УДК 543.25:543.8

РЕАКЦИИ ФЕНОЛЬНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ С ЭЛЕКТРОГЕНЕРИРОВАННЫМ СУПЕРОКСИД АНИОН-РАДИКАЛОМ И ИХ АНАЛИТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Г.К. Зиятдинова, С.П. Захарова, Г.К. Будников

Аннотация

Установлены параметры электровосстановления кислорода на стеклоуглеродном электроде, модифицированном многослойными углеродными нанотрубками. Отмечено увеличение токов восстановления кислорода и повышение степени обратимости системы по сравнению с немодифицированным электродом, что позволяет использовать циклическую вольтамперометрию для исследования реакций электрогенерированного супероксид анион-радикала с антиоксидантами. Установлено, что в реакциях с супероксид анион-радикалом фенольные антиоксиданты выступают в качестве доноров протонов (то есть являются кислотами Бренстеда) и взаимодействие описывается в рамках ECE-механизма. Рассчитаны константы скорости взаимодействия 19 фенольных антиоксидантов с супероксид анион-радикалом, значения которых сопоставимы и находятся в интервале $6.8\cdot10^4 \div 11.0\cdot10^4$ л/моль·с, что можно связать с небольшим влиянием структурных особенностей фенольных антиоксидантов, в частности с числом и положением гидроксильных групп, а также стерическими эффектами заместителей. Разработан способ вольтамперометрической оценки антиоксидантной емкости по реакции с супероксид анион-радикалом, основанный на величине относительного прироста тока восстановления кислорода в присутствии антиоксидантов. Подход апробирован на 11 настойках лекарственного растительного сырья. Антиоксидантную емкость выражали в эквивалентах галловой кислоты в пересчете на 1 мл настойки. Установлена положительная корреляция антиоксидантной емкости настоек по реакции с супероксид анион-радикалом с их антиоксидантной активностью (r = 0.7083 при $r_{крит}$ = 0.602).

Ключевые слова: вольтамперометрия, химически модифицированные электроды, супероксид анион-радикал, фенольные антиоксиданты, антиоксидантная емкость, лекарственное растительное сырье.

Введение

Супероксид анион-радикал ($O_2^{\bullet-}$) привлекает особое внимание исследователей в связи с проблемой токсичности кислорода и его производных в биологических системах. Супероксид анион-радикал способен повреждать биомембраны и ткани, а также выступать в роли предшественника других активных форм кислорода [1] (рис. 1). Существуют многочисленные доказательства образования супероксид анион-радикала различными ферментами – ксантиноксидазой, альдегидоксидазой, пероксидазами, а также фагоцитирующими клетками. Кроме того, он образуется в живых клетках при окислении адреналина, лейкофлавинов, фенолов, гемсодержащих белков и других соединений, имеющих окислительно-восстановительный потенциал ниже, чем у кислорода [2, 3].

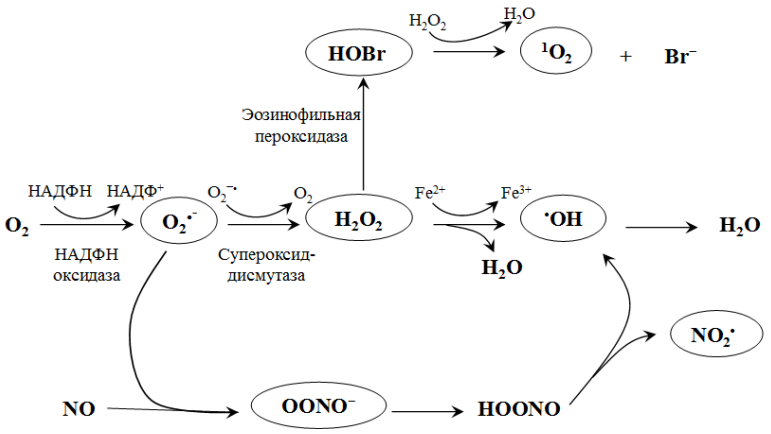


Рис. 1. Схема образования и превращений супероксид анион-радикала в живых клетках [4]

Мощным источником супероксид анион-радикала в организме являются цепи переноса электронов – митохондриальная [5] и микросомальная. В результате «утечки» электронов с восстановленных элементов цепей на молекулярный кислород происходит образование супероксид анион-радикала и пероксида водорода [6] согласно схеме 1:

$$O_2 \xrightarrow{+e^-} O_2^{\bullet -} \xrightarrow{+e^-} O_2^{\bullet 2-} \xrightarrow{+2H^+} H_2O_2 \,. \qquad (1)$$

Одним из путей нейтрализации супероксид анион-радикала является его реакции с антиоксидантами, поэтому их исследование представляет теоретический и практический интерес.

Супероксид анион-радикал образуется в результате одноэлектронного восстановления кислорода, что позволяет использовать электрохимические методы для исследования реакций активных форм кислорода с антиоксидантами.

Изучено взаимодействие супероксид анион-радикала с аминокислотами (глицином, аланином, валином, лейцином, серином, треонином, лизином, гистидином, норлейцином, норвалином и орнитином) в условиях вольтамперометрии. Установлено, что в присутствии аминокислот наблюдаются сдвиги полуволн восстановления кислорода в водных растворах в положительную область, свидетельствующие о протекании реакции супероксид анион-радикала с аминокислотами. Оценена их антиоксидантная активность. Наиболее активными аминокислотами оказались гистидин и глицин [7]. Для установления механизма антиоксидантного действия полипептидов исследованы реакции супероксид анион-радикала с сывороточными альбуминами в условиях полярографии [8].

