельствует об участии этой группы в образовании межмолекулярных Н-связей с молекулами этанола. При этом в ИК-спектрах СМ в хлороформе были обнаружены валентные (3411 см⁻¹) и

деформационные (1640 см^{-1}) колебания N-H связи, не связанной водородными связями аминогруппы.

Таблица 3.7. Характеристики полос ИК-спектров СМ (Fluka) при $[\text{СМ}] = 10^{-2}$ моль/л в различных растворителях.

	N-H связь валентные		C=O связь (амидная) деформационные		N-C связь валентные	
	$\nu, \text{см}^{-1}$	I	$\nu, \text{см}^{-1}$	I	$\nu, \text{см}^{-1}$	I
Гексан	3398	0,002	1650	0,0003	969	0,0004
Хлороформ	3293	0,009	1657	0,0010	967	0,0014
Этанол	3506	0,0025	1649	0,0045	960	0,0042
	3202	0,00325				

Как видно из таблицы 3.7, интенсивность всех изучаемых полос колебаний СМ растет с увеличением полярности растворителя. Дальнейшие исследования явления комплексообразования ФЛ с АО методом ИК-спектроскопии были проведены для хлороформных и этанольных растворов по двум причинам: во-первых, ограниченная растворимость СМ в гексане и, во-вторых, более высокие значения интенсивностей колебаний всех групп СМ в хлороформе и этаноле.

§ 3.4 Способность к самоорганизации препаратов природных фосфолипидов в различных растворителях

Как отмечалось, ФЛ в своей структуре содержат и полярные группировки, и неполярные жирнокислотные цепи, поэтому они способны к самоорганизации как в полярных, так и в неполярных растворителях. При этом в полярных растворителях они образуют прямые мицеллы, а в

неполярных – обращенные мицеллы, размер которых может зависеть не только от состава и природы ФЛ, но и от его концентрации и времени экспозиции раствора ФЛ. Изучение влияния концентрации и природы ФЛ на размер образуемых агрегатов проводилось для серий растворов СМ (партия № 2) и ЛС (партия № 3) в гексане в диапазоне концентраций от 18,1 до 91,4 мкг/мл [Маракулина и др., 2011]. Как видно из данных, представленных на рис. 3.9, все агрегаты ЛС можно разделить на три основные группы: мелкие частицы с диаметром 12-27 нм, частицы среднего диаметра – 140-370 нм и крупные агрегаты с диаметром свыше 2500 нм.

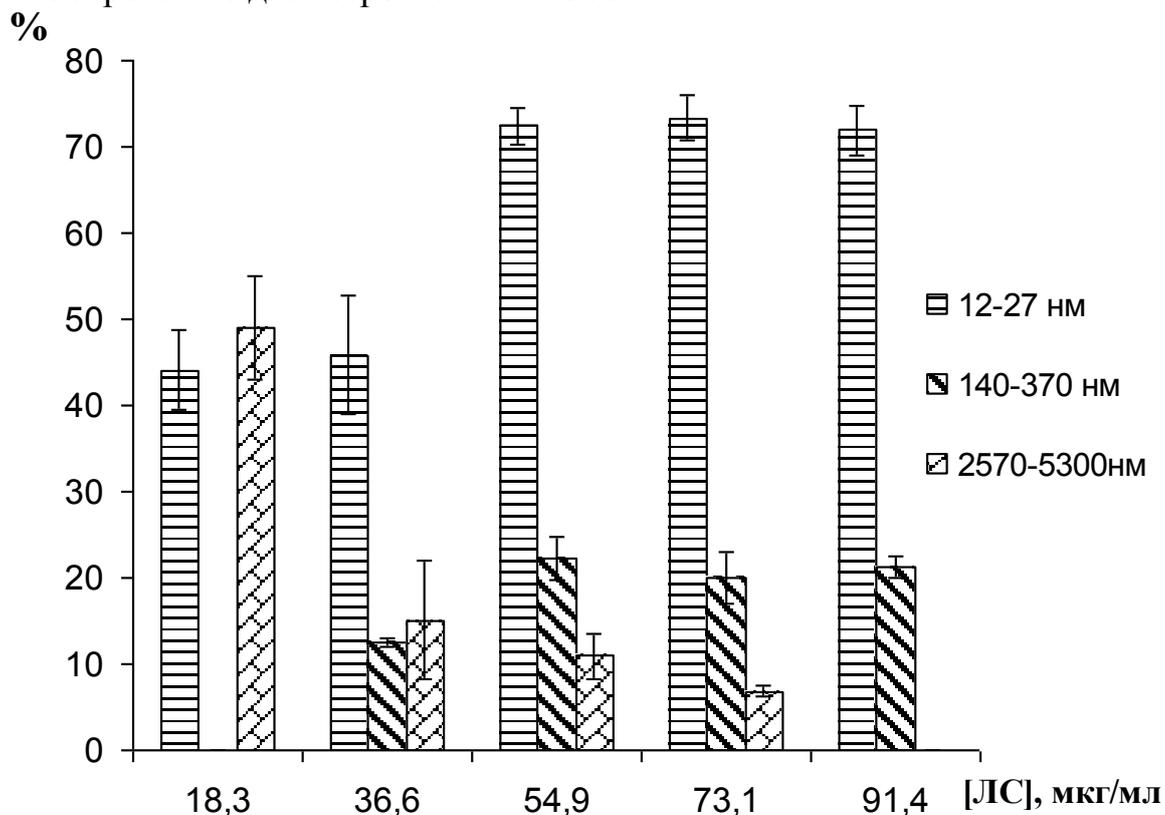


Рис. 3.9. Влияние концентрации ЛС (партия № 3) на процентное соотношение агрегатов различного размера

Снижение доли крупных частиц в 7 раз с ростом концентрации ЛС в гексане, очевидно, обусловлено наличием в препаратах ЛС достаточно высокого содержания лизоформ ФЛ (табл. 3.1), которые характеризуются выраженными детергентными свойствами [Геннис, 1997]. Данные эксперимента позволяют предположить, что равновесными частицами ЛС в

гексане являются частицы меньшего диаметра, а процесс самоорганизации протекает во времени.

В отличие от ЛС, растворы СМ, доля ЛФХ в котором в 4,4 раза ниже по сравнению с ЛС (табл. 3.1 – 3.2), в гексане в диапазоне концентраций от 36,2 до 90,5 мкг/мл характеризуются высокой степенью однородности (доля основной фракции мицелл составляет 97-100 %). Только при самой низкой из исследованных концентраций СМ (18,1 мкг/мл) основной фракцией являются агрегаты с диаметром 5160 ± 80 нм ($88,4 \pm 6,8\%$).

Кроме того, при изучении мицеллообразования ЛС и СМ в зависимости от концентрации ФЛ в гексане (Маракулина и др., 2011, 2016) было обнаружено, что размер агрегатов основной фракции нелинейно зависит от концентрации исходного ФЛ (рис. 3.10-а и рис. 3.10-б). Это может свидетельствовать о сложности процесса самоорганизации ФЛ в неполярном растворителе, что подтверждают и результаты экспериментов по влиянию состава ФЛ на динамику размера частиц [Маракулина и др., 2011]. равновесных агрегатов СМ.

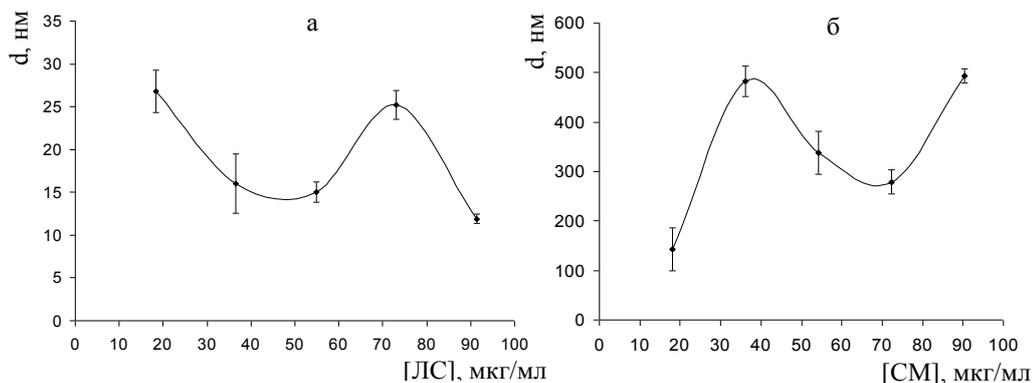


Рис. 3.10. Зависимость размера агрегатов от концентрации фосфолипидов в гексане: а – ЛС (партия № 3), б – СМ (партия № 2).

Как видно из рис. 3.11-а, экспозиция раствора СМ (партия 3) в течение 180 мин. не приводит к появлению существенно различающихся по размеру агрегатов. Размеры мицелл, преимущественно содержащихся в растворе СМ,

изменяются в диапазоне от $48,8 \pm 2,1$ нм до $58,7 \pm 2,5$ нм. Такое постоянство размеров частиц свидетельствует о достаточно быстром образовании

Для раствора ЛС (партия № 4) (рис. 3.11-б), несмотря на увеличение вариабельности среднего размера агрегатов в 2 раза, наблюдается достоверный рост размера агрегатов в 2,25 раза с увеличением времени экспозиции. При этом для растворов КФ (партия № 1) (рис. 3.11-в) в связи с увеличением вариабельности среднего размера агрегатов в 2,8 раза не обнаруживается достоверного изменения размера частиц.

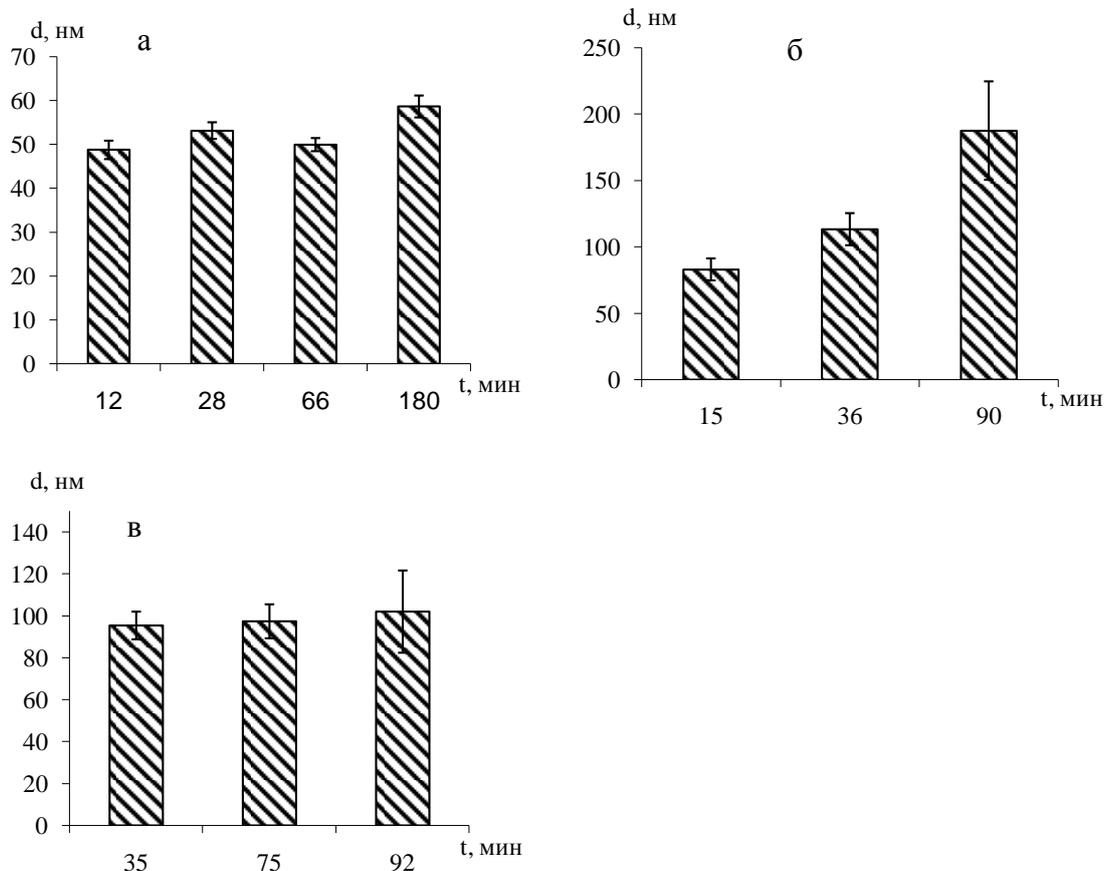


Рис. 3.11. Влияние времени экспозиции растворов на размер основной фракции агрегатов фосфолипидов: а – сфингомиелина, [СМ]=35 мкг/мл (партия № 3), б – лецитина, [ЛС]=20 мкг/мл (партия № 4), в – кефалина, [КФ]=20 мкг/мл (партия № 1)

Корреляционный анализ данных мицеллообразования ФЛ в гексане показал, что для растворов лецитина важную роль играет отношение ЛФХ/ФХ. При росте данного показателя наблюдается уменьшение диаметра мицелл основной фракции: при ЛФХ/ФХ=0,039±0,004 гидродинамический диаметр мицелл равен 182,8±25,6 нм, а при ЛФХ/ФХ=0,048±0,003 диаметр основной фракции изменялся в диапазоне 64,7 – 102,2 нм. Интересно отметить, что уменьшение концентрации ФЛ в растворе приводит к снижению степени взаимосвязанности между этими параметрами. Для растворов СМ при концентрации 35-36 мкг/мл наблюдается линейный рост размера агрегатов при увеличении суммарного содержания СМ и ФХ (рис. 3.12-а), т.е. компонентов, которые поддерживают ламелярную структуру клеточных мембран. При уменьшении концентрации СМ до 18-20 мкг/мл эта закономерность хотя и сохраняется, но имеет только характер тенденции. Для растворов L- α -Cephalin было показано, что при увеличении суммарной доли ФЭ и ЛФХ уменьшается размер агрегатов основной фракции (рис. 3.12-б), что может быть обусловлено детергентными свойствами ЛФХ и ФЭ [Геннис, 1997].

Глава 4. Физико-химические характеристики фенольных антиоксидантов

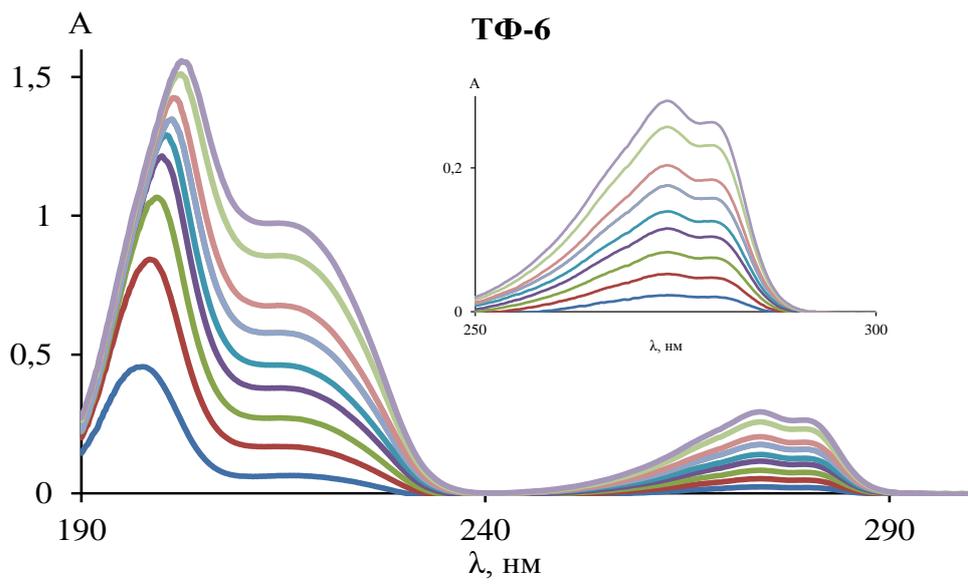
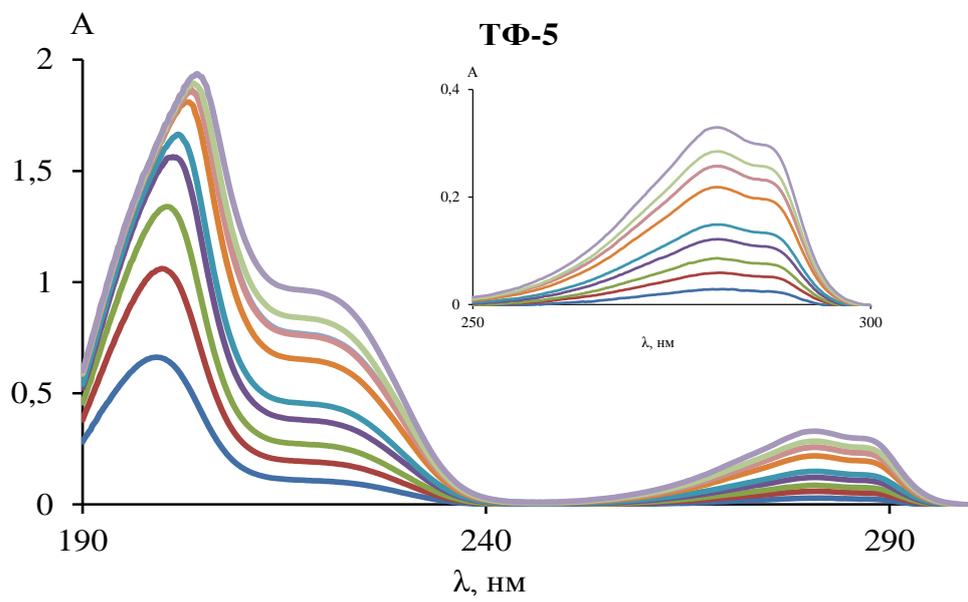
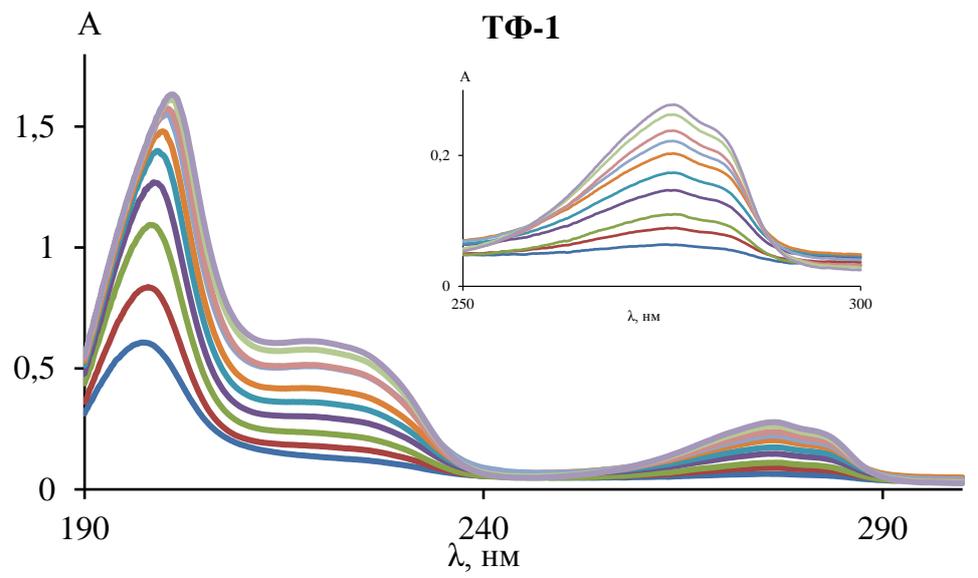
Препараты фенольных антиоксидантов, синтезированные в Институте химии Коми НЦ, представляют собой твердые бесцветные вещества, за исключением ТФ-8, обладающего бледно-желтой окраской. Ранее в работах [Мазалецкая и др., 2010-а, 2011] было показано, что фенолы данного ряда являются эффективными АО свойства в реакции инициированного окисления этилбензола, что требует дальнейшего исследования изоборнилфенолов (ИБФ) с точки зрения возможностей их практического использования в промышленности и в медицине. Для этого в качестве первого этапа работы

необходимо исследовать их физико-химические характеристики, что позволит более адекватно интерпретировать данные по участию ИБФ в регуляции процессов окисления в системах различной степени сложности и их способности взаимодействовать со структурными компонентами клеточных мембран.

§ 4.1 Анализ УФ-спектров

Фенольные антиоксиданты были исследованы методом УФ-спектроскопии в двух диапазонах концентраций: $8,8 \times 10^{-6}$ - $8,8 \times 10^{-5}$ моль/л и $4,4 \times 10^{-5}$ - $4,4 \times 10^{-4}$ моль/л [Маракулина и др. 2015]. Все исследованные фенолы в УФ-спектрах имеют три полосы поглощения (рис. 4.1 а-е): в области 200 ± 5 нм полоса поглощения, связанная с $n \rightarrow \sigma^*$ переходами неподеленной электронной пары кислорода гидроксильной группы [Пентин, Курамшина, 2008]; при 215 ± 5 нм и 275 ± 5 нм, наблюдаются полосы поглощения, обусловленные $\pi \rightarrow \pi^*$ переходами π -электронной системы бензольного кольца (рис. 4.1 а-е) [Пентин, Курамшина, 2008]. Для всех фенолов в указанном диапазоне концентраций наблюдаются батохромные сдвиги полос поглощения ОН-группы (рис. 4.1) и отклонения от линейности зависимости оптической плотности от концентрации фенола, что показано на рис. 4.2 на примере ТФ-6. Как известно, батохромный сдвиг интенсивных полос поглощения характерен для органических соединений при наличии в молекуле гетероатома, а отклонения от линейности, возможно, обусловлены определенным увеличением полярности среды с ростом концентрации АО в связи с присутствием в их молекулах полярного ОН-заместителя. Напротив, положение полос, связанных с переходами π -электронной системы бензольного кольца, не изменяются при увеличении концентрации ИБФ.

Анализ зависимости поглощения от концентрации фенольных АО проводился для каждой из вышеописанных полос.



