

УДК 543.55:543.8

## 2,2-ДИ(4-ТРЕТ-ОКТИЛФЕНИЛ)-1-ПИКРИЛГИДРАЗИЛ КАК НОВЫЙ МОДИФИКАТОР ЭЛЕКТРОДА ДЛЯ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ

*Г.К. Зиятдинова, Ю.В. Снегурева, Г.К. Будников*

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия*

### Аннотация

2,2-Ди(4-трет-октилфенил)-1-пикрилгидразил (ДТОФПГ\*), иммобилизованный на электродной поверхности, предложен как реагент для оценки антиоксидантной активности (АОА). Изучены параметры электровосстановления ДТОФПГ\*, иммобилизованного на стеклоуглеродном электроде (СУЭ), модифицированном углеродными нанотрубками и наночастицами диоксидов церия и олова, диспергированными в поверхностно-активных веществах. Установлено, что наилучшие характеристики (степень обратимости системы и максимальные токи восстановления) регистрируются на электроде, модифицированном наночастицами диоксида церия и цетилпиридиний бромидом (ЦПБ). Токи восстановления иммобилизованного ДТОФПГ\* уменьшаются в присутствии фенольных антиоксидантов, что позволяет использовать созданный электрод для оценки их АОА. Показано, что для протекания реакции с иммобилизованными ДТОФПГ\* достаточно 5 мин. Оценку АОА проводили в условиях дифференциально-импульсной вольтамперометрии. Найдены значения  $EC_{50}$  для танина, кверцетина, катехина и феруловой кислоты и сопоставлены с  $EC_{50}$  по реакции с 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ\*) в идентичных условиях. Разработанный способ применен для оценки АОА соков и нектаров.

**Ключевые слова:** вольтамперометрия, химически модифицированные электроды, наночастицы  $SeO_2$ , стабильные радикалы, антиоксидантная активность, анализ пищевых продуктов

### Введение

Исследование антиоксидантных свойств индивидуальных соединений и различных объектов, являющихся источниками антиоксидантов для живых организмов, представляет практический интерес. Это связано с важной биологической ролью антиоксидантов, заключающейся в предотвращении развития окислительного стресса путем поддержания равновесия между активными формами кислорода и азота, генерирующимися в клетках в ходе метаболизма, и антиоксидантами эндогенного и экзогенного происхождения [1, 2].

Для оценки антиоксидантных свойств используются различные способы, среди которых следует выделить те, которые основаны на взаимодействии антиоксидантов с радикальными частицами различной природы [3]. Для количественной оценки таких взаимодействий введен параметр антиоксидантная

активность (АОА). Поскольку время жизни активных форм кислорода и азота достаточно мало, то чаще всего применяют радикалы, имеющие в своей структуре объемные заместители. Наибольшее распространение среди них получил относительно стабильный радикал 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ<sup>•</sup>).

Поскольку реакции ДФПГ<sup>•</sup> с антиоксидантами протекают с переносом электрона, для их исследования можно использовать электрохимические методы, характеризующиеся простотой, экспрессностью, экономичностью, надежностью получаемых результатов и возможностью миниатюризации.

Для оценки АОА использовано восстановление ДФПГ<sup>•</sup> на платиновом электроде в среде метанола в условиях циклической вольтамперометрии. Время реакции антиоксидантов с радикалом составляет 10 мин. АОА выражали через соотношение токов восстановления ДФПГ<sup>•</sup> до и после реакции с антиоксидантами [4, 5]. Этот же принцип применен для оценки АОА флавоноидов в среде диметилсульфоксида [6].

Предложен новый амперометрический метод определения АОА, основанный на восстановлении 100 мкМ ДФПГ<sup>•</sup> на стеклоуглеродном электроде (СУЭ) в среде 0.033 М фосфатного буферного раствора pH 7.4, содержащего 0.033 М КСl и 40% этанола. В качестве стандарта использовали тролокс. Амперометрический отклик системы линеен до 30 мкМ тролокса с пределом обнаружения 0.05 мкМ. Разработанный способ был применен для оценки АОА некоторых индивидуальных антиоксидантов, а также чая, вина и других напитков [7].

Разработан новый биамперометрический метод селективного определения АОА, основанный на аналитических сигналах редокс-пары ДФПГ<sup>•</sup>/восстановленный ДФПГ<sup>•</sup> на стеклоуглеродных [8] и платиновых [9] электродах. Измерения проводили в двухэлектродной ячейке, катодное и анодное отделения которой были разделены полупроницаемой мембраной. Разность потенциалов, накладываемая на электроды, составляла 200 мВ. Показана электрохимическая обратимость редокс-пары ДФПГ<sup>•</sup>/восстановленный ДФПГ<sup>•</sup>. Селективность определения АОА была проверена на различных антиоксидантах в фосфатно-этанольном буферном растворе pH 7.40. В качестве стандарта использован тролокс, предел обнаружения которого составил 0.05 мкМ в случае стеклоуглеродных и 0.0768 мкМ для платиновых электродов. Ток линейно зависит от концентрации до 25 и 30 мкМ тролокса соответственно.