Использование неводных сред и импульсной техники (например, циклической вольтамперометрии) позволяет увеличить период жизни частицы $O_2^{\bullet -}$ и проследить ее судьбу в ходе последующих реакций с донорами протонов. Эти реакции протекают в растворе у электрода, в реакционном слое, что дает полезную информацию о дальнейшей судьбе частиц $O_2^{\bullet -}$. Подобный подход был применен ранее при изучении слабых OH- и NH-органических кислот [9, 10]. В этих реакциях анион-радикал кислорода выступает как сильное основание,

протонизация которого меняла электрохимические параметры первой ступени разряда кислорода.

Рассчитаны кинетические параметры ЕС-процесса восстановления кислорода на стеклоуглеродном электроде (СУЭ) на фоне 0.05 М $(C_2H_5)_4NI$ в диметилформамиде с образованием супероксид анион-радикала в присутствии жирорастворимых антиоксидантов (ретинола и α-токоферола) [11]. Рассчитаны константы скорости взаимодействия антиоксидантов с ретинолом и α-токоферолом, которые составили $2.97 \cdot 10^3$ и $2.10 \cdot 10^3$ л/моль·с соответственно. Подход использован также для оценки антиоксидантной емкости плазмы крови [12, 13].

Оценена реакционная способность фенольных соединений, а также полифенолов (рутина, кверцетина, эпикатехина и флоридзина) с электрогенерированным супероксид анион-радикалом в среде диметилформамида в условиях циклической вольтамперометрии. Показано, что электрохимические характеристики ЕСЕ-восстановления (обратимость системы в присутствии субстрата, стехиометрия и константа скорости реакции) позволяют различать механизм реакции (кислотно-основное взаимодействие или радикальное). Тип реализуемого взаимодействия зависит от структуры фенольного соединений. Наибольшую реакционную способность проявили полифенолы, содержащие *о*-дигидроксифрагменты [14]. Аналогичным способом оценена антиоксидантная активность замещенных флавонов и флаванонов [15].

Микроэлектрод на основе многослойных углеродных нанотрубок предложен для электрохимической генерации супероксид анион-радикала в апротонной среде. Оценено влияние растворителя на обратимость редокс-системы. Константа скорости переноса электрона составляет $4.7 \cdot 10^{-3}$ см/с, что свидетельствует об обратимом процессе. Подход использован для оценки активности билирубина и α-токоферола по отношению к супероксид анион-радикалу [16]. Установлено, что IC_{50} (концентрация антиоксиданта, приводящая к подавлению реакции на 50%) для билирубина составляет 3.5 мМ, а для α-токоферола – 1.8 мМ.

Оценена реакционная способность ряда производных 1,4-дигидроксипиридинов в реакциях с электрогенерированным супероксид анион-радикалом в диметилсульфоксиде. Показано, что синтезированные соединения проявляют более высокую антиоксидантную активность по сравнению с Trolox и коммерчески доступными 1,4-дигидроксипиридинами [17].

Необходимо отметить, что практически во всех работах изучались очень высокие концентрации низкомолекулярных антиоксидантов на уровне ммоль/л. Это не совсем корректно, поскольку такой тип антиоксидантов даже при меньших концентрациях проявляет прооксидантные свойства [18–20]. Так, например, кверцетин и физетин при концентрациях выше 50 мкМ вызывают повреждения ДНК, апоптоз клеток и проявляют цитотоксический эффект [21]. Поэтому, чтобы приблизиться к условиям в живых системах, необходимо исследовать микромолярные концентрации фенольных антиоксидантов.

Цель настоящей работы – оценить константы скорости реакций фенольных антиоксидантов с электрогенерированным супероксид анион-радикалом в условиях циклической вольтамперометрии и разработать на их основе способ вольтамперометрического определения антиоксидантной емкости.

1. Экспериментальная часть

Использовали 95%-ный рутина тригидрат и танин фармакопейной чистоты (Fluka, Германия), 98%-ный кверцетина дигидрат, 98%-ный катехина гидрат (Sigma, Германия), 99%-ную галловую, 95%-ную эллаговую, 98%-ную кофейную и 98%-ную *п*-кумаровую кислоты (Sigma, Германия), 98%-ный сиреневый альдегид (Aldrich, Germany), 95%-ную хлорогеновую (Aldrich, Германия) и 99%-ную феруловую кислоты (Aldrich, Германия), морин (Sigma-Aldrich, Германия), 99%-ный ванилин (Sigma-Aldrich, Франция), 99%-ный эвгенол (Aldrich, Германия), тимол (Sigma, Германия), 95%-ный нарингин (Sigma-Aldrich, Германия), 80%-ный эпигаллокатехингаллат (Sigma, Германия), 50%-ный капсаицин (Sigma, Индия). Стандартные 10 мМ растворы фенольных антиоксидантов (0.42 мМ для эллаговой, 0.49 мМ для рутина и 1.0 мМ для хлорогеновой кислоты, капсаицина и эпигаллокатехингаллата) готовили, растворяя точную навеску в 5.0 мл этанола (ректификата). Остальные реактивы, кроме диметилформамида («о.с.ч.»), были марки «х.ч.».

В качестве модификатора поверхности электрода применяли многослойные углеродные нанотрубки (МУНТ) с внешним диаметром 40–60 нм, внутренним диаметром 5–10 нм и длиной 0.5–500 мкм от Aldrich (Германия). Их гомогенную суспензию с концентрацией 0.25 мг/мл получали ультразвуковым диспергированием в течение 30 мин в диметилформамиде. Стеклоуглеродный электрод (СУЭ) модифицировали, формируя на рабочей поверхности электрода однородный слой МУНТ методом капельного испарения 2 мкл их суспензии при комнатной температуре. Рабочую поверхность СУЭ очищали механически, полируя оксидом алюминия. Затем электрод ополаскивали ацетоном и дистиллированной водой.