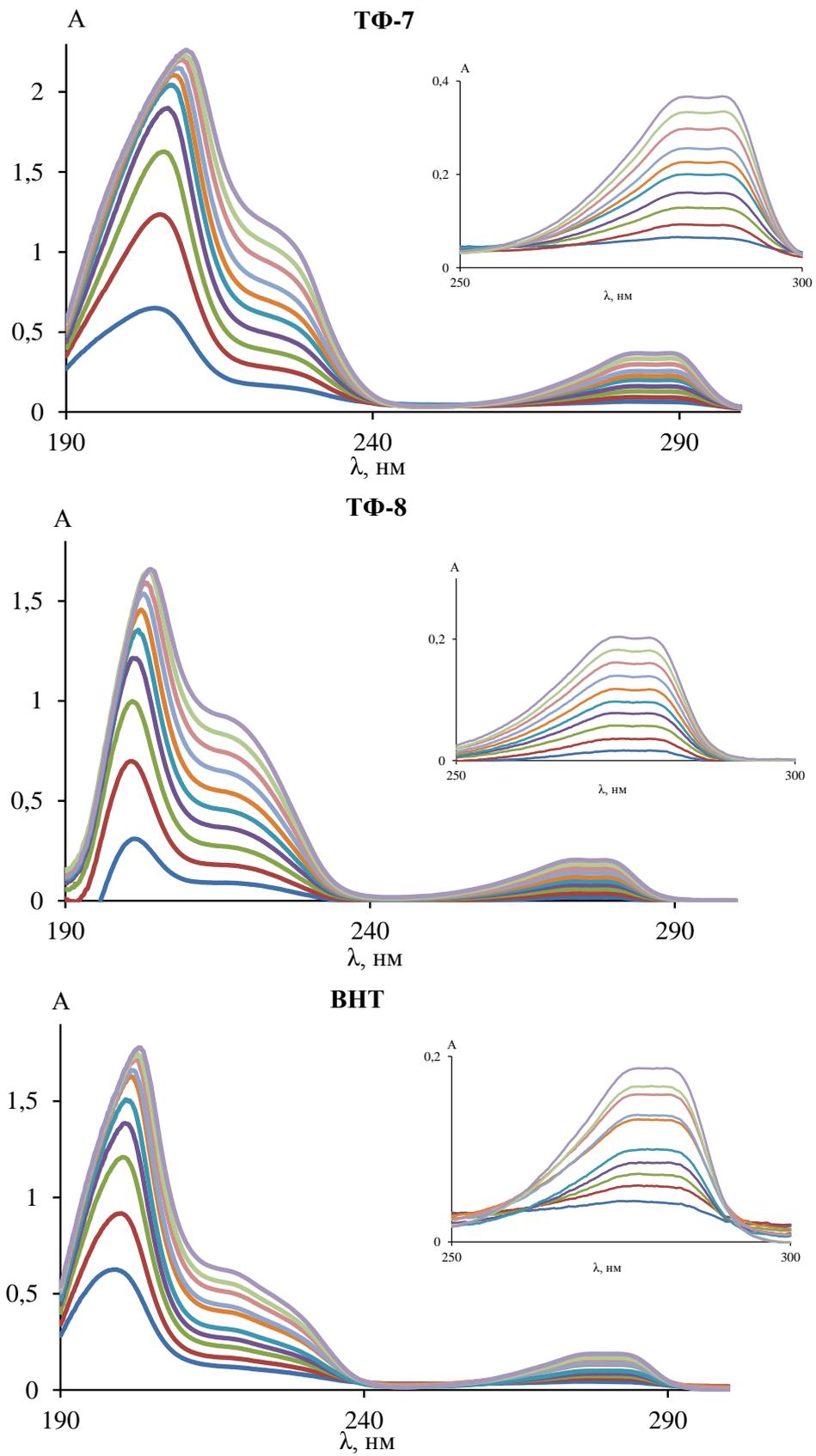


Рис. 4.1. УФ-спектры растворов изоборнилфенолов и ионола в гексане в диапазоне концентраций $8,8 \times 10^{-6}$ - $8,8 \times 10^{-5}$ моль/л

Как было обнаружено, закон Бугера-Ламберта-Бера во всем диапазоне концентраций сохраняется для полосы 275 ± 5 нм (рис. 4.3). Поэтому для дальнейших исследований использовали характеристики именно этой ПОЛОСЫ.

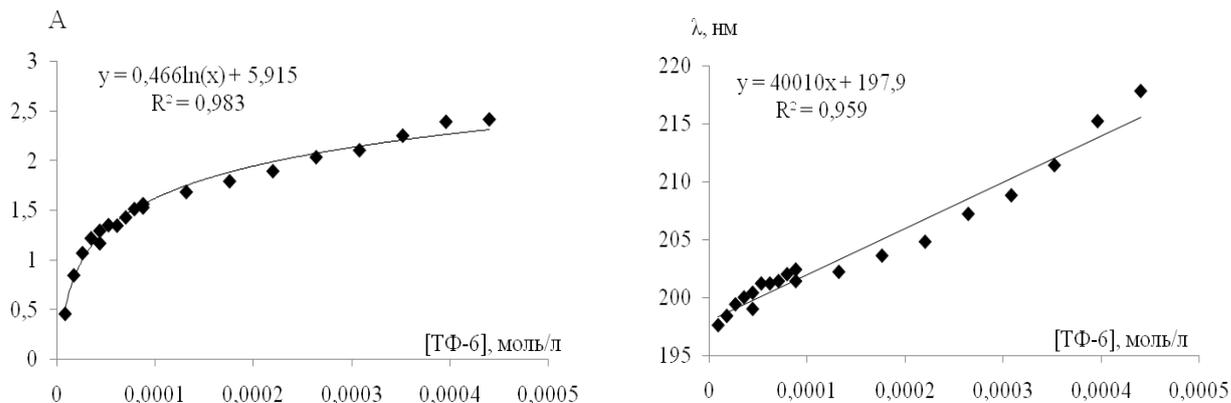


Рис. 4.2. Отклонение от линейности зависимости оптической плотности (а) и длины волны максимума полосы поглощения (б) от концентрации ТФ-6 в гексане.

Из данных литературы известно [Пентин, Курамшина Г.М., 2008; Преч и др., 2006; Пентин, Вилков, 2006; Свердлов, 1985; Иоффе и др., 1984], что на положение полос поглощения, связанных с переходами π -электронной системы бензольного кольца, влияют заместители, которые способны вступать в сопряжение с ароматическим кольцом. В структурах изученных фенолов присутствуют только четыре типа электронодонорных группировок: метильная, изоборнильная, изоборнилоксильная и *трет.*бутильная. Различное сочетание данных группировок оказывает влияние на положение максимумов полос при 215 ± 5 нм и 275 ± 5 нм, что видно из данных представленных в таблице 4.1.

Как видно из данных таблицы 4.1, явление батохромного сдвига при увеличении концентрации наблюдалось лишь для полосы поглощения, связанной с $n\rightarrow\sigma^*$ переходами неподеленных электронных пар кислорода гидроксильной группы. Также из представленной таблицы видно, что на положение полосы при 215 ± 5 нм влияет заместитель или его отсутствие в

орто-положении относительно гидроксильной группы. Так, в УФ-спектрах ТФ-7 все полосы поглощения заметно смещены сторону больших значений длин волн, что свидетельствует о влиянии электронодонорных свойств изоборнильной группы на данный параметр.

Таблица 4.1. Характеристики полос поглощения в УФ-спектрах растворов АО в н-гексане в диапазоне концентраций от $8,8 \times 10^{-6}$ до $4,4 \times 10^{-4}$ моль/л.

	$n \rightarrow \sigma^*$		$\pi \rightarrow \pi^*$		$\pi \rightarrow \pi^*$	
	λ_{\max} , нм	A	λ_{\max} , нм	A	λ_{\max} , нм	A
ВНТ	197-203	0,6-2,56	212	0,1-0,6	275	0,03-0,2
ТФ-1	197-203	0,6-2,63	212	0,1-0,6	276	0,03-0,3
ТФ-5	200-205	0,62-2,56	217	0,1-0,9	280	0,05-0,3
ТФ-6	197-203	0,41-2,42	212	0,1-1,0	273	0,05-0,3
ТФ-7	205-212	0,65-2,66	225	0,18-1,18	282	0,05-0,4
ТФ-8	202-206	0,32-2,46	212	0,09-0,91	272	0,02-0,2

Следует отметить и самые высокие показатели интенсивности всех полос поглощения в УФ-спектрах ТФ-7. Однако природа и электронодонорность заместителей в УФ-спектрах изученных фенолов в первую очередь влияют на интенсивность переходов неподеленных пар кислорода гидроксила и в меньшей степени влияют на переходы электронов π -электронной системы бензольного кольца. Из данного факта можно предположить, что на характеристики полос поглощения бензольного кольца заместители влияют лишь опосредованно, увеличивая сначала электронную плотность на атоме кислорода посредством прямого сопряжения, а потом увеличивается масштаб влияния мезомерного эффекта ОН-группы.

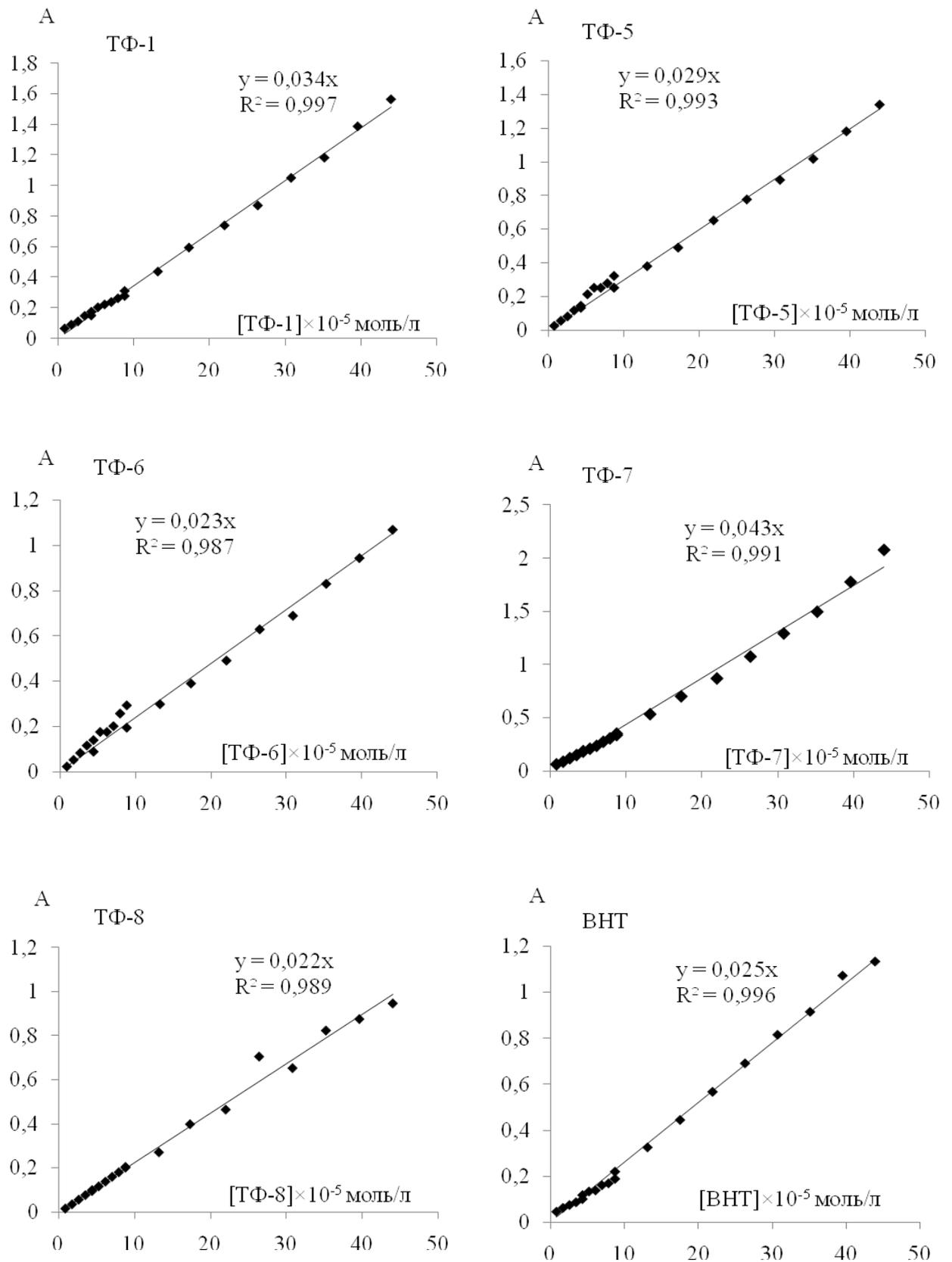


Рис. 4.3 Концентрационные зависимости поглощения растворов фенольных антиоксидантов в гексане в диапазоне концентраций $8,8 \times 10^{-6} - 4,4 \times 10^{-4}$ моль/л при $\lambda = 275$ нм.

Положение максимумов полос поглощения ТФ-1 и ТФ-6 находится при одних частотах, однако интенсивность поглощения гидроксильной группы в УФ-спектрах ТФ-1 несколько выше. Очевидно, сказывается наличие внутримолекулярной Н-связи между водородом гидроксила и кислородом изоборнилоксильной группы, доказанное ранее методом ИК-спектроскопии [Мазалецкая и др., 2011].

Из сравнения УФ-спектров ТФ-5, ТФ-6 и ТФ-8 видно, что наличие дополнительной электронодонорной группировки в положении прямого сопряжения с гидроксильной группой, незначительно смещает максимум данной полосы в длинноволновую область без изменений интенсивности поглощения, тогда как положение метильной группы в структуре значительного влияния ни на положение максимума, ни на его интенсивность не оказывает.

Коэффициент молярной экстинкции (ϵ) является параметром молекулы, зависит в идеале от длины волны и не зависит от концентрации и толщины поглощающего слоя. Полагают, что коэффициент поглощения при определенной длине волны связан с вероятностью соответствующих квантовых переходов. Величины молярных коэффициентов поглощения изученных соединений при длине волны 275 ± 5 нм определены (Маракулина и др., 2016) и приведены в таблице 4.2.

По увеличению коэффициента молярной экстинкции изученные ИБФ могут быть расположены в следующей последовательности: ТФ-8 < ТФ-6 < ВНТ < ТФ-5 < ТФ-1 < ТФ-7. Из данных таблицы 4.2. видно, что при введении в структуру фенола дополнительной метильной группы в *para*-положение (сравнение ТФ-6 и ТФ-5) приводит к значительному увеличению коэффициента молярного поглощения, что наиболее вероятно связано с электронодонорными способностями метильной группы.

Таблица 4.2. Коэффициенты молярной экстинкции для полосы поглощения антиоксидантов при 275 ± 5 нм.

Антиоксидант	λ_{\max} , нм	ϵ , моль ⁻¹ ×л×см ⁻¹
ВНТ	277	2640±25
ТФ-1	277	3420±30
ТФ-5	282	2898±35
ТФ-6	274	2287±40
ТФ-7	280	4458±65
ТФ-8	279	2232±40

Сравнивая величины ϵ для ТФ-8 и ТФ-5, можно видеть, что перемещение метильного заместителя из *орто*- в *пара*-положение приводит к достоверному увеличению коэффициента молярной экстинкции. При замене изоборнильного заместителя (ТФ-5) в *орто*-положении на изоборнилоксильный (ТФ-1) также наблюдается увеличение значения ϵ , что может быть связано с большей электронодонорной способностью алкоксильного заместителя по сравнению с алкильным. При введении в структуру ИБФ дополнительной изоборнильной группы в *орто*-положение (ТФ-7) приводит к резкому увеличению ϵ по сравнению с аналогичным значением для ТФ-5. Сравнительный анализ величины ϵ для ВНТ, ТФ-5 и ТФ-7 позволяет заключить, что изоборнильная группировка оказывает более существенное влияние на $\pi \rightarrow \pi^*$ переходы бензольного кольца по сравнению с *трет.*бутильной группой, обусловленные менее выраженными экранирующими свойствами и более высокой электронодонорной способностью изоборнильной группы [Мазалецкая и др., 2011; Шишкина и др., 2015].

§ 4.2 Анализ ИК-спектров

ИК-спектры исследованных фенолов чрезвычайно сложны, в них обнаружены следующие полосы колебаний: валентные колебания О-Н связи, колебания двойных связей, валентные колебания $C_{ар}$ -Н связи, валентные колебания C_{SP^3} -Н, валентные и деформационные колебания C_{SP^3} - C_{SP^3} , валентные колебания метиленовых групп ($-CH_2-$), валентные колебания $C_{ар}$ -О связи. ИК-спектры изученных соединений в области валентных колебаний ОН-группы представлены на рис. 4.4 [Шишкина и др., 2014].

По уменьшению значения частоты валентных колебаний О-Н связи исследованные фенолы образуют следующую последовательность:



Хотя однозначных выводов по влиянию структуры изоборнилфенолов на частоты колебаний тех или иных связей сделать нельзя, можно отметить, что на положение полосы колебаний О-Н связи влияют структурные особенности заместителей. Максимум полосы О-Н связи для ТФ-5 и ТФ-8 находится при одной частоте, а введение в структуру еще одной метильной группы (сравнение ТФ-5 и ТФ-50) приводит к незначительному смещению максимума в сторону больших значений частот. Однако ИБФ ТФ-5, ТФ-6, ТФ-7, ТФ-8 и ТФ-50, в молекулах которых отсутствует *трет.*бутильная группа в *о*-положении, обнаружена одна полоса колебаний ОН-связи в диапазоне ν от 3613 см^{-1} до 3623 см^{-1} (рис. 4.4.), что характерно для пространственно незатрудненных фенолов. В тоже время в ИК-спектрах ТФ-37 и ТФ-44, помимо основной полосы колебаний в области $3612-3613,5 \text{ см}^{-1}$, выявлена дополнительная гораздо менее интенсивная полоса с частотой колебаний $3655-3656 \text{ см}^{-1}$ (рис. 4.4.), что свидетельствует о частичном экранировании ОН-группы с молекулах этих ИБФ *трет.*бутильным заместителем, обуславливая снижение их реакционной способности [Шишкина и др., 2014].

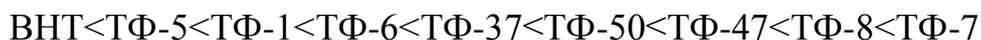
Частота колебаний О-Н связи ионола находится при самой большой частоте 3655 см^{-1} , что соответствует литературным данным для пространственно затрудненных фенолов [Рогинский, 1988]. У ТФ-1, для которого было доказано образование внутримолекулярной водородной связи [Мазалецкая и др., 2011] напротив, валентные колебания О-Н связи были обнаружены при самой маленькой частоте (таблица 4.3.).

Таблица 4.3. Частоты некоторых валентных колебаний для фенольных АО в гексане при $[\text{АО}] = 10^{-2}$ моль/л.

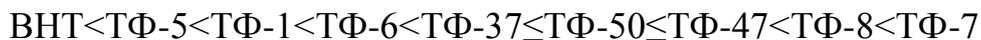
АО	$\nu_{\text{O-H}}, \text{ см}^{-1}$	$\nu_{\text{C-H}}, \text{ см}^{-1}$	$\nu_{\text{C-O}}, \text{ см}^{-1}$
ТФ-1	3561,2	2961,4; 2952,0 сл; 2931,4 сл	1259,9; 1223,5; 1194,4
ТФ-5	3620,5	2961,4; 2952,0 сл; 2931,4 сл	1255,3; 1223,2; 1183,9; 1168,3
ТФ-6	3618,8	2960,7; 2945,5; 2887,1; 2868,2	1266,7; 1247,1; 1166,2; 1154,1; 1125,6; 1193,0
ТФ-7	3613,5	2964,4; 2952,0; 2930,0	1288,3; 1271,0; 1202,4; 1185,6; 1173,4; 1146,9; 1127,3
ТФ-8	3620,5	2961,4; 2948,3; 2931,5; 2887,1	1278,0; 1261,1; 1168,2; 1200,8; 1188,2; 1108,8; 1231,2; 1215,2; 1158,3; 1120,1
ВНТ	3655,4	2960,2; 2945,5; 2925,0; 2887,1; 2868,2	1231,2; 1215,2; 1158,3; 1120,1
ТФ-37	3613,5 3655,2	2960,7; 2945,5; 2925,0; 2887,1; 2868,2	1271,3; 1256,0; 1229,2; 1220,4; 1202,1; 1183,1; 1127,9; 1171,8
ТФ-47	3611,8 3656,2	2960,7; 2945,5; 2925,0; 2887,1; 2868,2	1272,4; 1236,2; 1211,0; 1201,9; 1187,9; 1150,4; 1124,7
ТФ-50	3622,2	2960,2; 2945,5; 2925,0; 2887,1; 2868,2	1271,9; 1256,8; 1240,8; 1201,9; 1188,5; 1172,7; 1149,6; 1108,9

Анализ результатов ИК-спектроскопии в других областях частот выявил существенное влияние структуры алкильного заместителя на интенсивность симметричных и асимметричных колебаний С-Н связей в группах CH_3 и CH_2 в области $3000 - 2850 \text{ см}^{-1}$, симметричных и асимметричных деформационных колебаний С-Н связей в группах CH_3 и CH_2 в области $1450 - 1200 \text{ см}^{-1}$ и колебаний скелета $(\text{CH}_3)_3\text{-C-R}$ и $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ в области $1300-1100 \text{ см}^{-1}$ [Шишкина и др., 2014]. При этом положение полос связанных с колебанием $\text{C}_{\text{ар}}\text{-H}$ практически не изменялось и находилось в диапазоне $2963 \pm 3 \text{ см}^{-1}$ (таблица 4.3.).

По увеличению частоты валентных колебаний $\text{C}_{\text{ар}}\text{-O}$ связи исследованные фенольные антиоксиданты могут быть расположены в ряд:



По увеличению частоты валентных колебаний $\text{C}_{\text{ар}}\text{-O}$ связи исследованные фенольные антиоксиданты могут быть расположены в ряд:



Анализ представленной последовательности позволяет предположить, что на величину частоты полос С-О оказывает влияние конкуренция двух факторов: во-первых, количество и электронодонорная способность заместителей, стоящих в положениях прямого сопряжения с гидроксильной группой, и, во-вторых, степень экранированности гидроксильной группы. Так, для ВНТ, в структуре которого находятся два *трет.*бутильных радикала в *орто*- и *орто'*-положениях кислород «зажат» между этими радикалами, что приводит к стабилизации и уменьшению степеней свободы для колебаний данной связи. А для ТФ-7, в структуре которого в аналогичных положениях находятся хотя и объемные, но обладающие меньшей экранирующей способностью изоборнильные радикалы, колебания $\text{C}_{\text{ар}}\text{-O}$ связи обнаружены при самом большом значении частоты среди исследованных фенолов.