Другой подход к оценке АОА основан на восстановлении ДФПГ<sup>•</sup> на платиновом печатном электроде в условиях дифференциально-импульсной вольтамперометрии на фоне КСl в метаноле [10]. АОА выражали как разность токов пиков электровосстановления ДФПГ<sup>•</sup> до и после реакции с антиоксидантами. В качестве стандарта использовали  $\alpha$ -токоферол. Метод применен для оценки АОА оливковых масел.

Интересен автоматизированный амперометрический способ определения антиоксидантов в продуктах питания, основанный на их взаимодействии с ДФПГ<sup>•</sup> в качестве редокс-индикатора. Электроды (рабочий – свинцовый стержень, вспомогательный – платиновый и насыщенный хлоридсеребряный в качестве электрода сравнения) последовательно перемещаются в планшете для микротитрования на 24 ячейки. Подход характеризуется простотой и в отличие от обычных электрохимических способов не требует промывания ячейки между измерениями.

Кроме того, за счет автоматизации снижается вероятность ошибочных измерений [11]. Способ апробирован на образцах чая, а также на фруктовых соках и экстрактах растительного сырья.

Другой подход к автоматизации способов оценки АОА заключается в использовании проточных методов, обладающих рядом преимуществ по сравнению с регистрацией сигнала в стационарных условиях. Проточный режим обеспечивает строгий контроль условий протекания реакции в пространстве и времени и высокую производительность [12].

Проточно-инжекционные способы с амперометрическим детектированием в среде фосфатно-этанольного буферного раствора на золотом печатном электроде и СУЭ, модифицированном многостеночными углеродными нанотрубками (МУНТ), предложены для оценки АОА вин [13] и экстрактов тайских овощей [14] соответственно. Проточно-порционный анализ с амперометрическим детектированием на СУЭ в среде этанольно-ацетатного буферного раствора позволяет определять АОА чая и экстрактов моринги и бразильской вишни. Производительность системы составляет 180 проб в час [15].

Вышеописанные способы электрохимической оценки АОА основаны на взаимодействии антиоксидантов с ДФПГ<sup>•</sup> в растворе. Однако ДФПГ<sup>•</sup> растворим лишь в органических растворителях [16], он чувствителен к воздействию света, кислорода воздуха и pH среды [17]. При увеличении доли воды до 60% реагент коагулируется [18] и не вступает в реакцию с антиоксидантами [19].

Для нивелирования этих недостатков можно применить иммобилизацию радикала на поверхности электрода. Изучено вольтамперометрическое поведение микрочастиц ДФПГ<sup>•</sup>, иммобилизованных на поверхности графитового электрода в водной среде pH 7.0. На циклических вольтамперограммах наблюдается обратимая редокс-пара при 0.340 В относительно насыщенного хлоридсеребряного электрода. Показано, что процесс восстановления протекает по ЕС-механизму [20]. Однако в электропревращении участвует лишь часть иммобилизованных микрокристаллов ДФПГ<sup>•</sup>, что приводит к неполному протеканию реакции, а, следовательно, и к неприменимости подхода к анализу реальных образцов.

Этот недостаток успешно преодолевается при использовании СУЭ, модифицированного наночастицами диоксида церия, диспергированными в среде катионного поверхностно-активного вещества цетилпиридиний бромида (ЦПБ), в качестве подложки для иммобилизации ДФПГ<sup>•</sup> [21]. АОА оценивали по относительному уменьшению тока восстановления ДФПГ<sup>•</sup> в дифференциально-импульсном варианте вольтамперометрии. Подход применен для оценки АОА индивидуальных антиоксидантов, а также спиртовых и водных извлечений из лекарственного растительного сырья. Результаты хорошо согласуются с данными стандартного спектрофотометрического метода.

Для дальнейшего развития этого направления исследований в качестве модификатора поверхности электрода для вольтамперометрической оценки АОА представляет интерес новое производное ДФПГ<sup>•</sup> – 2,2-ди(4-трет-октилфенил)-1-пикрилгидразил (ДФПГ<sup>•</sup>).

## 1. Экспериментальная часть

**1.1. Реактивы.** В работе использовали танин фармакопейной чистоты (Fluka, Германия), 98%-ный кверцетина дигидрат, 98%-ный катехина гидрат (Sigma, Германия) и 99%-ную феруловую кислоту (Aldrich, Германия). Остальные реактивы были квалификации х.ч. Их стандартные 10 мМ растворы готовили растворением точной навески в 5.0 мл этанола (ректификата).

Стандартные 0.65 мМ растворы ДТОФПГ<sup>•</sup> иДФПГ<sup>•</sup> (Aldrich, Германия) готовили растворением точной навески в метаноле (х.ч.).