Вольтамперометрические измерения проводили на потенциостате/гальваностате Autolab 302N (Eco Chemie B.V., Нидерланды). В электрохимическую ячейку объемом 15.0 мл вносили 10.0 мл фонового электролита (0.05 М $(C_2H_5)_4NI$ в диметилформамиде) или аликвоту (25–600 мкл) раствора антиоксиданта или настойки и фоновый электролит до 10.0 мл. Концентрация антиоксидантов в ячейке составляла 25 мкМ. Опускали рабочий МУНТ/СУЭ, вспомогательный (платиновый) и насыщенный хлоридсеребряный электроды и регистрировали циклические вольтамперограммы от –0.55 до –1.1 В со скоростью изменения потенциала 200 мВ/с.

Антиоксидантную активность оценивали по реакции с 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ) [22]. Стандартный 1 мМ раствор ДФПГ (Aldrich, Германия) готовили по точной навеске, которую растворяли в метаноле («х.ч.»). Для оценки антиоксидантной активности в пробирку помещали 1.0 мл раствора ДФПГ, 5 мкл настойки, тщательно перемешивали и инкубировали в темном месте при комнатной температуре в течение 20 мин, после чего измеряли оптическую плотность раствора при 517 нм в кюветах с $l = 0.1$ см на спектрофотометре ПЭ-5300 ВИ (Экрос, Россия). В качестве раствора сравнения использовали метанол (1.0 мл) с добавкой 5 мкл настойки. Антиоксидантную активность выражали как соотношение интенсивностей поглощения ДФПГ до и после реакции с антиоксидантами настоек и рассчитывали по формуле

Табл. 1

Объекты анализа и их характеристики.

Настойка	Производитель	$\omega_{этанола}$, %
Настойка семян лимонника	ЗАО «ВИФИТЕХ»	95
Настойка валерианы	ЗАО «ЭКОлаб»	70
Настойка пустырника	ЗАО «ЭКОлаб»	70
Настойка эхинацеи	ОАО «Фармацевтическая фабрика Санкт-Петербурга»	40
Настойка боярышника	ОАО «Флора Кавказа»	70
Настойка календулы	ОАО «Синтез»	70
Настойка женьшеня	ООО «Камелия НПП»	70
Настойка пиона уклоняющегося	ООО «БЭГРИФ»	40
Настойка мяты перечной	ООО «Тульская фармацевтическая фабрика»	90
Родиолы розовой экстракт	ООО «Камелия НПП»	40
Настойка аралии	ОАО «Кировская фармацевтическая фабрика»	70

$$\text{АОА} = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%,$$

где АОА – антиоксидантная активность, %; A_0 – оптическая плотность раствора ДФПГ до реакции с антиоксидантами, отн. ед.; A – оптическая плотность раствора ДФПГ после реакции с антиоксидантами, отн. ед.

В качестве объектов анализа выбраны спиртовые настойки, приобретенные в розничной аптечной сети (табл. 1).

2. Результаты и их обсуждение

Установлено, что кислород восстанавливается на СУЭ и МУНТ-модифицированном электроде, при этом на циклических вольтамперограммах наблюдаются пары катодно-анодных пиков (рис. 2).

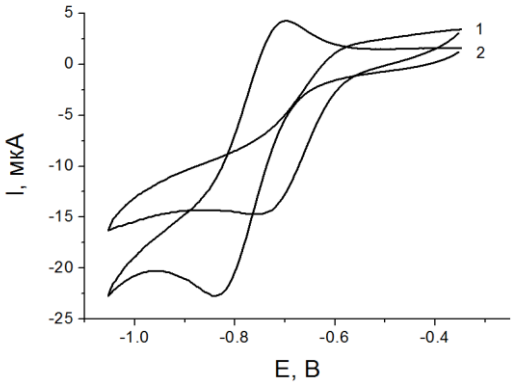


Рис. 2. Циклические вольтамперограммы восстановления кислорода на СУЭ (кривая 1) и МУНТ/СУЭ (кривая 2). Фоновый электролит – 0.05 М $(C_2H_5)_4NI$ в диметилформамиде, скорость изменения потенциала 200 мВ/с

Табл. 2

Вольтамперные характеристики восстановления кислорода

Электрод	$E_к$, В	$E_а$, В	$\Delta E_п$, В	$I_к$, мкА	$I_а$, мкА	$I_а/I_к$
СУЭ	–0.73	–0.59	0.14	–7.7 ± 0.2	4.3 ± 0.3	0.56
УНТ/СУЭ	–0.82	–0.71	0.11	–11.2 ± 0.3	11.9 ± 0.2	1.06

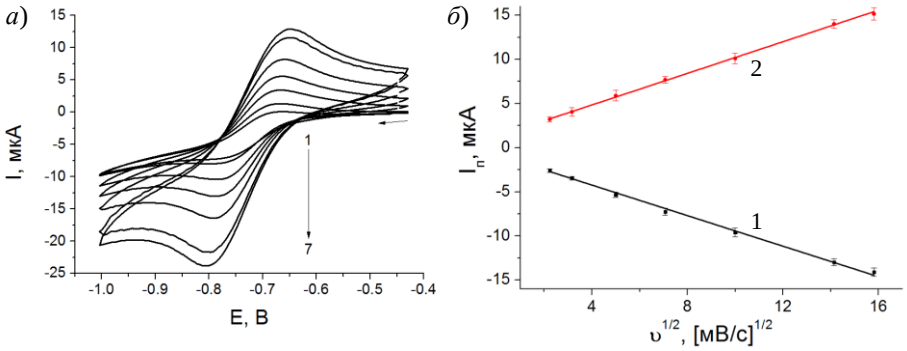


Рис. 3. *а*) Циклические вольтамперограммы восстановления кислорода на МУНТ/СУЭ в зависимости от скорости изменения потенциала: 1 – 5; 2 – 10; 3 – 25; 4 – 50; 5 – 100; 6 – 200; 7 – 250 мВ/с. *б*) Зависимость токов катодного (1) и анодного (2) пиков от $\upsilon^{1/2}$. Фоновый электролит – 0.05 М $(C_2H_5)_4NI$ в диметилформамиде