Дальнейшие исследования влияния полярности растворителей и концентрации фенолов на их ИК-характеристики показало, что наиболее

значительные изменения претерпевает полоса валентных колебаний О-Н связи [Маракулина и др., 2015]. Поэтому все дальнейшие результаты по ИК-спектрам будут приводиться именно для этой полосы. ИК-спектры всех исследованных фенолов растворенных в различных растворителях в диапазоне частот от 3800 см^{-1} до 3000 см^{-1} представлены на рис. 4.4. Сопоставление частот валентных колебаний ОН-группы исследованных АО в зависимости от полярности растворителя представлено в таблице 4.4.

Как видно, при повышении полярности растворителя происходит смещение полосы валентных колебаний ОН-группы в сторону меньших значений частот, что характерно для ОН-группы, связанной межмолекулярными водородными связями.

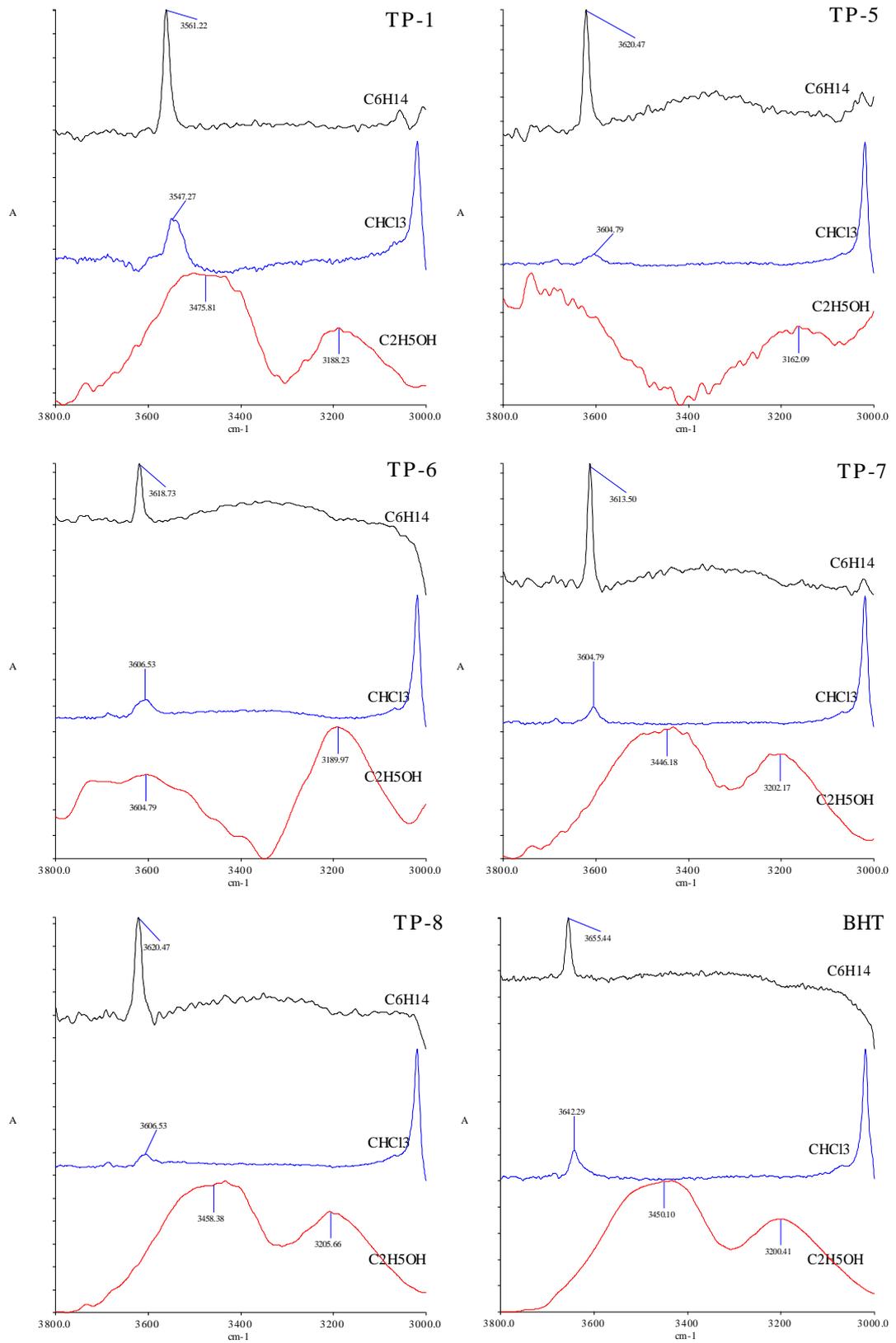
Таблица 4.4. Характеристики ИК-полос ОН-группы фенолов при $[\text{АО}] = 10^{-2}$ моль/л.

	$\nu_{\text{OH}}, \text{ см}^{-1}$ в C_6H_{14}	$\nu_{\text{OH}}, \text{ см}^{-1}$ в CHCl_3	$\nu_{\text{OH}}, \text{ см}^{-1}$ в $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$
ТФ-1	3561,2	3547,3	3476 и 3188
ТФ-5	3620,5	3604,8	3711 и 3162
ТФ-6	3618,7	3606,5	3605 и 3190
ТФ-7	3613,5	3604,8	3446 и 3202
ТФ-8	3620,5	3606,5	3458 и 3206
ТФ-37	3655 и 3613,5	3604,8	3478 и 3192
ТФ-47	3656 и 3611,8	3604,8	3450 и 3197
ТФ-50	3622,2	3613,5	3441 и 3200
ВНТ	3655,4	3642,3	3450 и 3200

В молекуле ТФ-1 внутримолекулярная Н-связь сохраняется в хлороформе, хотя интенсивность полосы значительно ниже, чем в гексане

(рис. 4.4), однако в полярной среде происходит разрушение внутримолекулярной Н-связи и образование межмолекулярных водородных связей между молекулами ТФ-1 и этанола, что ранее было показано в работе [Мазалецкая и др., 2013-а].

При замене гексана на хлороформ, т.е. при увеличении полярности среды при сохранении ее апротонности, происходит незначительное смещение на 5-12 см^{-1} частоты валентных колебаний ОН-группы ИБФ к более низким величинам (таблица 4.4). При этом выявлено уменьшение интенсивности полосы и исчезновение дополнительной полосы низкоинтенсивной полосы при $\nu=3655\text{-}3656 \text{ см}^{-1}$ в растворах ТФ-37 и ТФ-47 в хлороформе. Полученные данные свидетельствуют об ослаблении основных валентных колебаний ОН-связи в молекулах ИБФ в слабополярном растворителе. Инол, являющийся типичным представителем класса пространственно-затрудненных фенолов, характеризуется более низкой реакционной способностью по сравнению со всеми исследованными в данной работе ИБФ в реакции с пероксирадикалами этилбензола [Мазалецкая и др., 2011; Шишкина и др., 2014], что связывают с необходимостью выхода атом Н гидроксильной группы из плоскости бензольного кольца для осуществления реакции с радикалом. Наиболее высокое значение $\nu_{\text{ОН}}$ обнаружено для инола и в растворе хлороформа (таблица 4.4). В полярном растворителе для всех фенольных АО выявлены две широкие полосы валентных колебаний ОН-группы в области частот 3440-3480 см^{-1} и 3160-3250 см^{-1} , что свидетельствует об образовании межмолекулярных водородных связей между молекулами фенола и растворителя, и ассоциатов молекул, вероятно, самого этанола. Это соответствует и тому факту, что методом динамического светорассеяния нами не выявлено образование агрегатов ИБФ ни в гексане, ни в водно-этанольном растворе.



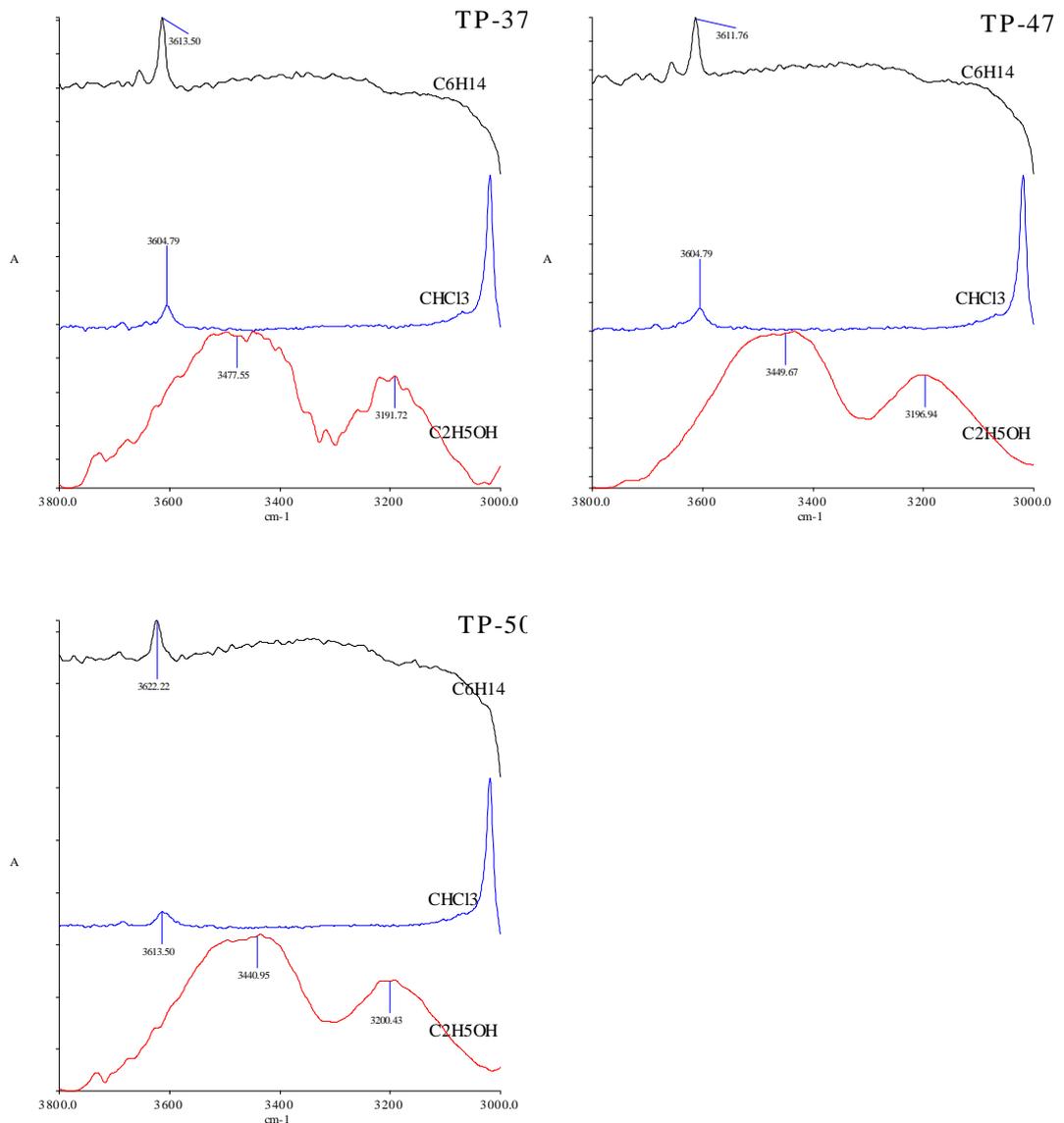


Рис. 4.4. ИК-спектры АО ($[\text{АО}] = 10^{-2}$ моль/л) в гексане, хлороформе и этаноле в области валентных колебаний гидроксильной группы

Глава 5. Физико-химические характеристики комплексов фенольных антиоксидантов с природными фосфолипидами

Большинство природных антиоксидантов являются фенольными соединениями. Во множестве работ показано, что любое перераспределение электронной плотности по ароматической системе приводит к изменению активности данных соединений в процессах регуляции перекисного окисления как в модельных экспериментах, так и в опытах на животных. Одной из причин перераспределения электронной плотности в системе может служить комплексообразование, причем даже образование молекулярного комплекса приводит к изменению физико-химических характеристик АО, в том числе их реакционной способности, что уже обсуждалось в литературном обзоре. Поскольку ранее было показано на примере ряда ИБФ, что они могут влиять на разные звенья физико-химической системы регуляции перекисного окисления липидов в биологических модельных системах [Marakulina et al., 2013; Шевченко и др. 2013], то следующим этапом работы было необходимо исследовать возможность комплексообразования между молекулами фенольных АО и природных фосфолипидов в зависимости от структуры ИБФ и ФЛ.

§ 5.1 Взаимодействие лецитина с антиоксидантами

Явление комплексообразования, установленное ранее для смесей природных фенольных антиоксидантов и лецитина [Xu et al., 2009; Шарафутдинова и др., 2008] подтверждено и для смесей ИБФ с лецитином по отклонению оптической плотности спектра смеси (ΔA) от суммы поглощений отдельных компонентов в тех же концентрациях [Marakulina et al., 2013-b; Маракулина и др., 2014]. На рисунке 5.1 представлены УФ-спектры смесей ЛС с исследованными АО. Как видно из представленных данных, в спектрах смесей присутствуют все полосы поглощений индивидуальных компонентов (см. рис. 3.1 и 4.1), что свидетельствует об отсутствии образования новых ковалентных связей и функциональных групп.

Однако выявлено изменение спектральных характеристик данных полос поглощения, что соответствует данным литературы и свидетельствует об образовании молекулярного, а не ковалентно-связанного комплекса. [Xu et al., 2009].

Ранее (глава 4) было показано, что закон Бугера-Ламберта-Бера выполняется для всех исследованных ИБФ в диапазоне концентраций от $8,8 \times 10^{-6}$ до $4,4 \times 10^{-4}$ моль/л. Это позволило вычислить значения их коэффициентов молярной экстинкции (таблица 4.2). Эффективная величина ϵ для растворов природных ФЛ в *n*-гексане в той области длины волны λ 275 нм более чем на порядок ниже по сравнению с аналогичными значениями для ИБФ и составляет для СМ, КФ и ЛС 120 ± 25 ; 145 ± 30 и 230 ± 65 соответственно. Анализ УФ-спектров, представленных на рис. 5.1, свидетельствует о сохранении батохромного сдвига смесей в области наиболее интенсивной полосы поглощения, как и для индивидуальных компонентов (главы 3, 4). Поэтому для повышения надежности интерпретации данных расчет параметров комплексообразования был проведен при двух областях длин волн: 200 ± 5 нм и 275 ± 5 . Кроме того учитывались следующие обстоятельства: интенсивность полос поглощения ИБФ в диапазоне длин волн 275 нм существенно превышают аналогичные показатели для ФЛ. Кроме того, при данной длине волны положение максимума полос поглощения ИБФ не зависит от концентрации ИБФ. Сравнение УФ-спектров смесей ФЛ и АО и аддитивных спектров индивидуальных компонентов в тех же концентрациях показало, что в соответствии с данными литературы [Пентин, Вилков 2009] происходит изменение оптической плотности, т.е. происходит изменение интенсивности $n \rightarrow \pi^*$ и $\pi \rightarrow \pi^*$ переходов при комплексообразовании.

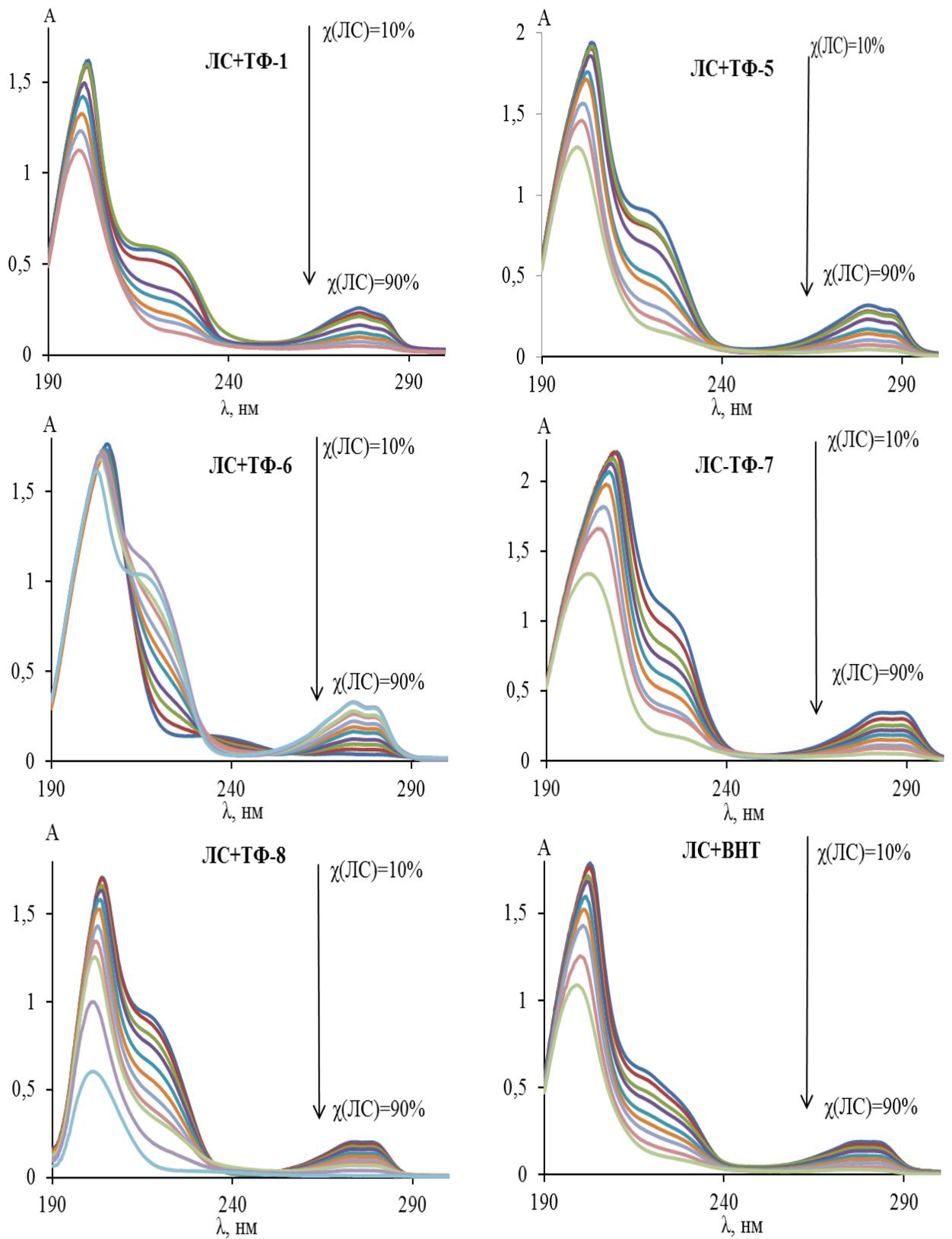


Рис. 5.1 УФ-спектры изомолярных серий растворов лецитина (партия 3) с антиоксидантами в гексане

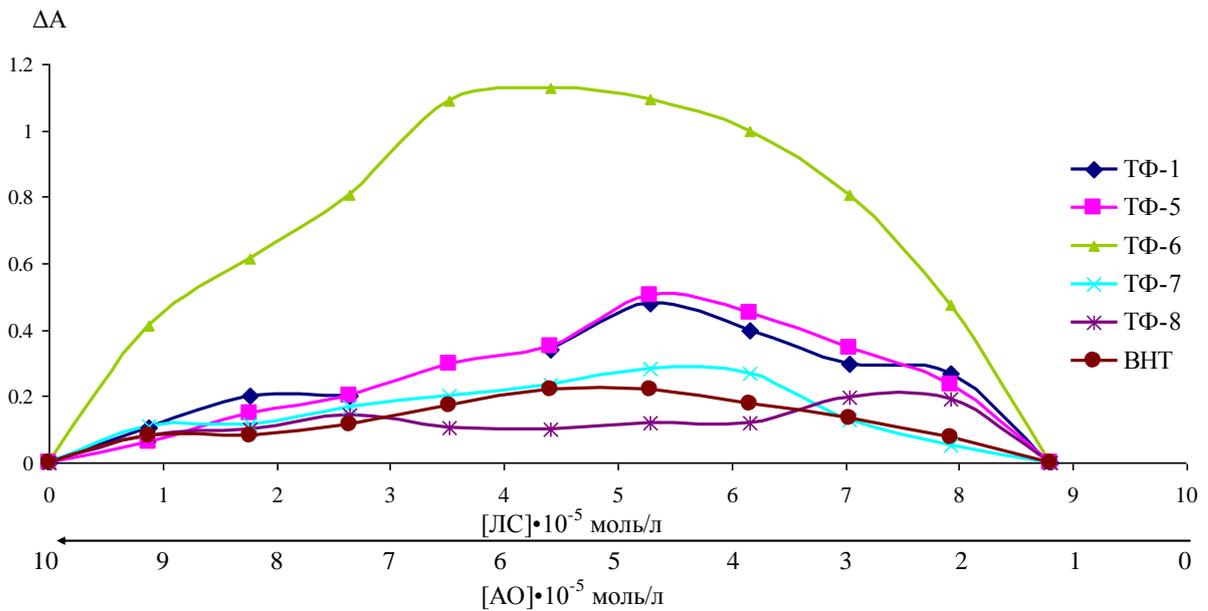


Рис. 5.2. Отклонение оптической плотности раствора смесей лецитина с АО при $\lambda=200\pm 5$ при увеличении концентрации ЛС (партия №3) от $8,8\times 10^{-6}$ до $8,8\times 10^{-5}$ моль/л и соответствующем уменьшении концентрации антиоксиданта.