Для модифицирования поверхности электрода использовали наночастицы диоксида церия (размер частиц 25 нм) и диоксида олова диаметром < 100 нм от Aldrich (Германия), функционализированные карбоксильными группами многостеночные углеродные нанотрубки (МУНТ-СООН) (Aldrich, Германия) диаметром 9.5 нм и длиной 1.5 мкм, а также многостеночные углеродные нанотрубки (МУНТ) с внешним диаметром 40–60 нм, внутренним диаметром 5–10 нм и длиной 0.5–500 мкм от Aldrich (Германия).

Наночастицы диоксидов церия и олова и МУНТ-СООН диспергировали в среде 0.45 мМ ЦПБ (Aldrich, Германия), а МУНТ – в 1%-ном додецилсульфате натрия под действием ультразвука. Стандартные растворы (0.5 мМ ЦПБ и 1%-ный додецилсульфат натрия) готовили по точной навеске, которую растворяли в дистиллированной воде.

**1.2. Приборы.** Вольтамперометрические определения проводили на потенциостате/гальваностате  $\mu$ Autolab Type III (Eco Chemie B.V., Нидерланды) с программным обеспечением GPES, v. 4.9.005 (Eco Chemie B.V., Нидерланды). В работе использовали рабочий СУЭ ( $S = 7.07 \text{ мм}^2$ ), свернутую спиралью платиновую проволоку ( $l = 6.0 \text{ см}$ ) в качестве вспомогательного электрода и электрод сравнения – насыщенный хлоридсеребряный электрод. Перед началом работы поверхность платиновых электродов очищали в  $\text{HNO}_3$  (1:1) в течение 3 мин и промывали дистиллированной водой.

Измерение рН проводили на иономере «Эксперт-001» (ООО «Эконикс-Эксперт», Россия).

**1.3. Модифицирование электродов.** СУЭ модифицировали методом капельного испарения 5 мкл гомогенных дисперсий  $\text{CeO}_2$  и  $\text{SnO}_2$  в 0.45 мМ ЦПБ с концентрацией 0.5 и 1.0 мг/мл соответственно или 0.5 мг/мл суспензий углеродных нанотрубок в поверхностно-активных веществах с концентрацией. Затем на поверхность наносили 5 мкл раствора ДТОФПГ<sup>•</sup> илиДФПГ<sup>•</sup>. Рабочую поверхность СУЭ очищали механически на оксиде алюминия, после чего ополаскивали электрод последовательно ацетоном и дистиллированной водой.

**1.4. Вольтамперометрические измерения** проводили следующим образом: в электрохимическую ячейку объемом 10.0 мл вносили 3.6 мл фонового электролита и аликвоту исследуемого раствора (2–400 мкл), доводя долю этанола до 10%. Опускали рабочий (ДФПГ<sup>•</sup>- илиДФПГ<sup>•</sup>-модифицированные электроды), вспомогательный и хлоридсеребряный электроды и регистрировали циклические вольтамперограммы от 0.7 до 0 В. Скорость развертки потенциала

варьировали в диапазоне 100–500 мВ/с. Количественную оценку АОА проводили в условиях дифференциально-импульсной вольтамперометрии в диапазоне потенциалов от 0.65 до 0 В при амплитуде импульса 50 мВ, времени импульса 50 мс и скорости развертки потенциала 10 мВ/с. Для лучшей идентификации пиков в дифференциально-импульсном режиме использовали коррекцию базовой линии.

**1.5. Расчет АОА.** Для индивидуальных соединений АОА выражали как  $EC_{50}$  – эффективную концентрацию антиоксиданта, при которой восстанавливается 50% свободных радикалов, и рассчитывали по следующему уравнению, исходя из графиков зависимости степени ингибирования радикалов от концентрации антиоксиданта:

$$y = A(1 - e^{-k(x-x_0)}).$$

АОА соков выражали как соотношение токов восстановления ДТОФПГ\* до и после реакции с антиоксидантами образца согласно формуле:

$$AOA = \frac{I_0 - I}{I_0} \cdot 100\%,$$

где  $I_0$  и  $I$  – токи восстановления ДТОФПГ\* до и после реакции с антиоксидантами образца соответственно, мкА.

**1.6. Статистическую обработку данных** проводили для трех измерений при доверительной вероятности 0.95. Результаты представляли в виде  $X \pm \Delta X$ , где  $X$  – среднее значение и  $\Delta X$  – доверительный интервал. Случайную погрешность оценивали по величине относительного стандартного отклонения ( $s_r$ ). Регрессионный анализ проводили в программе Origin 8 (OriginLab, USA).