Восстановление на СУЭ протекает необратимо, если судить по разности потенциалов анодного и катодного пиков и соотношение токов пиков (табл. 2). В случае модифицированного электрода форма и вольтамперные характеристики позволяют говорить об обратимости электродной реакции.

Для установления природы электрохимического процесса оценено влияние скорости изменения потенциала на токи восстановления кислорода (рис. 3, *а*).

Установлено, что электровосстановление кислорода контролируется диффузией электроактивных частиц как самой медленной стадией электрохимического процесса. Диффузионная природа пиков восстановления/окисления подтверждается линейной зависимостью токов от $\upsilon^{1/2}$ [23] (рис. 3, *б*), которые описываются уравнениями 1 и 2 соответственно:

$$I_{п,\,к} = (-0.8 \pm 0.1) - (0.86 \pm 0.02)\,\upsilon^{1/2}, \qquad R^2 = 0.9972, \qquad (1)$$

$$I_{п,\,а} = (1.26 \pm 0.08) + (0.89 \pm 0.01)\,\upsilon^{1/2}, \qquad R^2 = 0.9992. \qquad (2)$$

Изучены реакции широкого круга фенольных антиоксидантов с электрогенерированным супероксид анион-радикалом. Форма циклических вольтамперограмм электровосстановления кислорода видоизменяется в присутствии антиоксидантов (рис. 4). При этом для всех исследованных антиоксидантов происходит увеличение катодного и уменьшение анодного пиков, а также смещение потенциалов пиков в анодную область. Это свидетельствует о том, что фенольные антиоксиданты в реакциях с супероксид анион-радикалом выступают в качестве доноров протонов (то есть являются кислотами Бренстеда), что хорошо согласуется с литературными данными [14, 15]. Образующийся гидропероксильный радикал принимает второй электрон и превращается в анион.

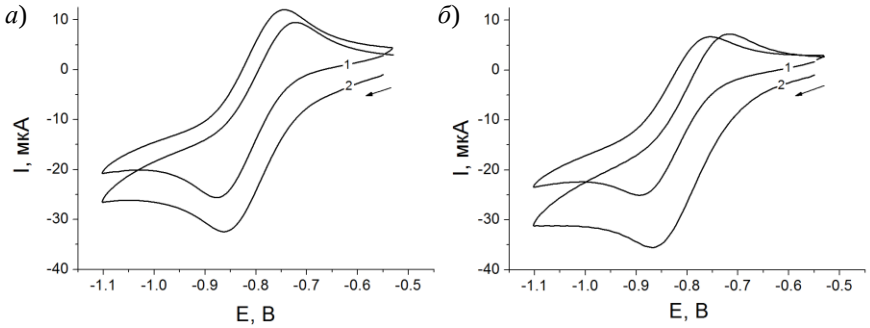


Рис. 4. Циклические вольтамперограммы восстановления кислорода на МУНТ/СУЭ в отсутствие (кривая 1) и в присутствии 25 мкМ катехина (*а*) или *трет*-бутилгидрокитодуола (*б*) (кривая 2) на фоне 0.05 М $(C_2H_5)_4NI$ в диметилформамиде. Скорость изменения потенциала 200 мВ/с

Таким образом, взаимодействие фенольных антиоксидантов с супероксид анион-радикалом можно описать в рамках ECE-механизма (схемы 2–4).

$$E_п \quad O_2 + e^- \rightleftharpoons \dot{O}_2^- \qquad (2)$$

$$\dot{O}_2^- + AH \rightleftharpoons H\dot{O}_2 + A^- \qquad (3)$$

$$E_п \quad H\dot{O}_2 + e^- \longrightarrow HO_2^- \qquad (4)$$

На основе полученных вольтамперометрических данных рассчитаны константы скорости взаимодействия (*k*) антиоксидантов с супероксид анион-радикалом (табл. 3). Расчет проводили по величине относительного прироста тока восстановления кислорода в присутствии протонирующего агента по следующим формулам:

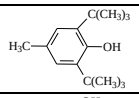
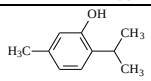
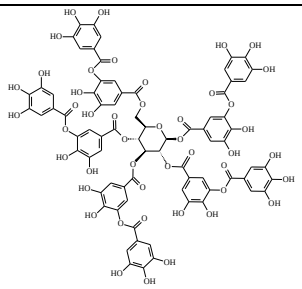
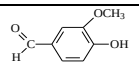
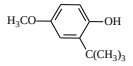
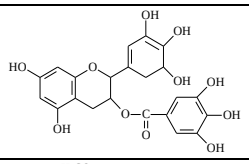
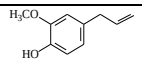
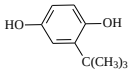
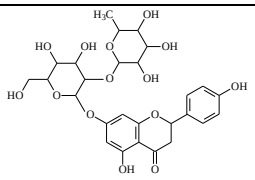
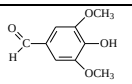
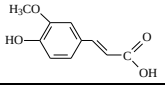
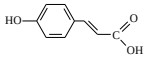
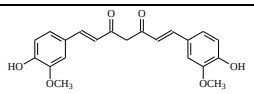
$$\frac{I_п^k}{I_п^d} = \frac{\sqrt{k \times c}}{0.446 \times \sqrt{a}} \qquad a = \frac{n \times F \times \upsilon}{R \times T},$$