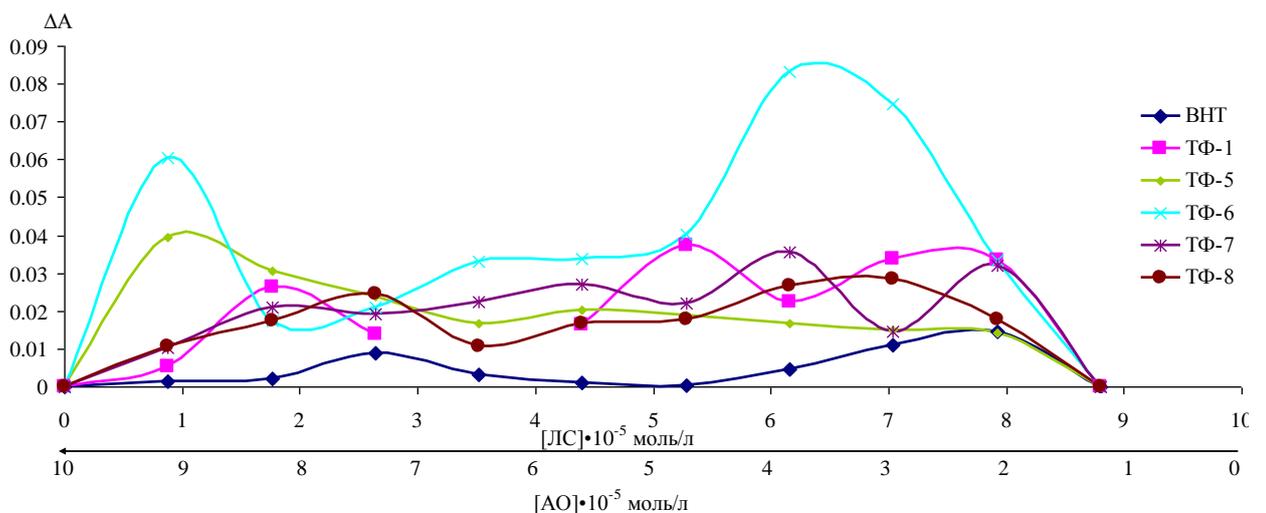


Рис. 5.3. Отклонение оптической плотности раствора смесей лецитина с АО при $\lambda=275\pm 5$ при увеличении концентрации ЛС (Партия №3) от $8,8\times 10^{-6}$ до $8,8\times 10^{-5}$ моль/л и соответствующем уменьшении концентрации антиоксиданта.

Как видно из рис. 5.2, наибольшим отклонением при 205 нм характеризуется смесь ЛС с ТФ-6, менее значительные изменения в УФ-спектрах выявлены для смесей ЛС с ТФ-5 и ТФ-1, а наиболее слабые для –

смесей ЛС с ТФ-7, ВНТ и ТФ-8, что свидетельствует о влиянии стерических препятствий на комплексообразование данных фенольных АО с ЛС. Однако наименьшим отклонением характеризуется и смесь ЛС с ТФ-8, хотя метильный заместитель не является объемным и способным экранировать гидроксильную группу, что позволяет предполагать влияние занятости второго *орто*-положения относительно гидроксильной группы фенола электронодонорной группировкой.

Как видно из рис. 5.3, максимальное отклонение оптической плотности спектра смеси от аналогичной величины суммарного спектра наблюдается для смеси ЛС с ТФ-6 и при 275 нм. Однако, максимальное отклонения смеси от суммарного поглощения индивидуальных компонентов выявлено для ТФ-6, т.е фенола, не имеющего дополнительных электронодонорных групп в местах прямого сопряжения с ОН-группой. Отклонение оптической плотности спектра смеси от аддитивной величины, возможно, обусловлено взаимодействием гидроксильной группы фенолов с лецитином, приведшее к перераспределению электронной плотности в их молекулах.

Функциональные группировки, участвующие в комплексообразовании, определяли методом ИК-спектроскопии [Marakulina et al., 2013-b, Маракулина и др. 2012-б]. Величины изменений интенсивностей (ΔI) колебаний исследованных групп в растворителях с различным дипольным моментом обобщены в таблицах 5.1 – 5.3. ИК-спектры сняты в гексане ($\mu=0,08$), хлороформе ($\mu=1,15$) и этаноле ($\mu=1,69$).

При увеличении полярности растворителя зафиксировано увеличение отклонения интенсивности колебания всех исследованных групп, что может быть связано с тем, что этанол, являясь более полярным растворителем, эффективнее взаимодействует и с ИБФ, и с лецитином. Может быть увеличение отклонения также связано с увеличением растворимости фенолов.

Таблица 5.1. Изменение ИК-характеристик при комплексообразовании лецитина с антиоксидантами в гексане

	ΔI при $\nu=3652-3562 \text{ см}^{-1}$	ΔI при $\nu=3395 \text{ см}^{-1}$	ΔI при $\nu=1739 \text{ см}^{-1}$	ΔI при $\nu=970 \text{ см}^{-1}$
ТФ-1	0,0003	0,0004	0,0013	0,0005
ТФ-5	0,0005	0,0024	0,0093	0,0075
ТФ-6	0,0003	0,0009	0,0024	0,0005
ТФ-7	0,0012	0,0008	0,0004	0,0002
ТФ-8	0,0003	0,0010	0,0018	0,0011
ВНТ	0,0005	0	0	0

Таблица 5.2. Изменение ИК-характеристик при комплексообразовании лецитина с антиоксидантами в хлороформе

	ΔI при $\nu=3652-3562 \text{ см}^{-1}$	ΔI при $\nu=3395 \text{ см}^{-1}$	ΔI при $\nu=1739 \text{ см}^{-1}$	ΔI при $\nu=970 \text{ см}^{-1}$
ТФ-1	0,0005	0,0003	0,0003	0,0003
ТФ-5	0,0013	0,0025	0,016	0,010
ТФ-6	0,0011	0,0005	0,005	0,005
ТФ-7	0,0005	0,0015	0,008	0,0002
ТФ-8	0,0013	0,0020	0,010	0,0011
ВНТ	0,0010	0,0015	0,004	0

Таблица 5.3. Изменение характеристик ИК-спектров при комплексообразовании лецитина с антиоксидантами в этанольном растворе

	ΔI при $\nu=3652-3562 \text{ см}^{-1}$	ΔI при $\nu=3395 \text{ см}^{-1}$	ΔI при $\nu=1739 \text{ см}^{-1}$	ΔI при $\nu=970 \text{ см}^{-1}$
ТФ-1	0,01	0,01	0,01	0,0025
ТФ-5	0,1	0,08	0,09	0,032
ТФ-6	0,07	0,03	0,07	0,026
ТФ-7	0,015	0,01	0,015	0,0025
ТФ-8	0,03	0,035	0,925	0,01
ВНТ	0,09	0,07	0,975	0,0275

Таблица 5.4 Изменение характеристик ИК-спектров при комплексообразовании фосфатидилхолина с антиоксидантами в этанольном растворе

	ΔI при $\nu=3652-3522 \text{ см}^{-1}$	ΔI при $\nu=3395 \text{ см}^{-1}$	ΔI при $\nu=1739 \text{ см}^{-1}$	ΔI при $\nu=970 \text{ см}^{-1}$
ТФ-1		0,003	0,0005	0,004
ТФ-5		0,003	0,0005	0
ТФ-6		0,001	0,0015	0,005
ТФ-7		0,0025	0,0006	0,003
ТФ-8		0,003	0	0
ТФ-37	0,002		0	0,0005
ТФ-47	0,002		0,0001	0,0008
ТФ-50	0,002		0,0008	0,0005
ВНТ		0,005	0,0007	0

ИК-спектры смесей фосфатидилхолина (Sigma) снимали только в растворах этанола, потому что, как было показано, максимальные изменения ИК-характеристик происходили именно в этом растворителе [Шишкина и др., 2014].

Как видно из таблицы 5.4 наиболее значительные изменения выявлены в области колебаний ОН-группы фенолов, как и для смесей ЛС с АО. Однако при переходе от смесей АО с лецитином к смесям с фосфатидилхолином (Sigma), наблюдалось уменьшение масштаба эффектов комплексообразования, что, возможно, обусловлено меньшим содержанием других фракций ФЛ в L- α -ФХ по сравнению с ЛС.

Влияние комплексообразования на проявление мембранотропных или мембранопротекторных свойств проводили в модельной химической системе методом динамического светорассеяния (рис. 5.4).

На рис. 5.5 представлена диаграмма, отображающая отношение размеров агрегатов лецитина к размерам агрегатов, полученных в случае эквимольных смесей ЛС с InH в гексане. Как видно, в случае эквимольных смесей ЛС с ТФ-1, ТФ-7 и ВНТ не наблюдается достоверных изменений размера мицелл, тогда как в случае смесей ЛС с ТФ-5, ТФ-6 и ТФ-8 наблюдается значительное снижение размера агрегатов (в 20-40 раз), что свидетельствует о выраженных мембранотропных свойствах последних. По уменьшению влияния на процесс мицеллообразования ЛС в гексане все исследованные фенольные АО образуют следующую последовательность: ТФ-8 > ТФ-5 > ТФ-6 >> ВНТ > ТФ-1 > ТФ-7 [Шишкина и др., 2012-б]. Как уже отмечалось, лецитин является смесью природных липидов, основной фракцией которой является фосфатидилхолин. Все исследованные партии лецитина, по данным тонкослойной хроматографии, характеризуются высоким содержанием фосфолипидов в общих липидах, при этом доля фосфатидилхолина превышала 82 %.

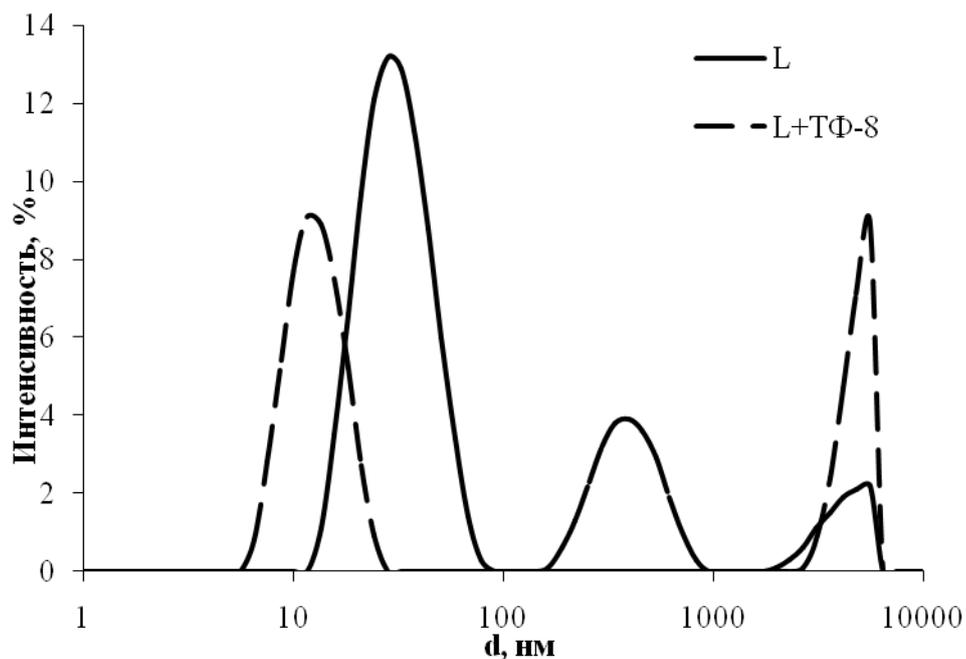


Рис. 5.4. Изменение распределения по размера мицелл лецитина в присутствии и отсутствии эквимолярного количества ТФ-8

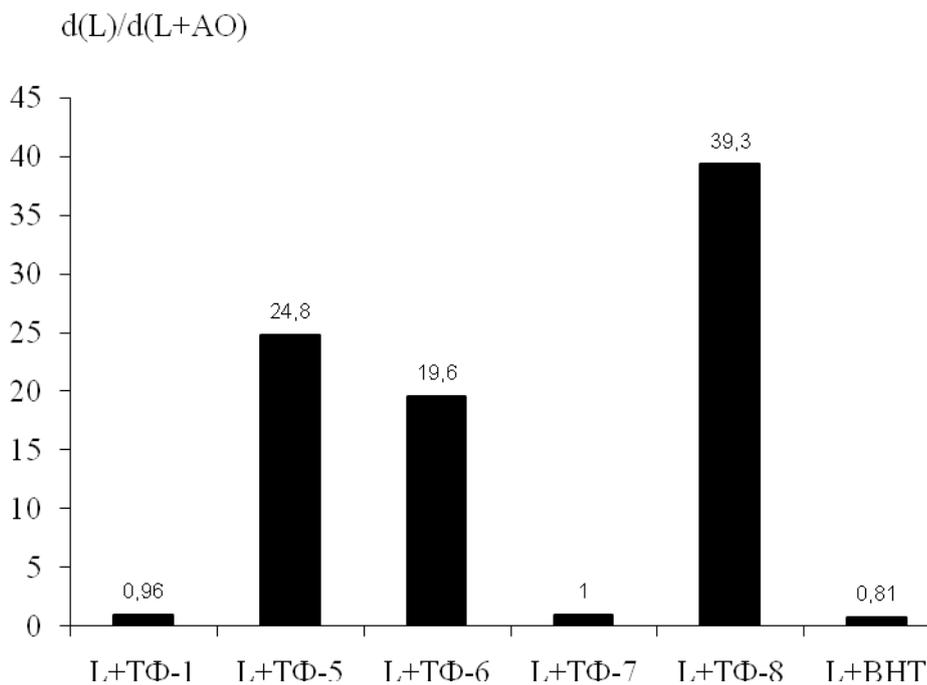


Рис. 5.5. Изменение размеров агрегатов ЛС в гексане в присутствии эквимолярных количеств исследованных АО

§ 5.2 Взаимодействие сфингомиелина с антиоксидантами

Явление и стехиометрию комплексообразования между молекулами СМ и фенольных АО изучали методом изомолярных серий [Маракулина и др., 2012-а]. На рис. 5.6 представлены УФ-спектры смесей сфингомиелина с фенольными АО. Как и в случае смесей АО с ЛС, не наблюдается образование новых полос поглощения в спектрах, однако есть изменения УФ-характеристик каждой из полос. То есть в данном случае также подтверждается образование молекулярного, а не ковалентно-связанного комплекса между молекулами СМ и АО. Как видно из рис. 5.7, ΔA для смесей СМ с исследованными АО имеет максимумы при различном мольном соотношении компонентов: 9:1 для смесей СМ с ТФ-6, ТФ-7 и ТФ-8; 6:4 для смесей СМ с ТФ-5; 8:2 для смесей СМ с ТФ-1 и 2-8 для смесей СМ с ВНТ [Маракулина и др., 2016].

Также следует отметить, что для смесей СМ с ТФ-1, ТФ-7 и ТФ-8 наблюдается несколько экстремумов, что свидетельствует о наличии комплексов переменного состава. Кроме того, по уменьшению значения максимального отклонения оптической плотности смеси от плотности суммарного спектра (ΔA_{\max}) для смесей фосфолипидов с АО последовательности также зависят от природы ФЛ [Маракулина и др, 2016]. Так, в случае СМ (партия 2) все фенолы можно расположить в следующей последовательности: ТФ-8>ТФ-6>ВНТ>ТФ-7>ТФ-1 \geq ТФ-5, а для смесей с лецитином (партия 3) – ТФ-6 > ТФ-5 \geq ТФ-1 \geq ТФ-7 > ВНТ \geq ТФ-8.

Такие отличия взаимодействия СМ и ЛС с АО, возможно, обусловлены тем, что в молекуле фосфатидилхолина, который является основной фракцией лецитина, глицериновый остов, а в молекуле СМ – сфингозиновый, т.е. в молекуле СМ имеется дополнительная полярная амидная группа.

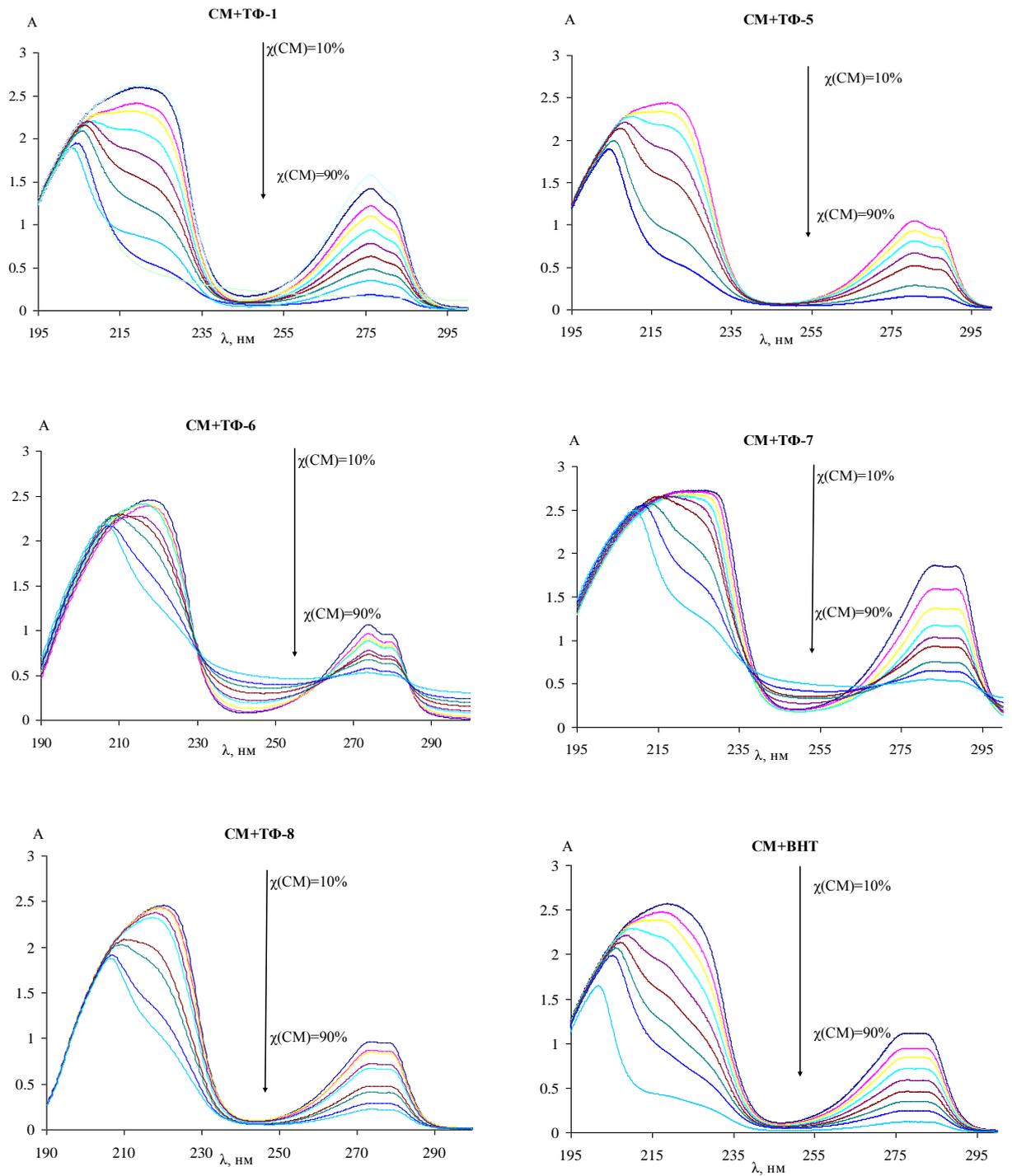


Рис. 5.6. УФ-спектры смесей сфингомиелина (партия 2) с фенольными антиоксидантами в диапазоне концентраций $4,4 \times 10^{-5}$ - $4,4 \times 10^{-4}$ моль/л

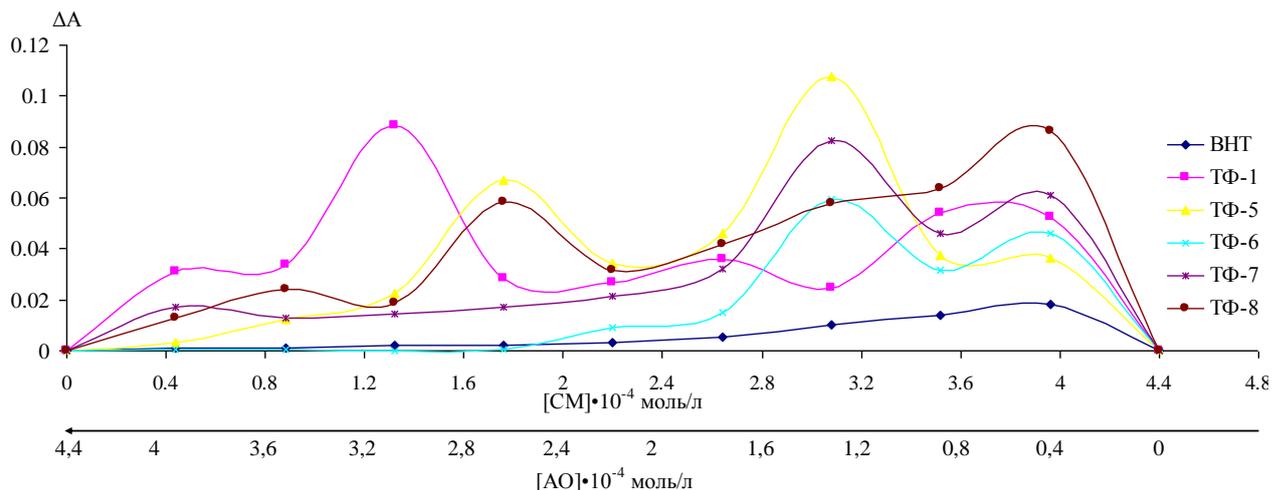


Рис 5.7. Изменение отклонения оптической плотности спектра смесей СМ с АО при 275 нм в зависимости от мольного соотношения компонентов в смеси

Чтобы установить, за счет каких связей происходит взаимодействие между молекулами СМ и АО, были сняты ИК-спектры как отдельных компонентов, так и их эквимольных смесей [Маракулина и др, 2012, 2016].