## 2. Результаты и их обсуждение

**2.1. Электрохимическое поведение ДТОФПГ\* на СУЭ и модифицированных электродах.** Изучено вольтамперометрическое поведение ДТОФПГ\* на СУЭ на фоне фосфатного буферного раствора pH 7.4. На вольтамперограммах не регистрируются ступени восстановления/окисления стабильного радикала, что обусловлено низкой чувствительностью электрохимической системы. Вследствие низкой растворимости ДТОФПГ\* повысить его концентрацию в ячейке невозможно, поэтому были рассмотрены электроды с иммобилизованным ДТОФПГ\*. На вольтамперограммах ДТОФПГ\*/СУЭ наблюдается пара слабовыраженных катодно-анодных ступеней при 0.207 и 0.288 В соответственно (рис. 1). Соотношение токов анодной и катодной ступеней свидетельствует о необратимости электронного переноса.

Для повышения чувствительности отклика рассмотрен ряд модифицированных электродов в качестве подложки для последующей иммобилизации ДТОФПГ\*. Для этих целей использовали МУНТ и МУНТ-СООН, наночастицы  $SeO_2$  и  $SnO_2$ , диспергированные в поверхностно-активных веществах. Полученные вольтамперные характеристики электровосстановления ДТОФПГ\* представлены в табл. 1.

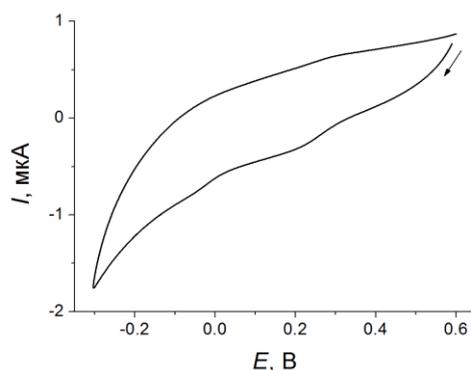


Рис. 1. Циклическая вольтамперограмма 0.65 мМ ДТОФПГ\*, иммобилизованного на СУЭ на фоне фосфатного буферного раствора pH 7.4. Скорость изменения потенциала 100 мВ/с

Табл. 1

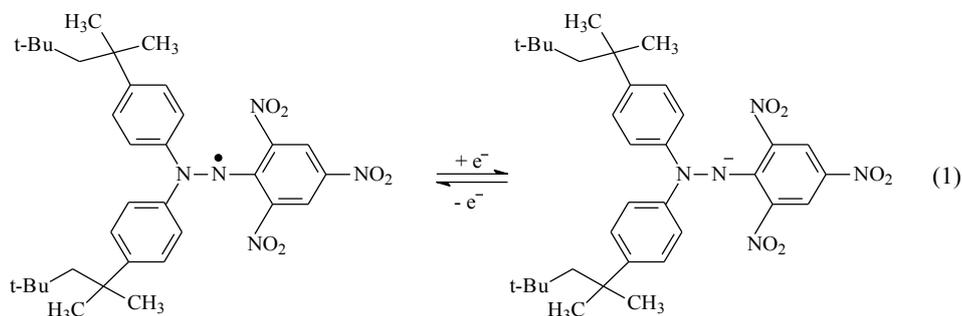
Вольтамперные характеристики ДТОФПГ\*, иммобилизованного на химически модифицированных электродах ( $n=3$ ;  $P=0.95$ ).

| Электрод                                | $E_{к}, В$ | $E_{а}, В$ | $\Delta E_{п}, В$ | $I_{к}, мкА$     | $I_{а}, мкА$    | $I_{а}/I_{к}$ |
|---|------------|------------|-------------------|------------------|-----------------|---------------|
| ДТОФПГ*/СУЭ                             | 0.207      | 0.288      | 0.081             | $-0.07 \pm 0.02$ | $0.03 \pm 0.01$ | 0.43          |
| ДТОФПГ*/МУНТ-СООН-ЦПБ/СУЭ               | 0.298      | 0.358      | 0.060             | $-2.5 \pm 0.2$   | $3.1 \pm 0.3$   | 1.24          |
| ДТОФПГ*/МУНТ-Додецил-сульфат натрия/СУЭ | 0.217      | 0.298      | 0.081             | $-0.45 \pm 0.03$ | $0.49 \pm 0.04$ | 1.09          |
| ДТОФПГ*/ $SnO_2$ -ЦПБ/СУЭ               | 0.288      | 0.379      | 0.091             | $-2.4 \pm 0.1$   | $2.7 \pm 0.2$   | 1.13          |
| ДТОФПГ*/ $CeO_2$ -ЦПБ/СУЭ               | 0.298      | 0.369      | 0.071             | $-3.5 \pm 0.2$   | $3.4 \pm 0.2$   | 0.97          |

Как видно из табл. 1, 34–50-кратное увеличение токов восстановления/окисления иммобилизованного ДТОФПГ\* наблюдается для электродов, модифицированных наноматериалами, диспергированными в катионном ЦПБ. Это, вероятно, обусловлено гидрофобными взаимодействиями ароматических колец и алкильных фрагментов ДТОФПГ\* с алкильными и ароматическими фрагментами молекул ЦПБ, что приводит к прочному удерживанию радикала на электродной поверхности. Кроме того, наночастицы  $CeO_2$  [22] и  $SnO_2$  [23], а также МУНТ-СООН при pH 7.4 имеют частичный отрицательный заряд, участвующий в электростатическом взаимодействии с положительно заряженными молекулами ЦПБ, и, как следствие, происходит стабилизация дисперсии наноматериалов в среде ЦПБ. Увеличение токов восстановления обусловлено большей площадью эффективной поверхности модифицированных электродов по сравнению с СУЭ.