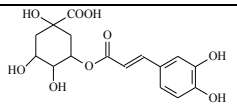
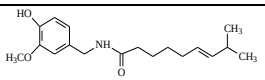
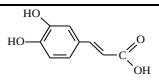
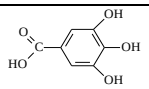
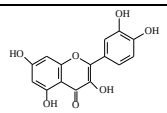
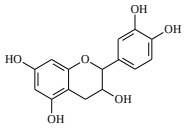
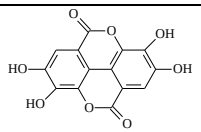
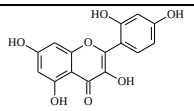
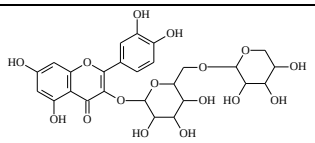
где $I_п^k$ – ток пика восстановления кислорода в присутствии антиоксиданта, мкА; $I_п^d$ – ток пика восстановления кислорода в отсутствие антиоксиданта, мкА; *c* – концентрация антиоксиданта, М; *n* – число электронов, участвующих в лимитирующей стадии реакции; *F* – постоянная Фарадея, Кл/моль; *υ* – скорость изменения потенциала, В/с; *R* – универсальная газовая постоянная, Дж/моль·К; *T* – температура, К.

Следует отметить, что полученные константы достаточно близки по значениям, за исключением *трет*-бутилгидрокситолуола, танина, ванилина и тимола, для которых наблюдаются наибольшие значения констант, что связано со структурой этих соединений. В случае танина это объясняется большим количеством ОН-групп, а для монофенолов – высокой степенью стерической загруженности. Для флавоноидов наблюдаются близкие по значениям константы, что обусловлено сходством их структур. В реакцию с супероксид анион-радикалом вступают гидроксильные группы кольца В, что хорошо согласуется с данными из [24], а также подтверждается тем, что для нарингина, в структуре которого присутствует гликозидный остаток в кольце А, получено сопоставимое значение константы. Кроме того, для флавонолов (кверцетина, морина, нарингина

Табл. 3

Константы скорости взаимодействия фенольных антиоксидантов с супероксид анион-радикалом

Соединение	Структурная формула	$k \times 10^{-4}$, л/моль·с	s_r
трет-Бутилгидрокситолуол		11.0 ± 0.3	0.028
Тимол		10.6 ± 0.3	0.020
Танин		10.2 ± 0.8	0.064
Ванилин		10.1 ± 0.8	0.065
трет-Бутилгидроксианизол		9.40 ± 0.03	0.003
Эпигаллокатехингаллат		9.0 ± 0.4	0.034
Эвгенол		8.8 ± 0.3	0.030
трет-Бутилгидрохинон		8.7 ± 0.2	0.021
Нарингин		8.6 ± 0.3	0.025
Сиреневый альдегид		8.6 ± 0.2	0.019
Феруловая кислота		8.5 ± 0.2	0.019
п-Кумаровая кислота		8.5 ± 0.3	0.027
Куркумин		8.4 ± 0.2	0.017

Хлорогеновая кислота		8.3 ± 0.2	0.017
Капсаицин		8.0 ± 0.3	0.027
Кофейная кислота		8.0 ± 0.2	0.022
Галловая кислота		7.7 ± 0.2	0.022
Кверцетин		7.6 ± 0.5	0.050
Катехин		7.5 ± 0.3	0.037
Эллаговая кислота		7.5 ± 0.5	0.027
Морин		7.4 ± 0.2	0.026
Рутин		6.8 ± 0.3	0.037

и рутина) реакционноспособной является гидроксильная группа в положении 3 кольца С, что подтверждается меньшим значением константы для рутина, в структуре которого в этом положении находится гликозидный остаток.

На основе полученных данных разработан способ вольтамперометрической оценки антиоксидантной емкости, основанный на реакции антиоксидантов с супероксид анион-радикалом. За аналитический сигнал принят относительный прирост тока восстановления кислорода в присутствии антиоксидантов. Поскольку галловая кислота является одним из общепринятых стандартов для оценки антиоксидантных свойств различных объектов, изучено влияние ее концентрации на электровосстановление кислорода.

На циклических вольтамперограммах наблюдается увеличение катодного тока по мере роста концентрации галловой кислоты (рис. 5). Ток восстановления кислорода линейно связан с концентрацией галловой кислоты в диапазоне 0.5–10 мкМ. Предел обнаружения (по $S/N = 3$) составляет 0.15 мкМ галловой кислоты.

Градуировочная зависимость описывается уравнением (3):

$$I_{п,\,к}\ [мкА] = (3.624 \pm 0.003) + (78.2 \pm 0.6)\cdot 10^3 \cdot C_{ГК}\ [М], \qquad R^2 = 0.9997. \qquad (3)$$

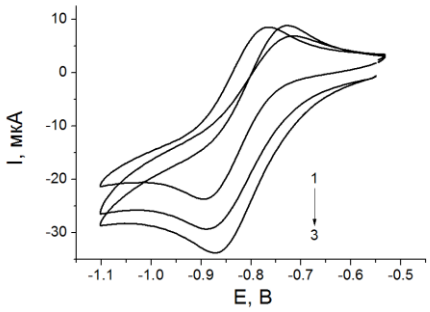


Рис. 5. Циклические вольтамперограммы восстановления кислорода на МУНТ/СУЭ в присутствии галловой кислоты различной концентрации: 1 – 0; 2 – 0.5; 3 – 10 мкМ на фоне 0.05 М $(C_2H_5)_4NI$ в диметилформамиде. Скорость изменения потенциала 200 мВ/с