Для СМ характерна полоса поглощения связанной гидроксильной группы при 3300 см^{-1} , что свидетельствует о возможности образования сфингомиелином полиассоциатов.

Как видно из данных, представленных в таблице 5.5, наименее выраженные изменения интенсивности в ИК-спектрах хлороформных растворов по сравнению с индивидуальными компонентами наблюдаются в области валентных колебаний ОН-группы АО. При этом необходимо отметить, что отсутствуют изменения этого показателя для смеси СМ с ТФ-5, ТФ-6, ТФ-7 и ТФ-8.

Следует заметить, что наибольшие изменения в спектрах смесей относительно спектров индивидуальных компонентов наблюдаются в интенсивности колебаний связанной гидроксильной группы СМ. Со всеми исследованными фенолами, интенсивность колебаний данной группировки падает, однако для смесей СМ с ТФ-7, ТФ-6 и ТФ-8 эти изменения не так значительны как для смесей СМ с другими АО. Это свидетельствует об

участии ОН-групп АО в ослаблении межмолекулярной водородной связи СМ.

Таблица 5.5. Изменение ИК-характеристик при комплексообразовании сфингомиелина с антиоксидантами в хлороформе

	ΔI при $\nu=3652-3522$ см^{-1}	ΔI при $\nu=3300 \text{ см}^{-1}$	ΔI при $\nu=1650 \text{ см}^{-1}$	ΔI при $\nu=970 \text{ см}^{-1}$
ТФ-1	0,001	0,076	0,11	0,115
ТФ-5	0	0,08	0,06	0,125
ТФ-6	0	0,075	0,105	0,125
ТФ-7	0	0,075	0,105	0,12
ТФ-8	0	0,08	0,12	0,135
ВНТ	0,003	0,071	0,10	0,115

Частота валентных колебаний сложноэфирной амидной группы СМ обнаруживается при 1650 см^{-1} . В присутствии ТФ-1, ТФ-5 и ВНТ наблюдается существенное снижение интенсивности валентных колебаний амидной группы, наличие же в смеси ТФ-7 и ТФ-6 практически не влияет на интенсивность колебаний данной группировки. Интенсивность полосы колебаний смесей СМ с ТФ-8 при частоте 1650 см^{-1} , также снижается, но не столь значительно, как в присутствии ТФ-5, ТФ-1 и ВНТ. Существенные изменения интенсивности полосы в области 970 см^{-1} в смесях СМ с фенольными АО свидетельствуют об участии холиновой группировки СМ в образовании комплексов с изученными АО.

Таблица 5.6. Изменение ИК-характеристик при комплексообразовании сфингомиелина с антиоксидантами в этаноле

	ΔI при $\nu=3452-3400$ см^{-1}	ΔI при $\nu=3210$ см^{-1}	ΔI при $\nu=1650$ см^{-1}	ΔI при $\nu=970$ см^{-1}
ТФ-1	0,015	0,015	0,01	0,002
ТФ-5	0,013	0,01	0,01	0,002
ТФ-6	0,015	0,01	0,01	0,002
ТФ-7	0,115	0,12	0,12	0,043
ТФ-8	0,035	0,03	0,04	0,01
ВНТ	0,045	0,04	0,05	0,02

Таким образом, совокупность полученных данных свидетельствует о том, что СМ, действительно, образует комплексы с изученными фенольными антиоксидантами, что подтверждено с помощью УФ-спектрофотометрии адаптированным нами методом изомолярных серий. Использование ИК-спектроскопии позволило установить, что в образовании комплексов СМ с АО участвуют гидроксильные группы фенолов, холиновая и сложноэфирная амидная группы СМ. По уменьшению различий в интенсивности всех исследованных частот в ИК-спектрах СМ с АО исследованные соединения располагаются в следующей последовательности: ТФ-5 > ТФ-1 > ВНТ >> ТФ-8 > ТФ-6 \geq ТФ-7. Стехиометрия комплексов существенно зависит от структуры исследованных АО. Именно ТФ-7, в молекуле которого содержится две изоборнильные группы в *o*- и *o'*-положениях, а также ТФ-6 и ТФ-8 образуют комплексы со СМ, в составе которых содержится наименьшие количества АО, показывают и наименьшие изменения характеристик колебаний функциональных групп, участвующих в

комплексообразовании. Масштаб деформации спектров и соотношение компонентов в комплексе зависит и от полярности растворителя.

При увеличении полярности и протонодонорности растворителя происходит увеличение масштаба изменений интенсивности валентных колебаний гидроксильной группы фенолов по сравнению с хлороформными растворами, тогда как масштаб изменений ИК-характеристик других группировок уменьшается (таблица 6). Следует отметить, что как и в случае растворов смесей ЛС с АО в этаноле, спектры СМ с ТФ-7, ТФ-8 и ВНТ в этаноле также характеризуются увеличением интенсивности колебаний всех группировок. Если в случае смесей ЛС с АО, можно сделать предположение о возможности проявления мембранотропных или мембранопротекторных свойств в более сложных системах, то в случае смесей СМ с исследованными АО наблюдается только увеличение размеров агрегатов на 35 - 95 % (рис. 5.8).

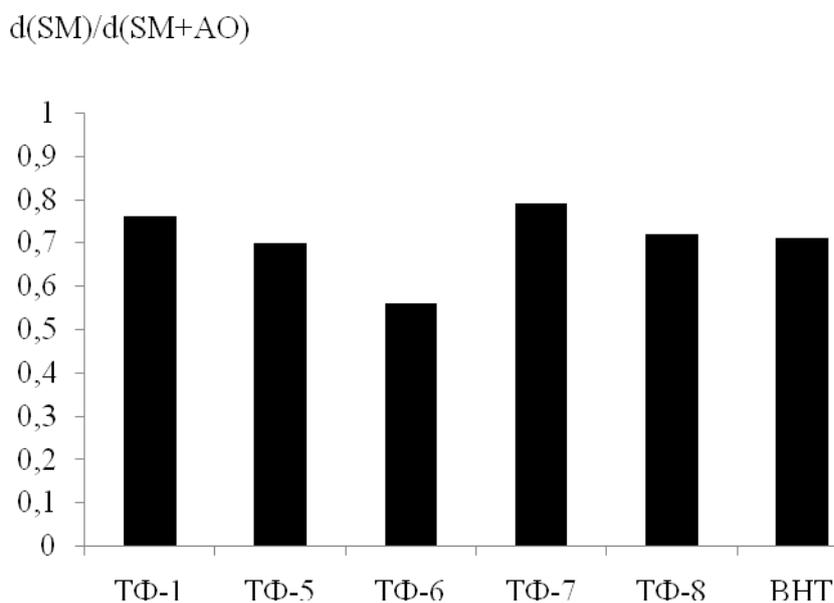


Рис 5.8. Изменение размеров агрегатов СМ в гексане при добавлении эквимольного количества АО

§ 5.3 Взаимодействие фосфатидилэтаноламина с антиоксидантами

Показанное ранее взаимодействие ЛС, ФХ и СМ с АО обнаружено и для растворов ФЭ с АО [Маракулина и др., 2016]. На рис. 5.9 представлены УФ-спектры смесей ФЭ с АО. По сравнению со спектрами смесей ЛС и СМ с АО, смеси ФЭ с АО характеризуются наименьшим отклонением суммарного поглощения спектра смеси от суммарного спектра, хотя и соблюдаются найденные ранее закономерности. Как и следовало ожидать, наименьшим масштабом изменения УФ-спектров характеризуются смеси ФЭ с ВНТ, а вот смеси ФЭ с ТФ-5 и ТФ-7 практически не отличаются за исключением смеси в соотношении ФЭ:ТФ-7 = 2:8, в котором отклонение оптической плотности спектра смеси от суммарного спектра почти на порядок выше чем при других соотношениях компонентов (рис. 5.10). При исследовании ИК-спектров смесей и индивидуальных компонентов ФЭ и АО, были обнаружены закономерности, похожие на найденные ранее для смесей СМ и ФХ. А именно: наиболее выраженные отклонения в ИК-спектрах были обнаружены для полос поглощения гидроксильных групп фенолов, сложноэфирной карбонильной группы ФЭ и ассиметричных колебаний Р-О связи фосфорной головки ФЭ. При увеличении полярности растворителя отмечен рост масштаба изменений характеристик полос в ИК-спектрах в случае смесей относительно спектров индивидуальных компонентов, что может свидетельствовать о том, что этанол активнее взаимодействует с полярными группировками и фенолов, и липидов. Наименьшими изменениями характеризуются эквимольные смеси ФЭ с ионолом и в хлороформе, и в этаноле. Наличие электронодонорного заместителя в *орто*-и *пара*-положении относительно гидроксильной группы в структуре фенола вызывает увеличение масштаба воздействия фенола на характеристики полос колебаний группировок ФЭ в ИК-спектрах.

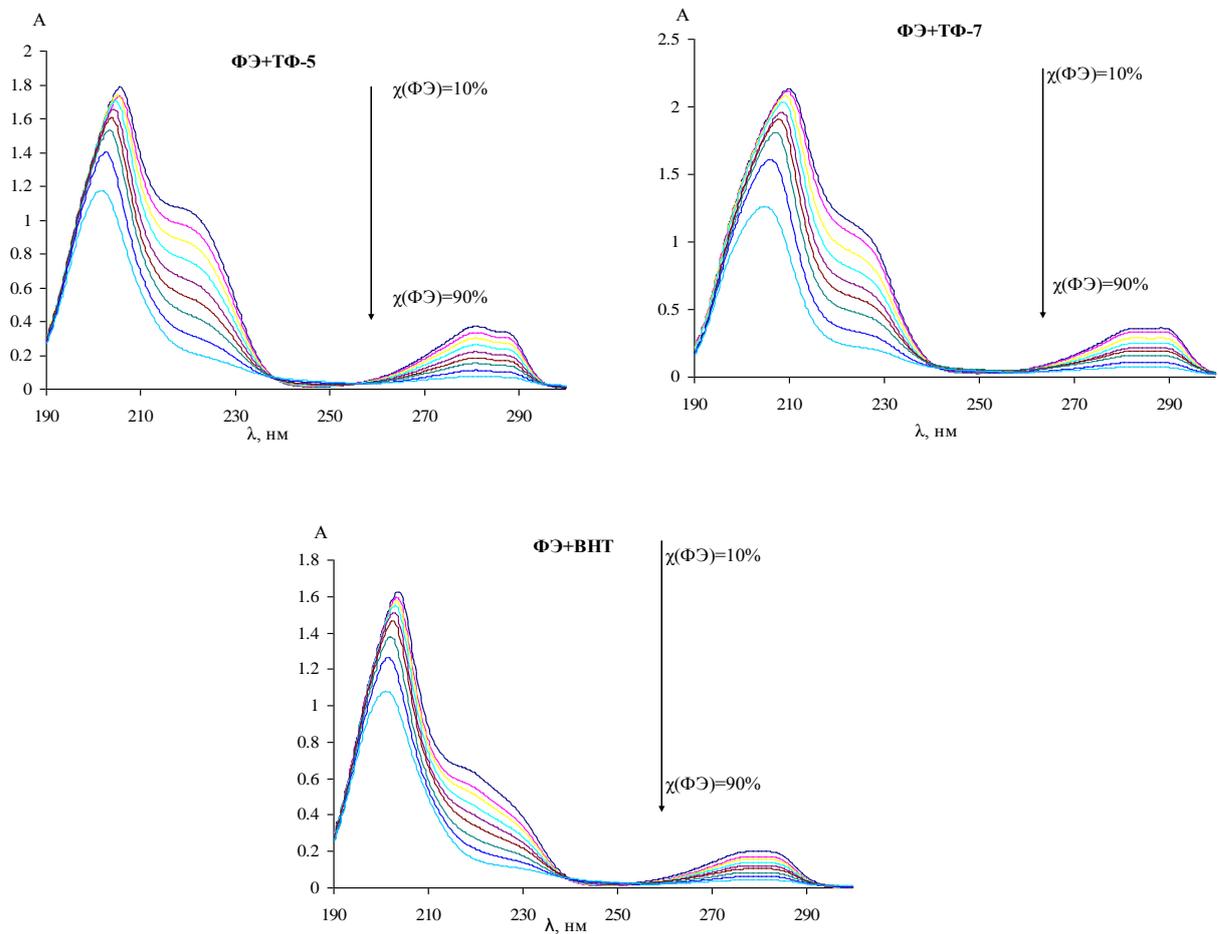


Рис. 5.9. УФ-спектры смесей ФЭ с АО в диапазоне длин волн от 190 до 310 нм.

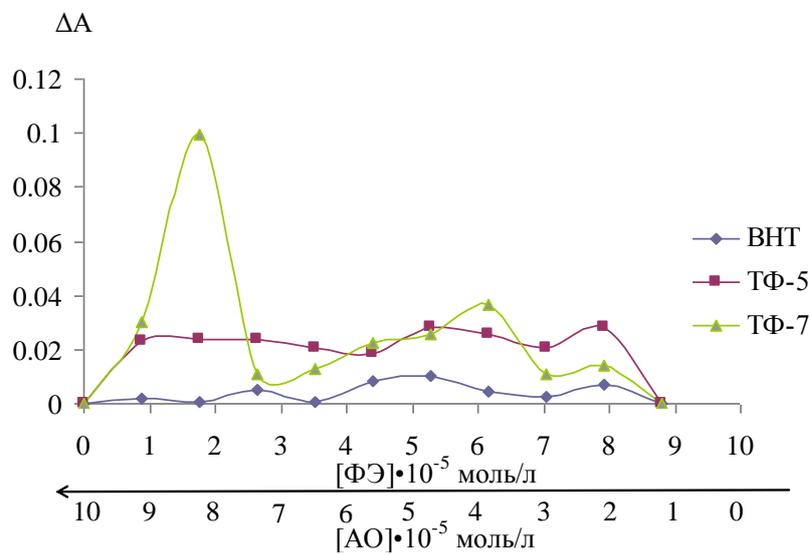


Рис. 5.10. Зависимость отклонения оптической плотности спектра смеси ФЭ с АО от аналогичной величины аддитивного спектра

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Совокупность полученных экспериментальных данных (главы III-V) позволяет сделать следующие обобщения. Так, исследование спектральных характеристики нового класса АО – ИБФ, показало, что они существенно зависят от их структурных особенностей. Прежде всего необходимо отметить, что валентные колебания ОН-группы находятся в области, характерной для пространственно незатрудненных фенолов, однако частичное экранирование ОН-группы выявлено у гибридных соединений, содержащих и изоборнильный, и *трет.*бутильный заместители в *орто*-положениях (рис. 6.1).

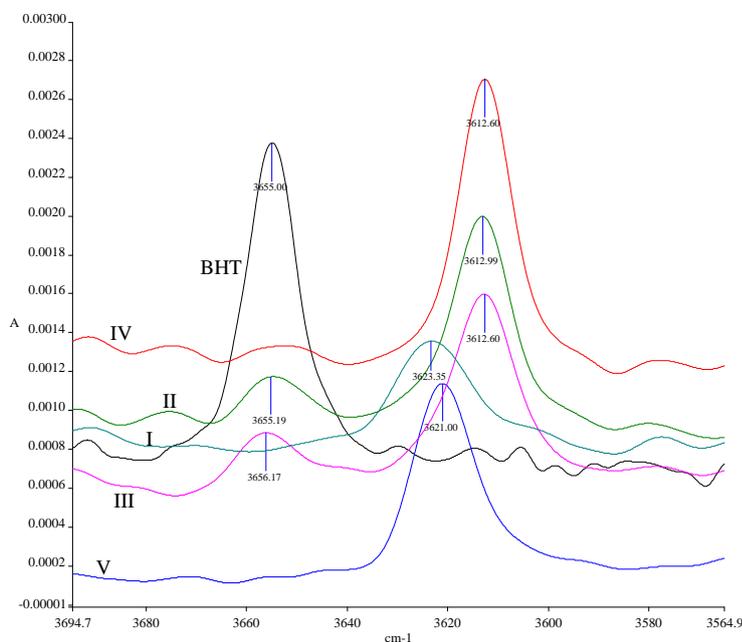


Рис. 6.1. ИК-спектры исследованных антиоксидантов (растворы в гексане) в области валентных колебаний ОН-групп

В УФ-диапазоне были обнаружены все полосы поглощения, характерные для фенолов, содержащих электронодонорные группировки у бензольного кольца. Однако при увеличении количества электронодонорных заместителей максимум основной полосы поглощения смещается в длинноволновую область, а на интенсивность данной полосы большее влияние оказывает экранированность гидроксильной группы: увеличение

количества электронодонорных заместителей у бензольного кольца повышает вероятность и интенсивность $\pi \rightarrow \pi^*$ переходов (230 ± 5 нм и 275 ± 5 нм). ИК-спектры исследованных АО достаточно сложны ввиду большого количества атомов в их структурах. Однако в главе 4 было показано, что сильнее всего зависят от структуры, природы и количества заместителей колебания $\nu_{\text{ар-О}}$ и $\nu_{\text{О-Н}}$ связей. По увеличению значения частоты валентных колебаний $\nu_{\text{О-Н}}$ связи исследованные фенолы (за исключением ТФ-1) образуют последовательность: ТФ-7 < ТФ-6 < ТФ-5 = ТФ-8, а по увеличению $\nu_{\text{С-О}}$: ТФ-5 < ТФ-6 < ТФ-8 < ТФ-7. Наибольшей интенсивностью колебаний $\nu_{\text{С-О}}$ связи (за исключением ТФ-1) характеризуется ИБФ, имеющий электронодонорный заместитель и свободное второе о-положение. Поскольку частота колебаний связей прямо пропорциональна энергии связи между атомами, то анализ данных позволяет заключить, что увеличение электронодонорных способностей заместителей увеличивает энергию связи $\nu_{\text{О-Н}}$ и уменьшает энергию связи $\nu_{\text{С-О}}$.

Как было показано в работе [Marakulina et al., 2013], изученные ИБФ и ЛС обладают способностью разлагать пероксиды, т.е. антипероксидной активностью (АПА) (таблица 6.1). Однако для смесей ЛС с ТФ-1 и ТФ-7 выявлено уменьшение данного показателя по сравнению с величиной АПА индивидуальных компонентов, в то время как в случае ТФ-5 величина АПА имеет тенденцию снижения в следующей последовательности: ЛС = ЛС + ТФ-5 \geq ТФ-5. Поскольку анализ способности разлагать пероксиды осуществляется в полярной среде (окисленный метилолеат), то полученные результаты свидетельствуют как о влиянии Н-связей на взаимодействие ИБФ с ЛС и пероксидами, так и комплексообразования между молекулами АО и ФЛ.

Знак и масштаб выраженности эффектов фенольных АО в смесях с препаратами природных липидов, зависит не только от структуры антиоксиданта, но и природы основной фракции фосфолипидов.

Таблица 6.1. АПА лецитина, фенольных антиоксидантов и их смесей

Препараты	АПА, ммоль/Г _{лип} Г _{преп}	Смеси ЛС+АО	АПА смеси
ЛС (n=6)	6,2±0,4		
ТФ-1 (n=3)	6,7±1,7	ЛС+ТФ-1 (n=2)	3,5±0,3
ТФ-5 (n=3)	4,4±0,9	ЛС+ТФ-5 (n=3)	5,9±1,6
ТФ-7 (n=3)	7,1 ±1,2	ЛС+ТФ-7 (n=3)	4,2±0,65
ВНТ (n=3)	3,1 ±0,2	ЛС+ВНТ (n=3)	7,0±2,1

Поскольку все препараты отличались по химическому составу основной фракции, по фракционному составу от партии к партии, то это влияло на характеристики УФ- и ИК-спектров, на параметры их самоорганизации в гексане и на степень взаимодействия с исследованными АО (главы 3–5). Именно наличие в препаратах других фракций ФЛ даже в незначительных количествах оказывает существенное влияние на процесс мицеллообразования ФЛ в неполярном растворителе [Шишкина и др., 2016]. Так, показано что увеличение в составе ФЛ препаратов СМ суммарного содержания лизоформ (обладают выраженными детергентными свойствами) и фосфатидилэтаноламина (характеризуется образованием гексагональной упаковки полярных головок) приводит к уменьшению гидродинамического диаметра агрегатов. Напротив, обнаружена прямая корреляция между суммарным содержанием в растворе СМ и ФХ, т.е. фракций ФЛ, поддерживающих ламеллярное строение липидного слоя, и средним диаметром мицелл основной фракции при той же концентрации СМ и времени экспозиции раствора в течение 2,5 – 3 часов (рис. 6.2).

Как было показано в главе 3, процесс самоорганизации природных ФЛ в гексане, имеет сложный характер и зависит от многих факторов, одним из которых является и время экспозиции растворов соответствующих препаратов, что подтверждают данные, представленные на рис. 6.3.