Наилучшие вольтамперные характеристики получены для электрода, модифицированного наночастицами  $CeO_2$ , диспергированными в катионном ЦПБ, который использовали для дальнейших исследований, что хорошо согласуется с данными, полученными ранее для ДФПГ\* [21]. Соотношение анодного и катодного токов и разность потенциалов анодного и катодного пиков ДТОФПГ\*,

равная 71 мВ, свидетельствует об обратимом одноэлектронном восстановлении согласно схеме 1.



Полученные результаты позволяют использовать ДТОФПГ<sup>•+</sup>/CeO<sub>2</sub>-ЦПБ/СУЭ для оценки АОА различных объектов.

**2.2. Электровосстановление иммобилизованного на электроде ДТОФПГ<sup>•+</sup> в присутствии фенольных антиоксидантов.** Созданный электрод использован для оценки АОА природных фенольных антиоксидантов различных классов, в частности катехина, кверцетина, танина и феруловой кислоты (рис. 2).

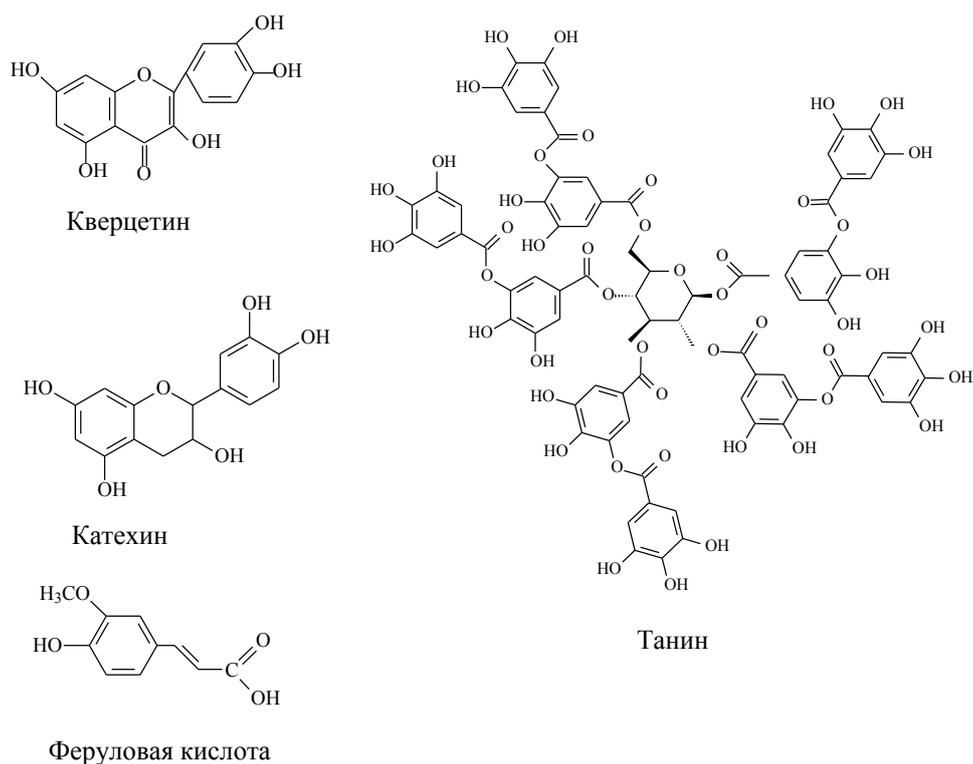


Рис. 2. Структурные формулы исследуемых фенольных антиоксидантов

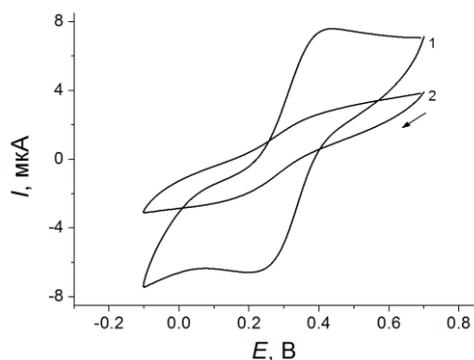
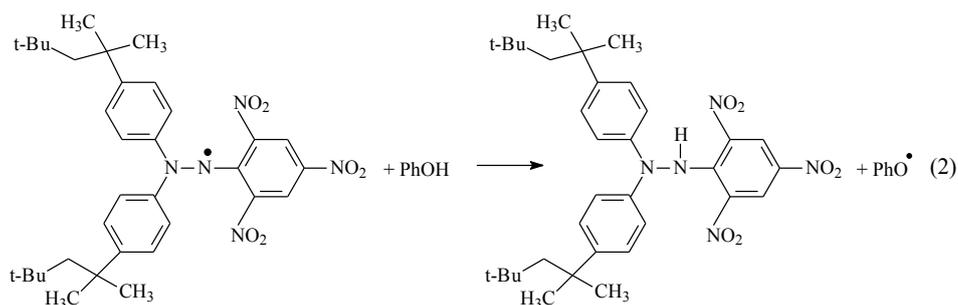


Рис. 3. Циклические вольтамперограммы ДТОФПГ<sup>+</sup>/CeO<sub>2</sub>-ЦПБ/СУЭ на фоне фосфатного буферного раствора pH 7.4 (кривая 1) и после реакции с 10 мкМ кверцетина (кривая 2). Скорость изменения потенциала 500 мВ/с. Время экспозиции 10 мин

В присутствии фенольных антиоксидантов на циклических вольтамперограммах наблюдается значительное уменьшение токов пиков восстановления/окисления иммобилизованного на электроде ДТОФПГ<sup>+</sup> (рис. 3, кривая 2).

Такое поведение свидетельствует о протекании реакции между антиоксидантами и иммобилизованным ДТОФПГ<sup>+</sup> согласно схеме 2. При этом фенольный антиоксидант превращается в относительно стабильный феноксильный радикал.