Табл. 4

Антиоксидантная емкость настоек лекарственного растительного сырья (n = 5, P = 0.95)

Соединение	Антиоксидантная емкость, мг галловой кислоты/мл	s_r
Настойка семян лимонника	0.43 ± 0.03	0.051
Настойка валерианы	0.49 ± 0.03	0.047
Настойка пустырника	1.7 ± 0.1	0.058
Настойка эхинацея	1.78 ± 0.02	0.011
Настойка боярышника	2.3 ± 0.2	0.074
Настойка календулы	24 ± 1	0.049
Настойка женьшеня	36 ± 3	0.062
Настойка пиона уклоняющегося	39 ± 3	0.053
Родиолы розовой экстракт жидкий	43 ± 3	0.039
Настойка мяты перечной	47 ± 3	0.052
Настойка аралии	92 ± 3	0.028

Оценена антиоксидантная емкость настоек лекарственного растительного сырья в эквивалентах галловой кислоты в пересчете на 1 мл настойки (табл. 4). Наибольшее значение антиоксидантной емкости характерно для экстракта родиолы розовой и настойки аралии, что хорошо согласуется с высоким содержанием в них флавоноидов, антоцианов, фенольных кислот и их производных [47]. Наименьшие значения получены для настоек семян лимонника и валерианы, что, вероятно, связано с содержащимися в них органическими кислотами. Кроме того, в состав лимонника входят схизандрин и схизандрол (метиловые эфиры полиоксифенолов) [47, 48], которые не взаимодействуют с супероксид анион-радикалом.

Для валидации разработанного подхода оценена антиоксидантная активность настоек по реакции с ДФПГ. Установлена положительная корреляция с коэффициентом 0.7083 ($r_{крит}$ = 0.602). Следует отметить, что основным недостатком спектрофотометрического метода определения антиоксидантной активности является неустойчивость ДФПГ, в частности его способность разрушаться под действием света и кислорода [25], что требует дополнительного и частого определения собственного поглощения ДФПГ. Последний растворим только в органических средах, обычно низших спиртах, и его светопоглощение в значительной мере зависит от содержания воды в растворителе и исследуемом объекте.

Многие антиоксиданты, взаимодействующие с радикальными формами кислорода, не вступают в реакцию с ДФПГ [26], что приводит к погрешностям при оценке интегрального показателя. Использование предложенного вольтамперометрического способа позволяет избежать вышеуказанных сложностей и недостатков.

Таким образом, разработанный подход можно использовать для скрининга антиоксидантных свойств настоек лекарственного растительного сырья как альтернативный метод, характеризующийся простотой, доступностью и надежностью получаемых результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 15-03-03224).

Литература

1. *Haliwell B., Gutteridge J.M.C.* Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity // Free radicals in biology and medicine. – Oxford: Clarendon Press, 1989. – P. 86–179.
2. *Владимиров Ю.А.* Свободные радикалы и антиоксиданты // Вестн. РАМН. – 1998. – № 7. – С. 43–51.
3. *Середенин С.Б., Дурнев А.Д.* Фармакологическая защита генома. – М.: ВИНИТИ, 1992. – 160 с.
4. *Giembycz M.A., Lindsay M.A.* Pharmacology of the eosinophil // Pharmacol. Rev. – 1999. – V. 51, No 2. – P. 213–340.
5. *Turrens J.F.* Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain // Biosci. Rep. – 1997. – V. 17, No 1. – P. 3–8.
6. *Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И., Козлов А.В., Осипов А.Н., Росщупкин Д.И.* Биофизика. (Итоги науки и техники Т. 29). – М.: ВИНИТИ, 1991. – 252 с.
7. *Короткова Е.И., Дорожко Е.В., Букель М.В., Воронова О.А., Дьяконова Е.В., Петрова Е.В., Щербакова А.С.* Исследование антиоксидантных свойств некоторых аминокислот методом вольтамперометрии // Сиб. мед. журн. – 2011. – Т. 26, № 2. – С. 62–65.
8. *Bumber A.A., Kornienko I.V., Profatilova I.A., Vnukov V.V., Kornienko I.E., Garnovskii A.D.* Polarographic study of the antioxidant activity of amino acids and proteins // Russ. J. General Chem. – 2001. – V. 71, No 8. – P. 1311–1313.
9. *Будников Г.К., Каргина О.Ю., Лапшина С.В.* Полярографическое определение кислот по реакции с электрохимически генерированными анион-радикалами // Журн. аналит. химии. – 1988. – Т. 43, № 4. – С. 636–638.
10. *Будников Г.К., Каргина О.Ю., Лапшина С.В., Гурылев Э.А., Латыпов З.Я.* Реакция электрохимически генерированных анион-радикалов с фосфорилированными мочевинами // Изв. АН СССР. Сер. хим. – 1988. – № 3. – С. 528–532.
11. *Ziyatdinova G.K., Gil'metdinova D.M., Budnikov G.K.* Reactions of superoxide anion radical with antioxidants and their use in voltammetry // J. Anal. Chem. – 2005. – V. 60, No 1. – P. 49–52.
12. *Зиятдинова Г.К., Будников Г.К., Погорельцев В.И.* Оценка интегральной антиоксидантной емкости плазмы крови по ее реакции с супероксидным анион-радикалом // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – № 6. – С. 12–15.
13. *Ziyatdinova G.K., Budnikov H.C., Pogorel'tzev V.I.* Electrochemical determination of total antioxidant capacity of human plasma // Anal. Bioanal. Chem. – 2005. – V. 381, No 8. – P. 1546–1551. – doi: 10.1007/s00216-005-3132-5.