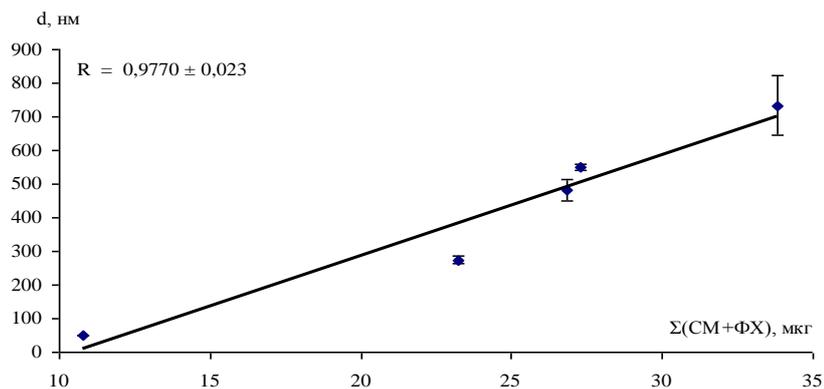


Рис. 6.2 – Взаимосвязь между размером мицелл сфингомиелина в *n*-гексане и суммарным содержанием сфингомиелина и фосфатидилхолина в растворе

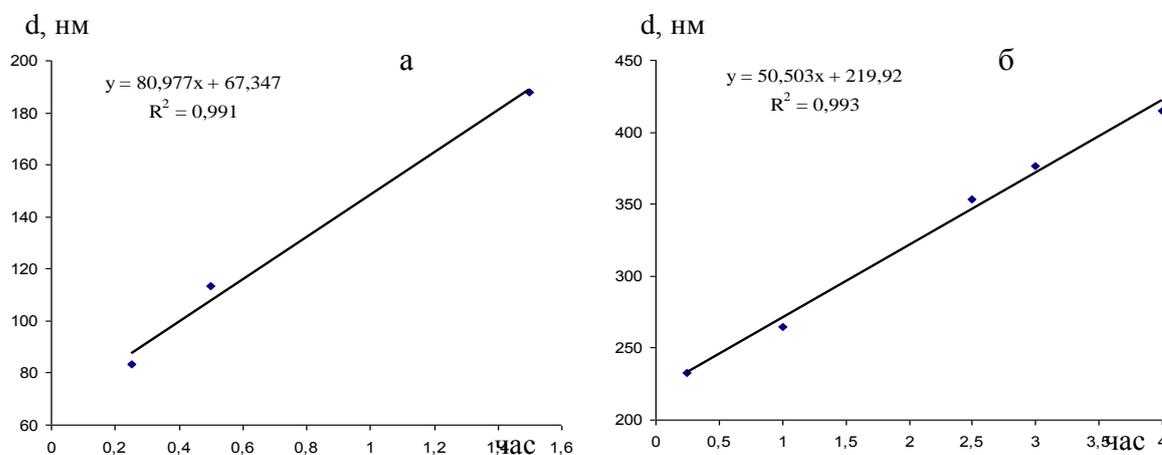


Рис. 6.3. Взаимосвязь размера мицелл ЛС (а) и СМ (б) и времени экспозиции их растворов в гексане

В качестве параметров комплексообразования фенольных АО и ФЛ были рассмотрены мольная доля ФЛ, при которой зафиксировано максимальное отклонение оптической плотности спектра смеси от аналогичной величины суммарного спектра в области длин волн 275 нм; величина данного отклонения в процентах от оптической плотности суммарного спектра, изменение интенсивности валентных колебаний ОН-групп ИБФ в смесях с ФЛ относительно спектров индивидуального ИБФ и изменение диаметра мицелл ФЛ при введении ИБФ в раствор. Описанные параметры обобщены и приведены в таблицах 6.2-6.4.

Таблица 6.2. Параметры комплексообразования сфингомиелина с изоборнилфенолами

АО	Доля СМ в комплексах, %	ΔA в УФ-спектрах, %	ΔI в ИК-спектрах	$\frac{d(\text{СМ}+\text{ИБФ})}{d(\text{СМ})}$
ТФ-1	80	58	0,02	1,74
ТФ-5	60	86,6	0,01	1,36
ТФ-6	90	453	0,01	1,95
ТФ-7	80	73,6	0,12	1,45
ТФ-8	90	115	0,03	1,79

Таблица 6.3. Параметры комплексообразования лецитина с изоборнилфенолами

АО	Доля ЛС в комплексах, %	ΔA в УФ-спектрах, %	ΔI в ИК-спектрах	$\frac{d(\text{ЛС}+\text{ИБФ})}{d(\text{ЛС})}$
ТФ-1	60	25	0,01	0,04
ТФ-5	50	18,6	0,10	0,04
ТФ-6	70	28	0,07	0,035
ТФ-7	70	27,6	0,015	0,97
ТФ-8	80	83	0,03	0,065

Таблица 6.4. Параметры комплексообразования кефалина с изоборнилфенолами

АО	Доля КФ в комплексах, %	ΔA в УФ-спектрах, %	ΔI в ИК-спектрах	$\frac{d(\text{КФ}+\text{ИБФ})}{d(\text{КФ})}$
ТФ-5	*	-	0,00055	-
ТФ-7	20	12,0	0,0006	0,98

**нет достоверного экстремума в зависимости отклонения оптической плотности спектра смеси от оптической плотности суммарного спектра от мольного соотношения компонентов.*

По уменьшению максимального ΔA (%) независимо от структуры ИБФ препараты ФЛ располагаются в одинаковой последовательности СМ > ЛС \geq КФ. Наиболее выраженные эффекты комплексообразования в смесях ИБФ с СМ, вероятно, связаны с его химической структурой.

По уменьшению максимальной величины ΔA (%) в комплексах ИБФ со СМ ИБФ располагаются в следующей последовательности: ТФ-6 >> ТФ-8 > ТФ-5 > ТФ-7 > ТФ-1. Самым низким значением ΔA (%) характеризуется смесь СМ с ТФ-1, что, очевидно, связано с образованием внутримолекулярной водородной связи между водородом гидроксильной группы и кислородом изоборнилокси-группы. Максимальным отклонением характеризуется смесь СМ с ТФ-6, что свидетельствует о важности роли экранирования ОН-группы фенола в процессе комплексообразования, а значения ΔA (%) для смесей СМ с ТФ-5 и ТФ-8 показывают, что существенную роль играет и электронодонорная природа заместителей в бензольном кольце в положениях прямого сопряжения с ОН-группой, поскольку это влияет на ее кислотные свойства. В присутствии ИБФ в растворе происходит увеличение размера основной фракции мицелл СМ на 36–95 %. По уменьшению влияния добавок ИБФ на диаметр мицелл основной фракции СМ можно сформировать следующий ряд: ТФ-6 > ТФ-8 > ТФ-1 > ТФ-7 \geq ТФ-5, т.е. максимальное влияние оказывает ИБФ, имеющий в своей структуре изоборнильную группу только в одном из *орто*-положений.

Со всеми исследованными фенолами, интенсивность колебаний О-Н группы падает, однако для смесей СМ с ТФ-7, ТФ-6 и ТФ-8 эти изменения не так значительны как для смесей СМ с другими АО. Это свидетельствует об участии ОН-групп АО в ослаблении межмолекулярной водородной связи СМ. В присутствии ТФ-1, ТФ-5 и ВНТ наблюдается существенное снижение интенсивности валентных колебаний амидной группы СМ, наличие же в смеси ТФ-7 и ТФ-6 практически не влияет на интенсивность колебаний данной группировки. Интенсивность полосы колебаний смесей СМ с ТФ-8 при частоте 1650 см^{-1} , также снижается, но не столь значительно, как в присутствии ТФ-5, ТФ-1 и ВНТ.

По уменьшению влияния СМ на ИК-характеристики ОН-группы ИБФ их можно расположить в следующей последовательности: ТФ-7 > ТФ-8 \geq

$\text{ТФ-1} \geq \text{ТФ-5} = \text{ТФ-6}$. Видно, что наибольшим изменениям относительно спектров индивидуальных компонентов подвержена смесь СМ с ТФ-7, а наименьшим – с ТФ-5 и ТФ-6. Это позволяет предположить, что пространственное экранирование ОН-группы ИБФ играет важную роль в процессе их комплексообразования со СМ.

По уменьшению величины ΔA (%) в зависимости от структуры ИБФ в смеси с ЛС (партия 6) образуется следующий ряд: $\text{ТФ-8} \gg \text{ТФ-6} \geq \text{ТФ-7} \geq \text{ТФ-1} > \text{ТФ-5}$, отличный от аналогичной последовательности со СМ. Как и ожидалось, наименьшим отклонением от оптической плотности суммарного спектра характеризовалась смесь ЛС с ВНТ, что может быть объяснено пространственной затрудненностью ОН-группы в структуре ионола. И напротив, наиболее значительные отклонения выявлены для смесей лецитина с ИБФ, в молекуле которых имеется только один заместитель в орто-положении относительно гидроксильной группы. Несмотря на то, что размер мицелл ЛС в н-гексане ниже, чем в случае СМ, зафиксировано уменьшение размера мицелл на 93-97% в случае смесей ЛС с фенолами, в молекулах которых изоборнильный заместитель находится только в одном орто-положение относительно гидроксильной группы. Показано, в случае эквимольных смесей ЛС с ТФ-7 и ВНТ не наблюдается достоверных изменений размера мицелл, тогда как в случае смесей ЛС с ТФ-1, ТФ-5, ТФ-6 и ТФ-8 наблюдается значительное снижение размера агрегатов (в 20-40 раз), что свидетельствует о выраженных цитотоксических свойствах последних. Влияние ИБФ на процесс самоорганизации ЛС уменьшается в ряду: $\text{ТФ-6} > \text{ТФ-1} = \text{ТФ-5} \geq \text{ТФ-8} \gg \text{ТФ-7}$. Что касается влияния ЛС на валентные колебания ОН-группы ИБФ, то препараты можно расположить в следующей последовательности: $\text{ТФ-5} > \text{ТФ-6} > \text{ТФ-8} > \text{ТФ-7} \geq \text{ТФ-1}$. При этом присутствие ЛС в смесях с ТФ-7 и ТФ-1 увеличивает интенсивность колебаний ОН-связи, а в случае смеси с ТФ-5 присутствие ЛС снижает этот показатель, в то время как ВНТ практически не оказывает влияния на данный

параметр. Следовательно, максимальные изменения выявлены для ИБФ, имеющие менее экранированные гидроксильные группы. Как известно, валентные колебания ассиметричной N-C связи в холиновой группировке находится в области частот $990-950\text{ см}^{-1}$. Масштаб воздействия всех ИБФ в смесях с ЛС на интенсивность валентных колебаний ассиметричной N-C связи холиновой группировки практически одинаков, а в присутствии ВНТ эффект практически отсутствует. Изучение ИК-спектров ИБФ с разными алкильными заместителями в *орто*-положении и их влияния на мицеллообразование L- α -фосфатидилхолина в *n*-гексане также свидетельствует о конкуренции экранирующих эффектов метильного, *трет.*бутильного и изоборнильного заместителей и их донорной способности на физико-химические свойства ИБФ [Шишкина и др., 2014].

Процессы комплексообразования наименее выражены в смесях ИБФ с КФ. Это следует из анализа результатов, полученных для смесей КФ с ТФ-5 и ТФ-7 методами УФ- и ИК-спектроскопии и динамического рассеяния света для смесей КФ с ТФ-6 и ТФ-7. КФ оказывает очень слабое воздействие на интенсивность валентных колебаний ОН-группы обоих ИБФ. Как максимальное уменьшение ΔA в молекулярном комплексе с ТФ-5 и ТФ-7, так и доля КФ в комплексе с ТФ-7, существенно ниже, чем с ФЛ внешнего слоя мембран. Кроме того, ТФ-6 и ТФ-7 не оказывают достоверного влияния на процесс самоорганизации КФ в *n*-гексане.

Как было показано в работе [Мазалецкая и др., 2011], все исследованные ИБФ в модельной химической реакции инициированного окисления этилбензола проявляют высокую антирадикальную активность со стехиометрическим коэффициентом ингибирования равным двум, что характерно для большинства фенольных АО.

Однако в модельных биологических системах спонтанного и инициированного гемолиза эритроцитов крови мышей в присутствии

изученных соединений, а также изучение поверхностной архитектуры эритроцитов,

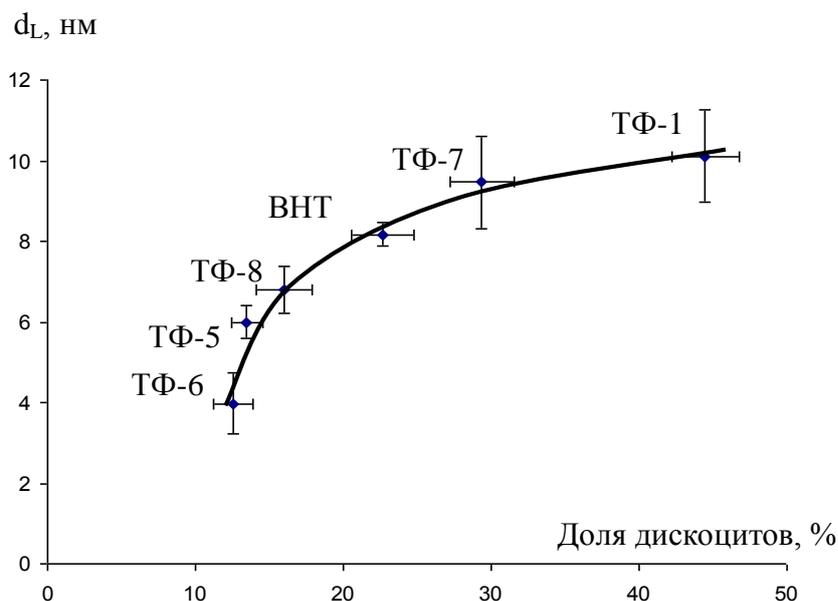


Рис. 6.4. Взаимосвязь между размером мелких мицелл ($d \leq 10$ нм) в смесях лецитина ($[L] = 55$ мкг/мл гексана; $d_L = 15,3 \pm 0,5$ нм) с изученными антиоксидантами и долей дискоцитов в суспензии эритроцитов крови белых беспородных мышей (самцы) при их инкубации с фенольными антиоксидантами ($[АО] = 100$ мкМ) в течение 4-х часов.

показало, что проявление соединениями мембранопротекторных и/или цитотоксических свойств обусловлено их взаимодействием с мембраной [Шевченко и др., 2013].

Сопоставление среднего размера мицелл основной фракции лецитина в смесях с изученными фенольными АО в *n*-гексане и долей дискоцитов в суспензии эритроцитов крови мышей при их инкубации с этими же соединениями в течение четырех часов (рис. 6.4) позволяет предположить, что способность различных соединений влиять на агрегацию лецитина в неполярном растворителе может быть использована в качестве модельной системы как наиболее адекватной для первичной оценки их поверхностно-активных свойств [Шишкина и др., 2012]. В настоящее время модельные

мембраны используются и для исследования свойств липофильных лекарственных средств [Задымова, Иванова, 2013].

Таким образом, совокупность представленных данных позволяет заключить, что биологическая активность ИБФ преимущественно обусловлена их взаимодействием с ФЛ внешнего слоя биологических мембран, а комплексообразование ИБФ со СМ является основой их влияния на структуру биологических мембран.

ВЫВОДЫ

1. Изучены физико-химические характеристики семи препаратов природных фосфолипидов. Показано, что на их физико-химические параметры (УФ-, ИК-спектры, мицеллообразование) существенное влияние оказывают природа основной фракции, полярность среды, время экспозиции растворов и наличие минорных фракций.

2. Методами УФ- и ИК-спектроскопии изучены спектральные характеристики 8 изоборнилфенолов. Показано, что валентные колебания ОН-группы находятся в области, характерной для пространственно незатрудненных фенолов. Для гибридных соединений, содержащих и изоборнильный, и *трет.*бутильный заместители в *орто*-положениях помимо основной полосы колебаний в области 3613 см^{-1} обнаружена дополнительная гораздо менее интенсивная полоса при $3655\text{--}3656\text{ см}^{-1}$, что свидетельствует о частичном экранировании ОН-группы в данных соединениях.

3. Доказано наличие молекулярных комплексов переменного состава природных фосфолипидов и изоборнилфенолов. Изучено влияние структуры изоборнилфенолов и природы основной фракции фосфолипидов на процесс комплексообразования, зависящий от полярности среды. Наименее выраженная способность к комплексообразованию выявлена у изоборнилфенола с более экранированной ОН-группой. По вовлеченности в процесс комплексообразования независимо от структуры АО препараты фосфолипидов располагаются в последовательности: сфингомиелин > лецитин > кефалин. В комплексообразовании независимо от природы растворителя участвуют ОН-группы ИБФ, сложноэфирная (лецитин), амидная (сфингомиелин) и холиновая группы ФЛ.

4. Методом динамического светорассеяния показано, что исследованные изоборнилфенолы способны влиять на параметры самоорганизации природных фосфолипидов в различных растворителях.

Самые сильные изменения параметров мицеллообразования в присутствии изоборнилфенолов зафиксированы для их смесей с лецитином в *n*-гексане. Обнаружено уменьшение размеров агрегатов лецитина в присутствии изоборнилфенолов, в молекулах которых свободно одно *орто*-положение, что свидетельствует о возможных цитотоксических свойствах данных соединений. Только в присутствии ТФ-7 размеры мицелл в растворе смеси достоверно не отличаются от размеров мицелл индивидуального лецитина. Предложена модель для первичной оценки поверхностно-активных свойств новых соединений по их влиянию на параметры агрегации лецитина в неполярном растворителе.

5. Совокупность представленных данных и анализ литературы свидетельствуют о том, что изоборнилфенолы могут участвовать в регуляции перекисного окисления липидов на разных стадиях; что обусловлено их взаимодействием с фосфолипидами внешнего слоя биологических мембран, а комплексообразование изоборнилфенолов преимущественно со сфингомиелином является основой их влияния на структуру биологических мембран.

Список сокращений:

АО – антиоксидант, антиоксидантный

АПА – антипероксидная активность

БАВ – биологически активные вещества

ВЭЖХ (HPLC) – высокоэффективная жидкостная хроматография

ДК – диеновые конъюгаты

ДМФХ (DMPC) – димиростойлфосфатидилхолин

ДПФХ (DPPC) – дипальмитойлфосфатидилхолин

ДФПГ –дифенилпикрилгидразил

ИБФ – изоборнилфенолы

Ионол (ВНТ) – 4-метил-2,6-дипретбутилфенол

КД – кетодиены

КФ – L- α -кефалин

ЛС – лецитин-стандарт

ЛФХ – лизоформы фосфолипидов (LPC)

ПАВ – поверхностно-активные вещества

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СМ – сфингомиелин (SM)

ФГ – фосфатидилглицерин

ФИ - фосфатидилинозит

ФЛ – фосфолипиды

ФС – фосфатидилсерин

ФХ – фосфатидилхолин (PC)

ФЭ – фосфатидилэтанолламин (PE)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антошина, С. В. Влияние флавоноидов различной структуры на перекисное окисление нейтральных липидов животного происхождения [Текст] / С. В. Антошина, А. А. Селищева, Г. М. Сорокоумова, Е. А. Уткина, П. С. Дегтярев, В. И. Швец // Прикл. Биохим. и микробиол. – 2005. – Т. 41. – № 1. – С. 23-28.
2. Аристархова, С. А. Регуляторная роль взаимосвязи изменений в концентрации антиоксидантов и составе липидов клеточных мембран [Текст] / С. А. Аристархова, Г. В. Архипова, Е. Б. Бурлакова, В. О. Гвахария, Н. Н. Глущенко, Н. Г. Храпова // Докл. АН СССР – 1976. – Т. 228. – № 1. – С. 215-218
3. Балли, М. Б. Текучесть мембраны в биологии: концепции мембранных структур [Текст] / М. Б. Балли, Б. Бестерлинг, Дж. Д. Брейлсфорд: Пер. с англ. Киев: Наук. Думка, 1989. – 312 с.
4. Беллами, Л. Инфракрасные спектры сложных молекул [Текст] / Л. Беллами Пер. с англ. Акимов В. М., Пентин Ю. А., Тетерин Э. Г. под ред. Пентина Ю. А. – М: Издательство иностранной литературы, 1963. – 590 с.
5. Биологические мембраны. Методы [Текст] / Под ред. Дж. Б. Финдлея, У.Г. Эванза. – М.: Мир, 1990. 424 с.
6. Богуславская, Л. В. Синергическое влияние фосфолипидов на антиоксидантную активность природных полигидроксинафтахинонов [Текст] / Л. В. Богуславская, Е. Б. Бурлакова, Е. А. Кольцова, О. Б. Максимов, Н. Г. Храпова // Биофизика. – 1990. – Т. 35. – С. 928-932.
7. Брин, Э. Ф. Моделирование механизмов химических реакций [Текст] / Э. Ф. Брин., С. О. Травин // Хим. Физика. – 1991. – Т. 10. – № 6. – С.830-837.

8. Бурлакова, Е. Б. Биоантиоксиданты и синтетические ингибиторы радикальных реакций [Текст] / Е. Б. Бурлакова // Успехи химии. – 1975. – Т. 44. – № 10. – С.874 - 886.

9. Бурлакова, Е. Б. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте [Текст] / Е. Б. Бурлакова, А. В. Алесенко, Е. М. Молочкина, Н. П. Пальмина, Н. Г. Храпова. М.: Наука, 1975. – 211 с.

10. Бурлакова, Е. Б. Ингибирующее действие смесей фенольных антиоксидантов и фосфатидилхолина [Текст] / Е. Б. Бурлакова, Л. И. Мазалецкая, Н. И. Хрустова, Л. Н. Шишкина // Изв. РАН Сер. химич. – 1995. – № 6. – С. 1053-1059.

11. Бурлакова, Е. Б. Кинетические особенности токоферолов как антиоксидантов [Текст] / Е. Б. Бурлакова, Н. М. Сторожок, Н. Г. Храпова. Черногловка, 1992. – 56 с.

12. Бурлакова, Е. Б. Роль токоферолов в пероксидном окислении липидов биомембран [Текст] / Е.Б. Бурлакова, С. А. Крашаков, Н. Г. Храпова // Биологические мембраны. – 1998. – Т. 15. – № 2. – С. 137-167.

13. Бурлакова, Е. Б. Изучение аддитивного антиокислительного действия суммы природных антиоксидантов липидов [Текст] / Е. Б. Бурлакова, Н. М. Сторожок, Н. Г. Храпова // Вопросы медицинской химии. – 1990. – Т.36. – № 4. – С. 72-74.

14. Бурлакова, Е. Б. Биоантиоксиданты: вчера, сегодня, завтра [Текст] / Е.Б. Бурлакова // Биологическая кинетика. Сб. обзорных статей. – Т.2 – М.: Химия, – 2005. – с. 10-45.

15. Бурлакова, Е. Б. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты [Текст] / Е. Б. Бурлакова, Н. Г. Храпова // Успехи химии – 1985. – Т.54. – № 9. – С. 1540-1558.

16. Василенко, И. А. Сравнительное изучение гепатопротекторных препаратов Эссенциале® Форте Н, Фосфоглив,

Эссливер Форте [Текст] / И. А. Василенко, Г. В. Долгова, Г. М. Сорокоумова, М. Н. Хайретдинова, Т. Я. Померанцева // Русский медицинский журнал. – 2013. – № 13. – С. 681-684.

17. Владимиров, Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах [Текст] / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков. – М.: Наука, 1972. – 252 с.

18. Владимиров, Ю. А. Свободно-радикальное окисление липидов и физические свойства липидного слоя биологических мембран [Текст] / Ю. А. Владимиров // Биофизика. – 1987. – Т. 32. – № 5. – С. 830-844.