Поскольку реакции антиоксидантов с ДФПГ<sup>+</sup> и родственными радикалами протекают во времени, то на аналитический сигнал системы оказывает влияние время экспозиции. Установлено, что для протекания реакции достаточно 5 мин.

Следует также отметить, что в присутствии антиоксиданта даже при низких концентрациях последнего происходит искажение кривой, что не позволяет надежно оценивать высоту пика. Поэтому для повышения надежности измерения использовали дифференциально-импульсную вольтамперометрию.

На дифференциально-импульсных кривых регистрируется пик восстановления иммобилизованного на электроде ДТОФПГ<sup>+</sup>. Для оценки стабильности отклика электрода проведено пять последовательных сканирований фонового электролита и установлено, что уже после второго сканирования высота пика восстановления иммобилизованного ДТОФПГ<sup>+</sup> сохраняется постоянной. В случае ДФПГ<sup>+</sup> постоянство тока восстановления достигается лишь после пятого скана [21], что подтверждает более прочное удерживание ДТОФПГ<sup>+</sup> на поверхности электрода вследствие увеличения гидрофобности реагента за счет введения в его

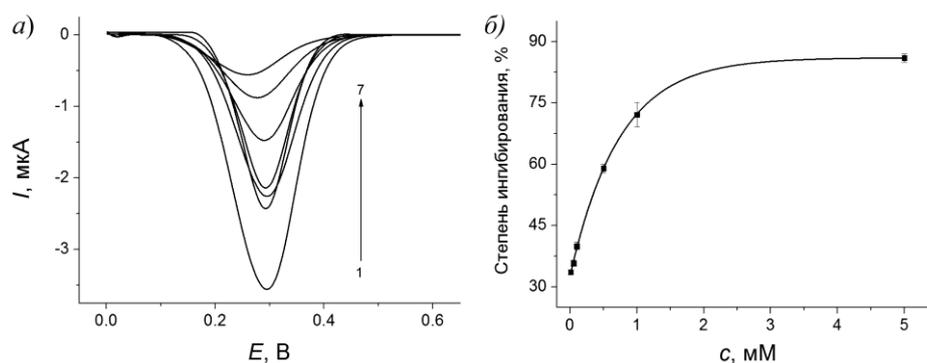


Рис. 4. *a*) Дифференциально-импульсные вольтамперограммы ДТОФПГ<sup>+</sup>/CeO<sub>2</sub>-ЦПБ/СУЭ на фоне фосфатного буферного раствора pH 7.4 (кривая 1) и после реакции с феруловой кислотой различной концентрации: 2 – 10; 3 – 50; 4 – 100; 5 – 500; 6 – 1000 и 7 – 5000 мкМ. Амплитуда импульса 50 мВ, время импульса 50 мс, скорость изменения потенциала 10 мВ/с. Время экспозиции 5 мин. *б*) Зависимость степени ингибирования ДТОФПГ<sup>+</sup> от концентрации феруловой кислоты