14. *Rene A., Abasq M.-L., Hauchard D., Hapiot P.* How do phenolic compounds react toward superoxide ion? A simple electrochemical method for evaluating antioxidant capacity // Anal. Chem. – 2010. – V. 82. – P. 8703–8710.
15. *Safeer A., Faria S.* Antioxidant activity coefficient, mechanism, and kinetics of different derivatives of flavones and flavanones towards superoxide radical // Czech J. Food Sci. – 2012. – V. 30, No 2. – P. 153–163.
16. *Wei Y., Ji X., Dang X., Hu S.* Studies on electrochemical properties and scavenge of superoxide anion in aprotic media by using carbon nanotubes powder microelectrode // Bioelectrochemistry. – 2003. – V. 61, Nos 1–2. – P. 51–56.
17. *Salazar R., Navarrete-Encina P.A., Squella J.A., Barrientos C., Pardo-Jiménez V., Núñez-Vergara L.J.* Study on the oxidation of C4-phenolic-1,4-dihydropyridines and its reactivity towards superoxide radical anion in dimethylsulfoxide // Electrochim. Acta. – 2010. – V. 56, No 2. – P. 841–852.
18. *Ziyatdinova G.K., Budnikov H.C.* Natural phenolic antioxidants in bioanalytical chemistry: state of the art and prospects of development // Russ. Chem. Rev. – 2015. – V. 84, No 2. – P. 194–224.
19. *Decker E.* Phenolics: prooxidants or antioxidants? // Nutr. Rev. – 1997. – V. 55, No 11. – P. 396–398.
20. *Bouayed J., Bohn T.* Exogenous antioxidants – Double-edged swords in cellular redox state. Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2010. – V. 3, No 4. – P. 228–237.
21. *Wätjen W., Michels G., Steffan B., Niering P., Chovolou Y., Kampkötter A., Tran-Thi Q.H., Proksch P., Kahl R.* Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis // J. Nutr. – 2005. – V. 135, No 3. – P. 525–531.
22. *Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C.* Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity // LWT-Food Sci. Technol. – 1995. – V. 28, No 1. – P. 25–30.
23. *Scholz F.* (Ed.) Electroanalytical methods. Guide to experiments and applications. – Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2002. – 353 p.
24. *Le Bourvellec C., Hauchard D., Darchen A., Burgot J.L., Abasq M.L.* Validation of a new method using the reactivity of electrogenerated superoxide radical in the antioxidant capacity determination of flavonoids // Talanta. – 2008. – V. 75, No 4. – P. 1098–1103.
25. *Ozcelik B., Lee J.H., Min D.B.* Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl // J. Food Sci. – 2003. – V. 68, No 2. – P. 487–490.
26. *Magalhães L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J.L.F.C.* Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties // Anal. Chim. Acta. – 2008. – V. 613, No 1. – P. 1–19.

Поступила в редакцию
02.03.15

Зиятдинова Гузель Камилевна – кандидат химических наук, доцент кафедры аналитической химии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: *Ziyatdinovag@mail.ru*

Захарова Светлана Петровна – студент Химического института им. А.М. Бутлерова, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

Будников Герман Константинович – доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: *Herman.Budnikov@kpfu.ru*

* * *

REACTIONS OF PHENOLIC ANTIOXIDANTS WITH ELECTROGENERATED SUPEROXIDE ANION RADICAL AND THEIR ANALYTICAL APPLICATION

G.K. Ziyatdinova, S.P. Zakharova, H.C. Budnikov

Abstract

Parameters of oxygen electroreduction on glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes were found. Increase in the oxygen reduction currents and system reversibility was observed compared to unmodified electrode, which allows to use cyclic voltammetry for investigation of reactions of electrogenerated superoxide anion radical with antioxidants. It was revealed that phenolic antioxidants act as proton donors (i.e., as Brønsted acids) and their interaction with superoxide anion radical follows ECE mechanism. The rate constants for reactions of 19 phenolic antioxidants with superoxide anion radical were calculated. The values of these constants were relatively similar, varied in the range of $6.8 \cdot 10^4 \div 11.0 \cdot 10^4$ L/mol·s, and thereby reflected the slight influence of the structure of phenolic antioxidants, in particular the number and position of hydroxyl groups, as well as the steric effects of substituents. A voltammetric method was developed for evaluation of the superoxide scavenging capacity based on the relative increase in oxygen reduction current in the presence of antioxidants. The approach was tested on 11 samples of medicinal herb tinctures. The superoxide scavenging capacity was expressed in gallic acid equivalents per 1 mL of tincture. Positive correlation of the superoxide scavenging capacity with antioxidant activity (r = 0.7083 at r_{crit} = 0.602) was obtained.

Keywords: voltammetry, chemically modified electrodes, superoxide anion radical, phenolic antioxidants, antioxidant capacity, medicinal herbs.