19. Геннис, Р. Биомембраны. Молекулярная структура и функции [Текст] / Р. Геннис. – М.: Мир, 1997. – 624с.

20. а) Гоготов, А. Ф. Инновации в ингибировании. Терпенофенолы – новое поколение высокоэффективных ингибиторов полимеризации для процессов переработки жидких продуктов пиролиза [Текст] / А. Ф. Гоготов, И. И. Батура, И. Ю. Чукичева, А. В. Кучин, А. А. Левчук, Д. Т. Тай, О. И. Баранов, Е. В. Пученин. // Нефтепереработка и нефтехимия. – 2011. – № 1. С. 27-31.

21. б) Гоготов, А. Ф. Пространственно затрудненные терпенофенолы в качестве эффективных ингибиторов термополимеризационных производств [Текст] / А. Ф. Гоготов, И. Ю. Чукичева, А. А. Левчук, Е. В. Буравлёв, Д. Т. Тай, И. И. Батура, А. В. Кучин. // Химия растит. сырья. – 2011. – № 4. – С. 287-294.

22. Грибанов, Г. А. Особенности структуры и биологическая роль лизофософолипидов [Текст] / Г. А. Грибанов // Вопр. мед. химии. – 1991. – Т. 37. – № 4. – С. 2-10.

23. Денисов, Е. Т. Ингибирование цепных реакций [Текст] / Е. Т. Денисов, В. В. Азатян. – Черноголовка, 1996. – 268 с.

24. Денисов, Е. Т. Кинетические критерии эффективности ингибиторов окисления [Текст] / Е. Т. Денисов, Н. М. Эмануэль // Кинетика и катализ. – 1973. – Т. 14. – № 4. – С. 823-829.
25. Дмитриев, Л. Ф. О механизме взаимодействия токоферола с перекисными радикалами [Текст] / Л. Ф. Дмитриев, М. И. Верховский // Биохимия. – 1990. – Т. 55. – № 4. – С. 2025-2030.
26. Ерин, А. Н. Взаимодействие α -токоферола со свободными жирными кислотами. Механизм стабилизации микровязкости липидного бислоя [Текст] / А. Н. Ерин, Н. В. Горбунов, В. И. Скрыпин // Биол. науки. – 1987. – № 1. – С. 10-16.
27. Ерин, А. Н. Образование комплексов α -токоферола с жирными кислотами. Возможный механизм стабилизации мембран витаминов Е [Текст] / А. Н. Ерин, М. М. Спиринов, Л. В. Табидзе // Биохимия. – 1983. – Т. 48. – С. 1855-1861.
28. Ершов, В. В. Пространственно-затрудненные фенолы [Текст] / В. В. Ершов, Г. А. Никифоров, А. А. Володькин. – М.: Химия, 1972. – 352 с.
29. Задымова, Н. М. Совместная солюбилизация липофильного лекарства амлодипина и глицерил монолаурата в водных мицеллярных растворах Твин 80 [Текст] / Н. М. Задымова, Н. И. Иванова // Вестник МГУ. – 2013. – Т. 54. – № 2. – С. 112-120.
30. Золотова, Т. В. Некоторые особенности механизма синегризма при действии смесей ингибиторов, обрывающих цепи окисления и разрушающих перекиси [Текст] / Т. В. Золотова, Г. В. Карпухина, З. К. Майзус, Н. М. Эмануэль // Докл. АН СССР. – 1975. – Т. 223. – № 2. С. 120-123.
31. Ивков, В. Г. Динамическая структура липидного бислоя [Текст] / В. Г. Ивков, Т. Н. Берестовский. – М.: Наука, 1981. – 296 с.

32. Ингольд, К. Ингибирование автоокисления органических соединений в жидкой фазе [Текст] / К. Ингольд пер. с англ. А. Б. Гагарина, Н. Г. Пучков // Успехи химии. – 1974. – Т. 33. – № 9.

33. Иоффе, Б. В. Физические методы определения строения органических соединений [Текст] / Б. В. Иоффе, Р. Р. Костиков, В. В. Разин / М.: Высш. Школа, 1984.

34. Исследование синтетических и природных антиоксидантов *in vitro* и *in vivo*: Сб. науч. ст. / Московское общество испытателей природы; Институт химической физики им. Н.Н. Семенова, - М.: Наука, 1992. – 100 с.

35. Каган, В. Е. Проблемы анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов [Текст] / В. Е. Каган, О. Н. Орлов, Л. Л. Прилипко // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. М.: ВИНТИ. 1986. – Т. 18. – С. 5-135.

36. Касаикина, О. Т. Ингибирующая активность природных фенольных антиоксидантов в процессе окисления липидных субстратов [Текст] / О. Т. Касаикина, В. Д. Кортенска, Э. М. Маринова, И. Ф. Русина, Н. В. Янишлиева // Изв. Академии наук. Сер. хим. – 1997. – № 6. – С. 1119-1122.

37. Козлов, М. В. Влияние характеристик липидов на регуляцию биохимических процессов в печени и крови животных [Текст] / М. В. Козлов, Е. В. Кушнирева, В. В. Урнышева, Ю. П. Таран, Л. Н. Шишкина // Биофизика. – 2007. – Т. 52. - № 4. – С. 693-698.

38. Козлов, М. В. Значимость исходного состояния печени мышей для формирования последствий совместного действия факторов разной природы / М.В. Козлов, К.М. Маракулина, Л.Н. Шишкина // Радиационная Биология. Радиоэкология – 2012. – Т. 52. - № 1. – С. 44-49.

39. Козлов, Ю. Т. Свободнорадикальное окисление липидов в биологических мембранах [Текст] / Ю. Т. Козлов, В. С. Данилов, В. Е. Каган, М. В. Ситковский – М.: Изд. МГУ, – 1972. – 79 С.
40. Колычев, В. Б. Спектроскопические методы в химии комплексных соединений [Текст] / В. Б. Колычев, В. И. Парамонова // Под ред. В. М. Вдовенко. – М.: Химия, 1964.
41. Корнена, Е. П. Ассоциация фосфолипидов в неполярных растворителях [Текст] / Е. П. Корнена, Н. А. Пономарева, Н. С. Арутюнян // Масло-жировая промышленность. – 1984. – № 6. – С. 15-16.
42. Корнена, Е. П. Влияние температуры на ассоциацию фосфолипидов соевых масел в неполярных растворителях [Текст] / Е. П. Корнена, В. С. Косачев, Н. С. Арутюнян // Известия вузов. Сер. Пищевая технология. – 1983. – № 6. – С. 19-22.
43. Костромина, Н. А. Химия координационных соединений [Текст] / Н. А. Костромина, В. Н. Кумок, Н. А. Скорик. – М.: Высшая школа, –1990. – 432 с.
44. Крепс, Е. М. Липиды клеточных мембран [Текст] / Е. М. Крепс – Л.: Наука, – 1981. – 399 с.
45. Лакин, Г. Ф. Биометрия. 3-е изд. [Текст] / Г. Ф. Лакин. – М.: Высш.Шк., – 1980. – 293 с.
46. Левчук, Ю. Н. Размеры лецитиновых липосом, образующихся при воздействии ультразвука [Текст] / Ю. Н. Левчук, З. Н. Воловик // Биофизика – 1983. – Т.28. – № 2. – С.266-269.
47. Мазалецкая, Л. И. Роль азотсодержащего фрагмента фосфатидилхолинов в механизме ингибирующего действия их смесей с природными и синтетическими антиоксидантами [Текст] / Л. И. Мазалецкая, Н. И. Шелудченко, Л. Н. Шишкина // Нефтехимия. – 2008. – Т. 48. – № 2. – с. 105-111.

48. а) Мазалецкая, Л. И. Влияние структуры изоборнилфенолов на их антирадикальную активность [Текст] / Л. И. Мазалецкая, Н. И. Шелудченко, Л. Н. Шишкина, А. В. Кучин, И. Ю. Чукичева // Тез. Докл. VIII Всерос. Конф. «Химия и медицина». Уфа.: Гилем, – 2010. – С. 235-236.

49. б) Мазалецкая, Л. И. Влияние лецитина на эффективность антиоксидантного действия флавоноидов и α -токоферола [Текст] / Л. И. Мазалецкая, Н. И. Шелудченко, Л. Н. Шишкина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46 – № 2. – С. 148-152.

50. в) Мазалецкая, Л. И. Влияние лецитина на эффективность ингибирования α -токоферолом окисления метиолеата [Текст] / Л. И. Мазалецкая, Н. И. Шелудченко, Л. Н. Шишкина // Биофизика. – 2010. – Т. 55. – № 1. – С. 25-31.

51. Мазалецкая, Л. И. Кинетические характеристики реакции изоборнилфенолов с пероксирадикалами [Текст] / Л. И. Мазалецкая, Н. И. Шелудченко, Л. Н. Шишкина, А. В. Кучин, И. Ю. Чукичева // Нефтехимия. – 2011. – Т. 28. – № 1. С. 78-80.

52. а) Мазалецкая, Л. И. Влияние лецитина на ингибирующую эффективность изоборнилфенолов [Текст] / Л. И. Мазалецкая, Н. И. Шелудченко, Л. Н. Шишкина, А. В. Кучин, И. В. Федорова, И. Ю. Чукичева // Журнал физической химии. – 2012. – Т. 86. – №9. – с. 1532-1538.

53. б) Мазалецкая, Л. И. Реакционная способность терпенофенолов в различных модельных системах [Текст] / Л. И. Мазалецкая, Н. И. Шелудченко, Л. Н. Шишкина, Л. Б. Дудник, Е. В. Буравлёв, А. В. Кучин, И. В. Федорова, И. Ю. Чукичева // Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы докладов VIII Международного симпозиума. Москва, 2-5 октября 2012 г. отв. ред. Н. В. Загоскина. – М.: ИФР РАН, РУДН, – 2012. – С. 110-116.

54. в) Мазалецкая, Л. И. Ингибирующая активность изокамфилзамещенных фенолов и их смесей с 2,6-дитрет-бутилфенолом в реакции инициированного окисления этилбензола [Текст] / Л. И. Мазалецкая, Н. И. Шелудченко, Л. Н. Шишкина, А. В. Кучин, И. В. Федорова, И. Ю. Чукичева // Журнал физической химии. – 2012. – Т. 86. – № 6. – С. 1035.

55. а) Мазалецкая, Л. И. Влияние полярности среды и водородной связи на реакционную способность *o*-алкил- и *o*-алкоксифенолов в различных модельных системах [Текст] / Л. И. Мазалецкая, Н. И. Шелудченко, Ю. К. Луканина, Л. Н. Шишкина // Химическая физика. – 2013. – Т. 32. – N 3. – С. 31-34.

56. б) Мазалецкая, Л. И. Третичные аминометилфенолы и метиленбисфенолы с изоборнильными заместителями в реакции с пероксирадикалами и дифенилпикрилгидразилом [Текст] / Л. И. Мазалецкая, Н. И. Шелудченко, Л. Н. Шишкина, Е. В. Буравлёв, И. Ю. Чукичева, А. В. Кучин // Журнал физической химии. – 2013. – Т. 87. – № 4. – С. 584-589.

57. Макаренко, С. П. Исследование влияния гидратации на структуру фосфатидилхолина методом ИК-спектроскопии с использованием математических методов обработки спектров [Текст] / С. П. Макаренко, Р. К. Саляев, С. М. Кобычева, З. А. Труфанова // Спектроскопические методы исследования в физиологии и биохимии. – 1987. – С. 131-135.

58. Маракулина, К. М. Влияние состава фосфолипидов на их агрегацию в неполярном растворителе [Текст] / К. М. Маракулина, И. Г. Плащина, М. В. Козлов, Л. Н. Шишкина // Бутлеровские сообщения. – 2011. – Т. 25. – № 7. – С. 96-100.

59. а) Маракулина, К. М. Использование методов УФ- и ИК-спектроскопии для исследования комплексообразования молекул

сфингомиелина с фенольными антиоксидантами [Текст] / К. М. Маракулина, Р. В. Крамор, Ю. К. Луканина, М. В. Козлов, Л. Н. Шишкина // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. – 2012. – Т. 53. – № 4. – С. 261-268.

60. б) Маракулина, К. М. Роль структуры изоборнилфенолов и полярности растворителя в комплексообразовании с лецитином [Текст] / К. М. Маракулина, Ю. К. Луканина, Р. В. Крамор, И. Ю. Чукичева, А. В. Кучин, Л. Н. Шишкина // Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы докладов VIII Международного симпозиума. Москва, 2-5 октября 2012 г. отв. ред. Н.В. Загоскина. – М.: ИФР РАН, РУДН,– 2012. –С. 116-121.

61. Маракулина, К. М. Влияние природы фосфолипидов на параметры их комплексообразования с 4-метил-2,6-диизоборнилфенолом [Текст] / К. М. Маракулина., Р. В. Крамор, Ю. К. Луканина, И. Г. Плащина, Л. Н. Шишкина, И. В. Федорова, И. Ю. Чукичева, А. В. Кучин // Химия и фармакология растительных веществ. Всерос. научн. конф. Сыктывкар, 2014 г. С. 130-132.

62. Маракулина, К. М. Влияние природы фосфолипидов на масштаб их взаимодействия с антиоксидантами нового класса – изоборнилфенолами [Текст] / К. М. Маракулина, Р. В. Крамор, Ю. К. Луканина, И. Г. Плащина, А. В. Поляков, И. В. Федорова, И. Ю. Чукичева, А. В. Кучина, Л. Н. Шишкина // ЖФХ. – 2016. – Т. 90. – № 2. –С. 182-189.

63. Марголис, Л.Б. Липосомы и их взаимодействие с клетками [Текст] / Л. Б. Марголис, Л. Д. Бергельсон. – М.: Наука, – 1986. – 240 с.

64. Мартовщук, В. И. О межфазной активности и мицеллообразовании лецитина в неполярных жидкостях [Текст] / В. И. Мартовщук, Т. В. Мгебришвили, А. В. Паукова // Масло-жировая промышленность. – 1978. – № 6. – С. 14-16.

65. Меньшов, В. А. Влияние биосорбентов на содержание и антиоксидантные свойства липидов среды [Текст] / В. А. Меньшов, Л. Н. Шишкина, З. Н. Кишковский // Прикладная биохимия и микробиология. – 1994. – Т. 30. – № 3. – С. 441-453.

66. Меньшов, В. А. Липиды биосорбентов: состав, структура, свойства и стабильность при хранении [Текст] / В. А. Меньшов, Л. Н. Шишкина, З. Н. Кишковский // Прикладная биохимия и микробиология. – 1993. – Т. 29. – № 4. – С. 900-910.

67. а) Новаков, И. А. Реологические и вулканизационные свойства эластомерных композиций [Текст] / И. А. Новаков, С. И. Вольфсон, О. М. Новопольцева. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – 332 с.

68. б) Новаков, И. А. Исследование терпенофенолов в качестве стабилизаторов эластомерных композиций [Текст] / И. А. Новаков, А. В. Кучин, О. М. Новопольцева, И. Ю. Чукичева, Ю. Д. Соловьева. // Сборник XII международной научно-практической конференции «Резиновая промышленность. Сырьё, материалы, технологии». – Москва. – 2006. – С. 88.

69. а) Новаков, И. А. Оценка стабилизирующего действия терпенофенолов на термоокислительную деструкцию [Текст] / И. А. Новаков, О. М. Новопольцева, Ю. Д. Соловьева, А. В. Кучин, И. Ю. Чукичева // Известия высших учебных заведений. Серия: Химия и химическая технология. – 2012. – Т.55. № 12. – С. 90-93.

70. б) Новаков, И. А. Фенольные антиоксиданты: направления и перспективы практического использования [Текст] / И. А. Новаков, О. М. Новопольцева, Ю. Д. Соловьева, А. В. Кучин, И. Ю. Чукичева // Химическая промышленность сегодня. – 2012. - № 12. – С. 25-33.

71. Новаков, И. А. Оценка стабилизирующего действия терпенофенольных соединений в процессе старения полиизопренового

каучука СКИ-3 [Текст] / И. А. Новаков, О. М. Новопольцева, Ю. Д. Соловьева, А. В. Кучин, И. Ю. Чукичева // Известия ВолгГТУ. Серия «Химия и технология элементоорганических мономеров и полимерных материалов». – 2010. – Т.2. – № 7. – С. 133-136.

72. Окуневич, И. В. Антиоксиданты: эффективность природных и синтетических соединений в комплексной терапии сердечно-сосудистых заболеваний [Текст] / И. В. Окуневич, Н. С. Сапронов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2004. – Т. 3 – № 3. – С. 2-17.

73. Обухова, Л. К. Роль свободнорадикальных реакций окисления в молекулярных механизмах старения живых организмов [Текст] // Успехи химии. – 1983. – Т. 52. – С. 353-372.

74. Панорама современной химии России. Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты. Том 1. Химическая кинетика.: Сб. обзорных статей. – М: Химия, 2005. – 704 с.

75. Панорама современной химии России. Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты. Том 2. Биологическая кинетика.: Сб. обзорных статей. – М: Химия, 2005. – 600 с.

76. Пентин, Ю. А. Физические методы исследования в химии [Текст] / Ю. А. Пентин, Л. В. Вилков / М.: Мир, 2006. – 683 с.

77. Пентин, Ю. А. Основы молекулярной спектроскопии [Текст] / Ю. А. Пентин, Г. М. Курамшина / М.: Мир, 2008.

78. Плотников, М. Б. Синтез и биологическая активность производных *o*-изоборнилфенола [Текст] / М. Б. Плотников, В. И. Смольякова, И. С. Иванов, А. В. Кучин, И. Ю. Чукичева, Е. В. Буравлев, Е. А. Краснов // Химико-фармацевтический журнал. – 2010. – Т. 44. - № 10. – С. 9-12.

79. Плотников, М. Б. Антитромбогенная и антитромбоцитарная активность производного *орто*-изоборнилфенола

[Текст] / М. Б. Плотников, В. И. Смольякова, И. С. Иванов, А. В. Кучин, И. Ю. Чукичева, Е. А. Краснов // Бюлл. Эксп. Биол. имед. – 2008. – Т. 145. – № 3. – С. 296 – 299.

80. Плотников, М. Б. Нейропротекторные эффекты диборнола и механизмы действия при ишемии головного мозга [Текст] / М. Б. Плотников, Г. А. Чернышова, В. И. Смольякова, И. С. Иванов, А. В. Кучин, И. Ю. Чукичева, Е. А. Краснов // Вестник Росс. АМН. – 2009. – № 11. – С. 12-17.

81. Преч, Э. Определение строения органических соединений [Текст] / Э. Преч, Ф. Бюльманн, К. Аффельтер / М.: Мир, 2006.

82. а) Рогинский, В. А. Ингибирующая способность жирорастворимых и водорастворимых фенолов при окислении липидов в микрогетерогенных системах [Текст] / В. А. Рогинский // Биологические мембраны. – 1990. – Т. 7. – № 4. – С. 437-451.

83. б) Рогинский, В. А. Кинетической модели перекисного окисления в липидном бислое [Текст] / В. А. Рогинский // Молекулярная биология. – 1990. – Т. 24. – № 6. – С. 1582-1589.

84. Рогинский, В. А. Фенольные антиоксиданты: Реакционная способность и эффективность [Текст] / В. А. Рогинский. – М.: Наука, – 1988. – 247 с.

85. Рыжкина, И. С. Взаимосвязь самоорганизации, физико-химических свойств и биологической активности водных растворов гема [Текст] / И. С. Рыжкина, Ю. В. Киселева, Г. А. Желтухина, С. А. Окороченков, Л. И. Муртазина, А.П. Тимошева, В. Е. Небольсин, академик А. И. Коновалов // Доклады академии наук. – 2011. – Т. 440. – № 1. – С. 59-63.

86. Рыжкина, И. С. Влияние концентрации α -токоферола на самоорганизацию, физико-химические свойства растворов и структуру биологических мембран [Текст] / И. С. Рыжкина, Ю. В. Киселева, Л. И.

Муртазина, Н. П. Пальмина, В. В. Белов, Е.Л. Мальцева, Е. Д. Шерман, А.П. Тимошева, академик А. И. Коновалов // Доклады академии наук. – 2011. – Т. 438. – № 5. – С. 635-639.

87. Свердлова, О.

В. Электронные спектры в органической химии. – 2-е изд., перераб. [Текст] / О. В. Свердлова. Л.: Химия, 1985. – 248 с.

88. Тарусов, Б. Н. основы биологического действия радиоактивных излучений [Текст] / Б. Н. Тарусов. М.: Медгиз, 1954. – 140 с.

89. Уткина, Е. А. Влияние на перекисное окисление фосфолипидов генистеина и дайдзеина, полученных кислотным гидролизом их гликозидов / Е. А. Уткина, С. В. Антошина, А. А. Селищева, Г. М. Сорокоумова, Е. А. Рогожкина, В. И. Швец // Биоорганическая химия. – 2004. – Т. 30. – № 4. – С. 429-435.

90. Хмельницкий, А. И. Спектроскопические свойства хромофоров липидсодержащих систем: дис. ... канд. физ.-мат. наук: 01.04.05 [Текст] / Хмельницкий Александр Ильич. – Минск, 1985. – 167 с.

91. Холмберг, К. Поверхностно-активные вещества и полимеры в водных растворах [Текст] / К. Холмберг, Б. Йёнссон, Б. Кронберг, Б. Линдман: Пер. с англ. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007. – 528 с.

92. Храпова, Н. Г. Перекисное окисление липидов биологических мембран и пищевые добавки / Н. Г. Храпова // Панорама современной химии России. Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты. Том 2. Биологическая кинетика: Сб. обзорных статей. М.: Химия, 2005. – С. 46-61.

93. Хрустова, Н. В. Роль пероксидов в механизме низкотемпературного автоокисления метилолеата и его растворов с

липидами [Текст] / Н. В. Хрустова, Л. Н. Шишкина. // Кинетика и катализ. – 2004. – Т. 45. – № 6. – С. 848-858.

94. а) Хрустова, Н. В. Влияние физико-химических характеристик липидов на взаимосвязь состава липидов с индексом печени мышей [Текст] / Н. В. Хрустова, Л. Н. Шишкина // ЖЭБФ. – 2011. – Т. 47. - № 1. – С. 35-39.