Табл. 2

АОА фенольных природных антиоксидантов в реакциях с ДТОФПГ<sup>+</sup> и ДФПГ<sup>+</sup> ( $n = 3$ ;  $P = 0.95$ )

| Антиоксидант      | ДТОФПГ <sup>+</sup>    |       | ДФПГ <sup>+</sup>      |       |
|-------------------|------------------------|-------|------------------------|-------|
|                   | EC <sub>50</sub> , мкМ | $s_r$ | EC <sub>50</sub> , мкМ | $s_r$ |
| Танин             | 12.3 ± 0.7             | 0.02  | 15 ± 1                 | 0.03  |
| Кверцетин         | 7.6 ± 0.4              | 0.03  | 8.4 ± 0.5              | 0.06  |
| Катехин           | 27 ± 3                 | 0.05  | 32 ± 1                 | 0.03  |
| Феруловая кислота | 286 ± 15               | 0.02  | 284 ± 32               | 0.05  |

структуру *трет*-октильных заместителей. В дальнейших исследованиях проводили двукратное сканирование электрода в фоновом электролите, а затем вносили в электрохимическую ячейку раствор аналита. В ходе химической реакции фенольных антиоксидантов с иммобилизованным ДТОФПГ<sup>+</sup> наблюдается уменьшение токов его восстановления. Типичный вид кривых представлен на примере феруловой кислоты на рис. 4, *a*.

Так как АОА индивидуальных соединений выражают через параметр EC<sub>50</sub>, то есть эффективную концентрацию вещества, восстанавливающую 50% свободных радикалов, рассмотрены зависимости степени ингибирования ДТОФПГ<sup>+</sup> от концентрации антиоксидантов (например, рис. 4, *б*). Для всех рассматриваемых соединений графики имеют сходную форму. Рассчитанные параметры EC<sub>50</sub> для изученных фенольных антиоксидантов представлены в табл. 2 и сопоставлены с EC<sub>50</sub> по реакции с ДФПГ<sup>+</sup> в идентичных условиях. Полученные результаты для ДТОФПГ<sup>+</sup> и ДФПГ<sup>+</sup> хорошо согласуются между собой, что подтверждает правильность полученных результатов.

EC<sub>50</sub> для рассмотренных соединений уменьшается в ряду кверцетин > танин > катехин >> феруловая кислота, что хорошо согласуется с литературными данными для реакций с ДФПГ<sup>+</sup> [21, 24].

Таким образом, полученные результаты позволяют использовать метод для оценки антиоксидантной активности реальных объектов, содержащих фенольные антиоксиданты.

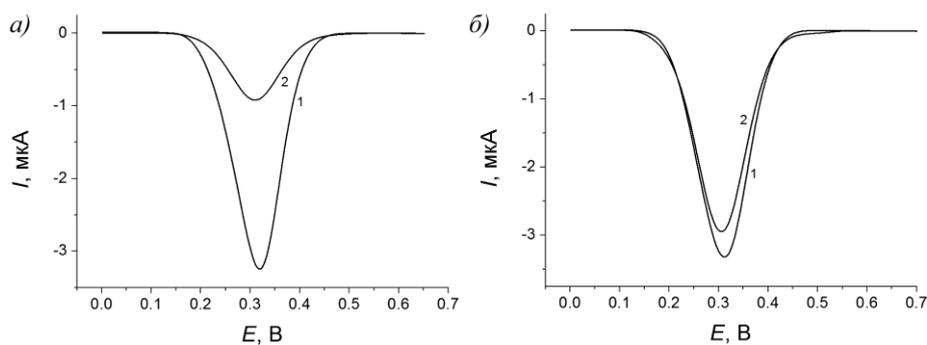


Рис. 5. Дифференциально-импульсные вольтамперограммы ДТОФПГ\*/ $\text{CeO}_2$ -ЦПБ/СУЭ на фоне фосфатного буферного раствора pH 7.4 (кривая 1) и после реакции с 200 мкл гранатового сока (а) и нектара манго-апельсин (б) (кривая 2). Амплитуда импульса 50 мВ, время импульса 50 мс, скорость изменения потенциала 10 мВ/с. Время экспозиции 5 мин

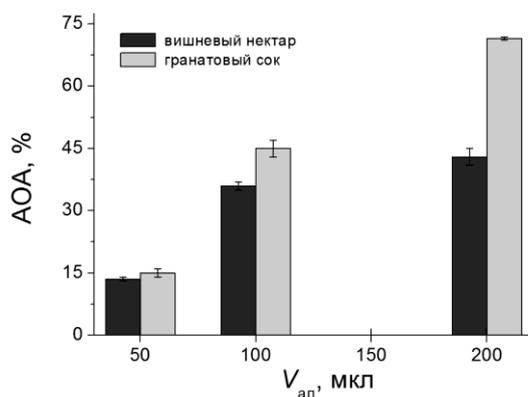


Рис. 6. Оценка влияния аликвоты исследуемого объекта на величину АОА

Табл. 3

АОА соков и нектаров по данным вольтамперометрических измерений на ДТОФПГ\*/ $\text{CeO}_2$ -ЦПБ/СУЭ на фоне фосфатного буферного раствора pH 7.4 ( $n = 3$ ;  $P = 0.95$ )