References

1. Haliwell B., Gutteridge J.M.C. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, Clarendon Press, 1989, pp. 86–179.
2. Vladimirov Yu.A. Free radicals and antioxidants. *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk*, 1998, no. 7, pp. 43–51. (In Russian)
3. Seredenin S.B., Durnev A.D. Pharmacological Defense of Genome. Moscow, VINITI. 1992. 160 p. (In Russian)
4. Giembycz M.A., Lindsay M.A. Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacol. Rev.*, 1999, vol. 51, no. 2, pp. 213–340.
5. Turrens J.F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci. Rep.*, 1997, vol. 17, no. 1, pp. 3–8.
6. Vladimirov Yu.A., Azizova O.A., Deev A.I., Kozlov A.V., Osipov A.N., Rosshchupkin D.I. Biophysics. (Outcomes of Science and Technology, Vol. 29). Moscow, VINITI, 1991. 252 p. (In Russian)
7. Korotkova E.I., Dorozhko E.V., Bukel' M.V., Voronova O.A., D'yakonova E.V., Petrova E.V., Shcherbakova A.S. Investigation of the antioxidant properties of some amino acids by the method of voltammetry. *Sib. Med. Zh.*, 2011, vol. 26, no. 2, pp. 62–65. (In Russian)
8. Bumber A.A., Kornienko I.V., Profatilova I.A., Vnukov V.V., Kornienko I.E., Garnovskii A.D. Polarographic study of the antioxidant activity of amino acids and proteins. *Russ. J. General Chem.*, 2001, vol. 71, no. 8, pp. 1311–1313.
9. Budnikov G.K., Kargina O.Yu., Lapshina S.V. Polarographic determination of acids by the reaction with electrochemically generated anion radicals. *Zh. Anal. Khim.*, 1988, vol. 43, no. 4, pp. 636–638. (In Russian)
10. Budnikov G.K., Kargina O.Yu., Lapshina S.V., Gurylev E.A., Latypov Z.Ya. Reaction of electrochemically generated radical anions with phosphorylated ureas. *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci. (Engl. Transl.)*, 1988, vol. 37, no. 3, pp. 440–443.
11. Ziyatdinova G.K., Gil'metdinova D.M., Budnikov G.K. Reactions of superoxide anion radical with antioxidants and their use in voltammetry. *J. Anal. Chem.*, 2005, vol. 60, no. 1, pp. 49–52.

12. Ziyatdinova G.K., Budnikov H.C., Pogorel'tzev V.I. Evaluation of total antioxidant capacity of plasma by reaction with superoxide anion radical. *Klin. Lab. Diagn.*, 2005, no. 6, pp. 12–15. (In Russian)
13. Ziyatdinova G.K., Budnikov H.C., Pogorel'tzev V.I. Electrochemical determination of total antioxidant capacity of human plasma. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, vol. 381, no. 8, pp. 1546–1551. doi: 10.1007/s00216-005-3132-5.
14. Rene A., Abasq M.-L., Hauchard D., Hapiot P. How do phenolic compounds react toward superoxide ion? A simple electrochemical method for evaluating antioxidant capacity. *Anal. Chem.*, 2010, vol. 82, pp. 8703–8710.
15. Safeer A., Faria S. Antioxidant activity coefficient, mechanism, and kinetics of different derivatives of flavones and flavanones towards superoxide radical. *Czech J. Food Sci.*, 2012, vol. 30, no. 2, pp. 153–163.
16. Wei Y., Ji X., Dang X., Hu S. Studies on electrochemical properties and scavenge of superoxide anion in aprotic media by using carbon nanotubes powder microelectrode. *Bioelectrochemistry*, 2003, vol. 61, nos. 1–2, pp. 51–56.
17. Salazar R., Navarrete-Encina P.A., Squella J.A., Barrientos C., Pardo-Jiménez V., Núñez-Vergara L.J. Study on the oxidation of C4-phenolic-1,4-dihydropyridines and its reactivity towards superoxide radical anion in dimethylsulfoxide. *Electrochim. Acta*, 2010, vol. 56, no. 2, pp. 841–852.
18. Ziyatdinova G.K., Budnikov H.C. Natural phenolic antioxidants in bioanalytical chemistry: state of the art and prospects of development. *Russ. Chem. Rev.*, 2015, vol. 84, no. 2, pp. 194–224.
19. Decker E. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutr. Rev.*, 1997, vol. 55, no. 11, pp. 396–398.
20. Bouayed J., Bohn T. Exogenous antioxidants – Double-edged swords in cellular redox state. Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2010, vol. 3, no. 4, pp. 228–237.
21. Wätjen W., Michels G., Steffan B., Niering P., Chovolou Y., Kampkötter A., Tran-Thi Q.H., Proksch P., Kahl R. Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *J. Nutr.*, 2005, vol. 135, no. 3, pp. 525–531.
22. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.*, 1995, vol. 28, no. 1, pp. 25–30.
23. Scholz F. (Ed.) Electroanalytical Methods. Guide to Experiments and Applications. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, 2002. 353 p.
24. Le Bourvellec C., Hauchard D., Darchen A., Burgot J.L., Abasq M.L. Validation of a new method using the reactivity of electrogenerated superoxide radical in the antioxidant capacity determination of flavonoids. *Talanta*, 2008, vol. 75, no. 4, pp. 1098–1103.
25. Ozcelik B., Lee J.H., Min D.B. Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J. Food Sci.*, 2003, vol. 68, no. 2, pp. 487–490.
26. Magalhães L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J.L.F.C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal. Chim. Acta*, 2008, vol. 613, no. 1, pp. 1–19.

Received
March 2, 2015

Ziyatdinova Guzel' Kamilevna – PhD in Chemistry, Associate Professor, Department of Analytical Chemistry, A.M. Butlerov Institute of Chemistry, Kazan Federal University, Kazan, Russia.
E-mail: *Ziyatdinovag@mail.ru*

Zakharova Svetlana Petrovna – Student, Department of Analytical Chemistry, A.M. Butlerov Institute of Chemistry, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

Budnikov Herman Constantinovich – Doctor of Chemistry, Professor, Department of Analytical Chemistry, A.M. Butlerov Institute of Chemistry, Kazan Federal University, Kazan, Russia.
E-mail: *Herman.Budnikov@kpfu.ru*