95. б) Хрустова, Н. В. Влияние физико-химических свойств липидов печени мышей на взаимосвязь между показателями их состава [Текст] / Н. В. Хрустова, М. В. Козлов, Л. Н. Шишкина // Биофизика клетки. – 2011. – Т. 56. - № 4. – С. 668-672.

96. Цепалов, В. Ф. Определение констант скорости и коэффициентов ингибирования фенолов-антиоксидантов с помощью модельной цепной реакции [Текст] / В. Ф. Цепалов, А. А. Харитонов, Г. П. Гладышев, Н. М. Эмануэль // Кинетика и Катализ. – 1977. – Т. 18. – № 5. С. 1261-1267.

97. Чукичева, И. Ю. Природные и синтетические терпенофенолы [Текст] / И. Ю. Чукичева, А. В. Кучин // Российский химический журнал. – 2004. – Т. XLVIII. – № 3. – С. 21-38.

98. Шарафутдинова, Р. Р. Исследование конформационного состояния кверцетина при комплексообразовании с лецитином [Текст] / Р. Р. Шарафутдинова, Р. С. Насибуллин, Е. Р. Фахретдинова // Химическая физика и мезоскопия. – 2008. – Т. 10. – № 4. – С.510-513.

99. Шведова, А. А. Исследование синтетических и природных антиоксидантов *in vitro* и *in vivo* [Текст] / А. А. Шведова, Н. Б. Полянский М.: Наука., 1992. – С. 74-76.

100. Шевченко, О. Г. Мембранопротекторные свойства изоборнилфенолов – нового класса антиоксидантов [Текст] / О. Г. Шевченко, С. Н. Плюсина, Л. Н. Шишкина, И. Ю. Чукичева, И. В.

Федорова, А. В. Кучин // Биологические мембраны. – 2013. – Т.30. – № 1. – С.40.

101. Шишкина, Л.Н. Особенности функционирования физико-химической системы регуляции перекисного окисления липидов в биологических объектах разной степени сложности в норме и при действии повреждающих факторов. автореф. дис. д-ра. хим. наук. 03.00.02 [Текст] / Шишкина Людмила Николаевна. – М., 2003. – 45 с.

102. Шишкина, Л. Н. Кинетические характеристики липидов тканей млекопитающих в реакциях автоокисления [Текст] / Л. Н. Шишкина, Н. В. Хрустова // Биофизика. – 2006. – Т. 51. – № 2. – С. 340-346.

103. а) Шишкина, Л. Н. Ингибирующая эффективность фенольных соединений *in vitro* и *in vivo* [Текст] / Л. Н. Шишкина // Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы докладов VIII Международного симпозиума. Москва, 2-5 октября 2012 г. / отв. ред. Н.В. Загоскина. – М.: ИФР РАН; РУДН, 2012. – С. 195-200.

104. а) Шишкина, Л. Н. Поверхностно-активные свойства изоборнилфенолов в системах различной степени сложности [Текст] / Л.Н.Шишкина, М.В.Козлов, К.М. Маракулина, И.Г. Плащина, С.Н. Плюснина, О.Г. Шевченко, И.В. Федорова, И.Ю. Чукичева, А.В. Кучин // Биофизика. – 2012. – Т. 57. - № 6. – С. 1008.

105. Шишкина, Л. Н. Влияние природы алкильного заместителя на кинетические характеристики и поверхностно-активные свойства изоборнилфенолов [Текст] / Л. Н. Шишкина, Л. И. Мазалецкая, К. М. Маракулина, И. Г. Плащина, Н. И. Шелудченко, А. В. Кучин, И. Ю. Чукичева // “Biological Active Substances and Materials: fundamental and applied problems”. 27 мая – 1 июня 2013 г. Новый Свет, Крым, Украина. – Том I. – С. 113-114.

106. а) Шишкина, Л. Н. Биологические модельные системы для изучения механизма формирования отдаленных последствий воздействия неблагоприятных экологических факторов на организм [Текст] / Л. Н. Шишкина, М. А. Климович, М. В. Козлов, Ю. К. Луканина, К. М. Маракулина, В. А. Меньшов, Н. В. Хрустова, О. Г. Шевченко // коллективная монография «Здоровье населения России: влияние окружающей среды в условиях изменяющегося климата» / Под общ редакцией акад. А.И. Григорьева, Российская академия наук. М. Наука, 2014. С. 217-240 (глава 2.1.2.).

107. а) Шишкина, Л. Н. Кинетические характеристики и физико-химические свойства изоборнилфенолов с разными алкильными заместителями в *o*-положении [Текст] / Л. Н. Шишкина, Л. И. Мазалецкая, К. М. Маракулина, Ю. К. Луканина, И. Г. Плащина, Н. И. Шелудченко, Е. В. Буравлев, И. В. Федорова, И. Ю. Чукичева, А. В. Кучин // Изв. Академии наук. Сер. химическая. – 2014. – № 9. – С. 2007-2012.

108. Шишкина, Л. Н. Ингибирующая эффективность антиоксидантов в системах разной степени сложности [Текст] / Л. Н. Шишкина, М. В. Козлов // Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты: международная конференция молодых ученых и VII школа им. Академика Н.М. Эмануэля: лекции и тезисы. Москва, 1-3 октября 2015 г. – Москва: РУДН, 2015. – С. 205-217.

109. Эмануэль, Н. М. Торможение процессов окисления жиров [Текст] / Н. М. Эмануэль, Ю. Н. Лясковская. М.: Пищепромиздат, 1961. – 355 с.

110. Ansell, S. B. Form and function of phospholipids [Текст] / S. B. Ansell, Y. N. Hawthorne, R. M. C. Dawson // Amsterdam.: Elsevier. – 1973. – V. 3. – P. 494.

111. Arrondo, J. L. R. Infrared studies of protein-induced perturbation of lipids in lipoproteins and membranes [Текст] / J. L. R. Arrondo, F. M. Goni. // Chemistry and physics of lipids. – 1998. – V. 96. – P. 53.

112. Atkinson, J. Tocopherols and tocotrienols in membranes: A critical review [Текст] / J. Atkinson, R. F. Epand, R. M. Epand // Free Radical Biology & Medicine. – 2008. – Vol. 44. – P. 739.

113. Barclay, L. R. C. Autoxidation of a model membrane: A comparison of the autoxidation of egg lecithin phosphatidylcholine in water and in chlorobenzene [Текст] / L. R. C. Barclay, K. U. Ingold, // J. Am. Chem. Soc. 1980. – V.102. – № 26. – P. 7792.

114. Barclay, L. R. C. The autoxidation of unsaturated lipids in micelles. Synergism of inhibitors vitamins C and E [Текст] / L. R. C. Barclay, S. J. Locke, J. M. Macneil // Can. J. Chem. – 1983. – V. 61. – № 6. – P. 1288-1290.

115. Barclay, L. R. C. Autoxidation and aggregation of phospholipids in organic solvents [Текст] / L. R. C. Barclay, J. M. MacNeil, J. VanKessel, B. J. Forrest, N. A. Porter, L. S. Lehman, K. J. Smith, J. C. Ellington // J. Am. Chem. Soc. – 1984. – V. 106.– № 22. – P. 6740.

116. Barclay, L. R. C. Phenol as antioxidants [Текст] / L. R. C. Barclay, M. R. Vinqvist // The chemistry of phenols. Part 2 / Z. Rappoport, ed. John Wiley & Sons. – 2003. – Ch. 12. – P. 839-908.

117. Blume, A. Turning the aggregation behaviour of single-chain bolaphospholipids in aqueous suspension: from nanoparticles to nanofibres to lamellar phases [Текст] / A. Blume, S. Drescher, A. Meister, G. Graf, B. Dobner // Faraday Discuss.– 2013. –V. 161.-P.193-213.

118. Burton, G. W. Vitamin E as an *in vitro* and *in vivo* antioxidant [Текст] / G. W. Burton, K. U. Ingold // Ann. NY. Acad. Sci. – 1989. – V. 570. -P. 17-22.

119. Burton, G. W. Antioxidation of biological membranes [Текст] / G. W. Burton, V. L. Pade, E. J. Cabe // *J. Amer. Chem. Soc.* – 1998. – V. 102. - P. 7792.
120. Chen, Y. Comparison of quercetin and dihydroquercetin: antioxidant-independent actions on erythrocyte and platelet membrane [Текст] / Y. Chen, P. Deuster // *Chem.-Biol. Interact.* – 2009. – V. 182. - P. 7.
121. Cirri, M. Liquid spray formulations of xibornol by using self-microemulsifying drug delivery systems [Текст] / M. Cirri, P. Mura, P. C. Mora // *Int. J. Pharm.* – 2007. – P. 91.
122. Crane, J. M. Measuring lipid asymmetry in planar supported bilayers by fluorescence interference contrast microscopy [Текст] / J. M. Crane, V. Kiessling, L. K. Tamm // *J. Am. Chem. Soc.* – 2005. – №. 21. - P. 1377
123. Denisov, E. T. Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology [Текст] / E. T. Denisov, I. B. Afanas'ev. – CRC Press, 2005. – 331 p.
124. Dwiecki, K. Antioxadant activity of daidzein, a natural antioxidant, and its spectroscopic properties in organic solvent and phosphatidylcholine liposomes [Текст] / K. Dwiecki, G. Neunert, P. Polewski, K. Polewski // *J. of photochemistry and photobiology.* – 2009. – V. 96. -P. 242.
125. Emanuel, N. M. Oxidation of organic compounds. Effect of medium [Текст] / N. M. Emanuel, G. E. Zaikov., Z. K. Maizus. – NY: Pergamon Press, 1984. – 612 p.
126. Foti, M. Kinetic solvent effects on phenolic antioxidants determined by spectrophotometric measurements [Текст] / M. Foti, P. Ruberto // *J. Agric. Food Chem.* – 2001. – V. 49. – № 1. -P. 342.

127. Frankel, E. N. Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids / E. N. Frankel // Prog. Lipid. Res. – 1985. – V. 23. – P. 197-221.
128. Frankel, E. N. Lipid oxidation [Текст] /E. N. Frankel // Prog. Lipid Res. – 1980. – V. 19. –P.1-22.
129. Frankel, E. N. Lipid oxidation: Mechanisms, products and biological significance [Текст] / E. N. Frankel // JAOCS. – 1984. – V. 61. – № 12. -P. 1908-1917.
130. Frankel, E. N. Secondary products of lipid oxidation [Текст] / E. N. Frankel // Chemistry and Physics of lipids. – 1987. – V. 44. – № 2.- P. 73-85.
131. Giauert, A. M. Electron microscopy of lipids and membranes [Текст] / A. M. Giauert // J. Roy. Microscop. Soc. – 1968. – V.88. – № 1. - P.49.
132. Hielscher, R. Specific far infrared spectroscopic properties of phospholipids / R. Hielscher, P. Hellwig. // Spectroscopy: An international J. – 2012. – V. 27. – Iss. 5-6. – P. 525.
133. Huang, D. The chemistry behind antioxidant capacity assays [Текст] / D. Huang, B. Ou, R. L. Prior // J. Agr. Food Chem. – 2005. – V. 53. – №. 6. -P. 1841-1856.
134. Hubbell, W. L. Transbilayer coupling mechanism for the formation of lipid asymmetry in biological membranes. Application to the photoreceptor disc membrane [Текст] / W. L. Hubbell // J. Biophysical Society. – 1990. – V. 57. – P. 99.
135. Hudson, B. J. Phospholipids as antioxidant synergists for tocoferols in the autoxidation of edible oils [Текст] / B. J. Hudson, M. Chavan // Lebensm. Wiss. Technol. – 1984. – V. 17. – № 4.-P. 191.
136. Ishikawa, Y. Stabilization of tocopherol by three components synergism involving tocopherol, phospholipid and amino compound [Текст]

/ Y. Ishikawa, K. Sugiyama, K. Nakabayashi // JAOCS. – 1984. – V. 61. – № 5. -P. 950-954.

137. Jong, K. Membrane phospholipid asymmetry in DMPC-induced human red cell vesicles [Текст] / K. Jong, P. Ott // FEBS Lett. – 1993. – V.112. – № 49. -P. 183.

138. Laurinavičius, S. Transbilayer distribution of phospholipids in bacteriophage membranes [Текст] / S. Laurinavičius, D. H. Bamford, P. Somerharju // Biochim. Biophys. Acta. – 2007. – P. 2568.

139. a) Leopoldini, M. Structure, conformation, and electronic properties of apigenin, luteolin, and taxifolin antioxidants. A first principle theoretical study [Текст] / M. Leopoldini, I. P. Pitarch, N. Russo, M. Toscano // J. Phys. Chem. A. – 2004. – V. 108. – № 1. -P. 92.

140. б) Leopoldini, M. Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism [Текст] / M. Leopoldini, T. Marino, N. Russo, M. Toscano // J. Phys. Chem. A. – 2004. – V. 108. – № 22. -P. 1916.

141. Lewis, R. N. Fourier transform infrared spectroscopy in the study of lipid phase transitions in model and biological membranes [Текст] / R. N. Lewis, R. N. McElhaney // Methods in Molecular Biology. – 2006. – V. 400. -P. 207.

142. Lezerovich, A. Derivative UV spectra of lipid conjugated dienes [Текст] / A. Lezerovich // JAOCS. – 1986. – V. 63. – № 7. – P. 883.

143. Liu, J. The effect of cholesterol on the intrinsic rate flip-flop as measured by sum-frequency vibration spectroscopy [Текст] / J. Liu, K. L. Brown, J. C. Conboy // Faraday Discuss. – 2013. – V. 161. -P. 49-61.

144. Lu, D. Bornyl- and isobornyl- Δ^8 -tetrahydrocannabinols: A novel class of cannabinergic ligands [Текст] / D. Lu, J. Guo, R. I. Duclos, Jr., A. L. Bowman, A. Makriyannis // J. Med. Chem. – 2008. – V. 51. – №20.-P. 6393–6399.

145. Mahoney, L. R. Inhibition of free-radical reactions. Synergistic effect of 2,6-di-tert-butylphenols on hydrocarbon oxidation retarded by 4-methoxyphenol [Текст] / L. R. Mahoney, M. A. DaRooge // J. Am. Chem. Soc. – 1967. – V. 89. – № 22. –P. 5619.

146. a) Marakulina, K. M. Assessment of the membrane active and membrane protective properties of isobornylphenols in the chemical and biological model systems [Текст] / K. M. Marakulina, I. G. Plaschina, O. G. Shevchenko, S. N. Plyusnina, I. V. Fedorova, M. V. Kozlov, I. Yu. Chekicheva, A. V. Kutchin, L. N. Shishkina // in: Biology and communication in the information age. NY: Nova Publishers. – Ch. 17. – 2013. – P. 225-232.

147. б) Marakulina, K. M. Complexation of lecithine with phenolic antioxidants [Текст] / K. M. Marakulina, R. V. Kramor, Yu. K. Lukanina, L. N. Shishkina, A. V. Kutchin, I. Yu. Chukicheva // in: The Science and engineering of sustainable petroleum / Ed. Rafiq Islam. NY: Nova Publishers. – Ch. 22. – 2013. –P. 215-226.

148. Mazaletskaya, L. I. Influence of the initiation rate of radicals on the kinetic characteristics of quercetin and dihydroquercetin in the methyl oleate oxidation [Текст] / L. I. Mazaletskaya, N. I. Sheludchenko, L. N. Shishkina // in: Chemical Reactions in Gas, Liquid and Solid Phases: Synthesis, Properties and Application. – 2010. – P. 11-20.

149. Mazaletskaya, L.I. Kinetics and Mechanism of Terpenophenols and their Phenoxy Radicals [Текст] / L.I. Mazaletskaya, N.I. Sheludchenko, L.B. Dudnik, L.N. Shishkina // Journal of Nature Science and Sustainable Technology. – 2013. – V. 7. – N. 4. – P. 357-369.

150. McHowat, J. Quantitation of Individual Phospholipid Molecular Species by UV Absorption Measurements [Текст] / J. McHowat, J. Jones, M. H. Creer // Journal of Lipid Research. – 1996. – V. 37. –P. 2450.

151. Mossoba, M. M. Application of on-line capillary GC-FTIR spectroscopy to lipid analysis [Текст] / M. M. Mossoba, R. E. McDonald, M. P. Yurawecz, J. K. G. Kramer // European Journal of Lipid Science and Technology. – 2001. – V. 103. – № 12. -P. 826-830.

152. Niki, E. Antioxidants in reaction to lipid peroxidation [Текст] / E. Niki // Chem. Phys. of Lipids. – 1987. – V. 44.– №. 7. -P. 227-253.

153. Niki, E. Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo* [Текст] / E. Niki // Free Radical Biology and Medicine. – 2010. – V. 49. - Iss. 4. -P. 503–515.

154. Ohvo-Rekilä, H. Cholesterol interactions with phospholipids in membrane [Текст] / H. Ohvo-Rekilä, B. Ramstel, Leppimäki., J. P. Slotte // Progress in Lipid Research. – 2002. – V. 41. -P. 66.

155. Pamplona, R. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: A causal role in aging and longevity [Текст] / R. Pamplona // Biochim. Biophys. Acta. – 2008. -P. 1249.

156. Patel, R. P. Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: Paradoxical effects of peroxy radical scavenging [Текст] / R. P. Patel, B. Boersma, J. H. Crawford, N. Hogg, M. Kirk, B. Kalyanaraman, D. Parks, S. Barnes, V. Darley-Usmar // Free Radical Biology and Medicine. – 2001. – V. 31. -P.1570.

157. Pohle, W. FTIR-spectroscopic characterization of phosphoholine-headgroup model compounds [Текст] / W. Pohle, D. R. Gauger, H. Fritzsche, B. Rattay, C. Selle, H. Binder, H. Böhlig. // J. of Molecular Structure. – 2001. -P. 463.

158. Quinn, P. J. Plasma membrane phospholipid asymmetry [Текст] / P. J. Quinn // Subcell. Biochem. – 2002. – V. 36. -P. 39.

159. Shishkina, L. N. Study of membrane protective properties of isobornylphenols on the erythrocyte induced hemolysis model [Текст] / L. N. Shishkina, O. G. Shevchenko, I. Yu. Chukicheva, A. V. Kutchin // New

Steps in Physical Chemistry, Chemical Physics and Biochemical Physics. NY: Nova Publishers. – Ch. 28. – 2013. –P. 265-278.

160. Ramadan, M. F. Quercetin increases antioxidant activity of soy lecithin in a triolein model system [Текст] / M. F. Ramadan // LWT. – 2008. – V. 41. -P. 581.

161. Singleton, V. L. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent [Текст] / V. L. Singleton, R. Orthofer // Methods in Enzymology. – 1999. – V. 299. - P. 152-178.

162. Socrates, G. Infrared characteristic group frequencies: tables and charts 2nd ed. [Текст] / G. Socrates– New York: Wiley, –1994. -P.249 p.

163. Somerharju, P. The superlattice model of lateral organization of membranes and its implications on membrane lipid homeostasis [Текст] / P. Somerharju, J. A. Virtanen, K. H. Cheng, M. Hermansson // Biochimica et Biophysica Acta. – 2009.–V. 1788.–№ 1 -P. 12-23.

164. Sotirhos, N. Quantitative analysis of phospholipids by ³¹P-NMR [Текст] / N. Sotirhos, B. Herslof, L. Kenne // J. Lipid Res. – 1986. – V. 27. -P. 386-392.

165. Spector, M. S. Chiral molecular self-assembly of phospholipid tubules: A circular dichroism study [Текст] / M. S. Spector, K. R. K. Easwaran, G. Jyothi, J. V. Selinger, A. Singh // Biophysics. – 1996. – V. 93. -P. 1294.

166. Tabart, J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests [Текст] /J. Tabart, C. Kevers, J. Pincemail, J. Defragne, J. Dommès // Food Chem. – 2009. – V. 113. -P. 1233.

167. Takebayashi, J. A method for evaluation of antioxidant activity based on inhibition of free radical-induced erythrocyte hemolysis [Текст] /

J. Takebayashi, J. Chen, A. Tai // *Adv. Protocols in Oxidative Stress, Meth. Mol. Biol.* – 2010. -P.287-296

168. Teague, W. E. Elastic properties of polyunsaturated phosphatidylethanolamines influence rhodopsin function [Текст] / W. E. Teague, O. Soubbias, H. I. Petrache, N. Fuller. K. G. Hines, R. P. Rand, K. Gawrisch // *Faraday Discuss.* – 2013.–V. 161. -P. 383.

169. Wallgren, M. Impact of oxidized phospholipids on the structural and dynamic organization of phospholipids membranes: a combined DSC and solid state NMR study [Текст] / M. Wallgren, L. Beranova, Q. D. Pham, K. Linh, M. Lidman, J. Procek, K. Cyprych, P. K. J. Kinnunen, M. Hof, G. Grobner // *Faraday Discuss.* – 2013. – V. 161. -P. 499-513.

170. Watry, R.M. Vibrational sum-frequency studies of a series of phospholipid monolayers and the associated water structure at the vapor/water interface [Текст] / R. M. Watry, T. L. Tarbuck, R. L. Richmond // *J. Phys. Chem. B.* – 2003. – V. 107. -P. 512.

171. Xu, K. Physicochemical properties and antioxidant activities of luteolin-phospholipid complex [Текст] / K. Xu, B. Liu, Yu. Ma, J. Du, G. Li, H. Gao, Y. Zhang, Z. Ning // *Molecules.* – 2009. – № 14. -P. 3486-3493.

172. Zabelinskii, S.A. Participation of π -electrons of phospholipid molecules in absorption of ultraviolet light in the range of 260-280 nm [Текст] / S. A. Zabelinskii, M. A. Chebotareva, E. P. Shukolyukova, V. V. Furaev, A. I. Krivchenko // *Journal of Evolutionary biochemistry and physiology* – 2005. – V. 41. – №. 3. -P.236-239.

173. Zhou, B. Strictinin as an efficient antioxidant in lipid peroxidation [Текст] / B. Zhou, L. Yang, Zh. L. Liu // *Chemistry and physics of lipids* – 2004. – V. 131. -P. 15-25.