| Напиток | Название образца | АОА, %         | $s_r$ |
|---------|------------------|----------------|-------|
| Сок     | Апельсиновый сок | $39 \pm 3$     | 0.03  |
|         | Виноград-яблоко  | $38.7 \pm 0.7$ | 0.007 |
|         | Гранатовый сок   | $71.7 \pm 0.9$ | 0.004 |
| Нектар  | Суперфрукты      | $63.3 \pm 0.3$ | 0.005 |
|         | Манго-апельсин   | $10.4 \pm 0.6$ | 0.05  |
|         | Утонченная вишня | $43 \pm 2$     | 0.03  |
|         | Ананасовый       | $16.4 \pm 0.2$ | 0.006 |

**2.3. Вольтамперометрическая оценка АОА соков и нектаров.** Разработанный подход апробирован на образцах соков и нектаров. На дифференциально-импульсных вольтамперограммах ДТОФПГ\*/ $\text{CeO}_2$  – ЦПБ/СУЭ в присутствии напитков наблюдается уменьшение пика ДТОФПГ\* (рис. 5, кривая 2).

Оценено влияние объема аликвоты объекта анализа на вольтамперометрический отклик системы. На примере гранатового сока и вишневого нектара (рис. 6), отличающихся составом компонентов и их концентрациями, показано, что аликвота 200 мкл обеспечивает достаточное снижение пика ДТОФПГ\*.

Результаты определения АОА соков и нектаров представлены в табл. 3. Значения относительного стандартного отклонения подтверждают отсутствие случайных погрешностей определения.

Предложенный способ оценки АОА, основанный на взаимодействии антиоксидантов образца с иммобилизованными на поверхности электрода ДТОФПГ\*, характеризуется простотой, низким расходом реагента и надежностью получаемых результатов. Он позволяет исключить недостатки стандартного спектрофотометрического метода, основанного на реакции образцов с ДФПГ\*, среди которых следует отметить неустойчивость растворов реагента, неселективность светопоглощения в случае окрашенных образцов, а также неприменимость подхода к водным средам.

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 15-03-03224-а).

#### Литература

1. *Rahal A., Kumar A., Singh V., Yadav B., Tiwari R., Chakraborty S., Dhama K.* Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay // *Biomed. Res. Int.* – 2014. – V. 2014. – Art. 761264, P. 1–19. – doi: 10.1155/2014/761264.
2. *Halliwell B., Gutteridge J.M.C.* Free radicals in biology and medicine. 4th Ed. – Oxford: Oxford Univ. Press, 2007. – 888 p.
3. *Karadag A., Ozcelik B., Saner S.* Review of methods to determine antioxidant capacities // *Food Anal. Methods.* – 2009. – V. 2, No 1. – P. 41–60. – doi: 10.1007/s12161-008-9067-7.
4. *Tyurin V.Yu., Meleshonkova N.N., Dolganov A.V., Glukhova A.P., Milaeva E.R.* Electrochemical method in determination of antioxidative activity using ferrocene derivatives as examples // *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.* – 2011. – V. 60, No 4. – P. 647–655. – doi: 10.1007/s11172-011-0100-4.
5. *Tyurin V.Yu., Zhang J., Glukhova A., Milaeva E.R.* Electrochemical antioxidative activity assay of metalloporphyrins bearing 2,6-di-tert-butylphenol groups based on electrochemical DPPH-test // *Macroheterocycles.* – 2011. – V 4, No 3. – P. 211–212.
6. *Ahmed S., Tabassum S., Shakeel F., Khan A.Y.* A facile electrochemical analysis to determine antioxidant activity of flavonoids against DPPH radical // *J. Electrochem. Soc.* – 2012. – V. 159, No 5. – P. F103–F109. – doi: 10.1149/2.jes112300.
7. *Milardović S., Iveković D., Grabarić B.S.* A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical // *Bioelectrochemistry.* – 2006. – V. 68, No 9. – P. 175–180. – doi: 10.1016/j.bioelechem.2005.06.005.
8. *Milardović S., Iveković D., Rumenjak V., Grabarić B.S.* Use of DPPH\*/DPPH redox couple for amperometric determination of antioxidant activity // *Electroanalysis.* – 2005. – V. 20, No 20. – P. 1847–1853. – doi: 10.1002/elan.200503312.
9. *Pisoschi A.M., Cheregi M.C., Danet A.F.* Total antioxidant capacity of some commercial fruit juices: electrochemical and spectrophotometrical approaches // *Molecules.* – 2009. – V. 14, No 1. – P. 480–493. – doi: 10.3390/molecules14010480.

10. *Vasilescu I., Eremia S.A.V., Albu C., Radoi A., Litescu S.-C., Radu G.-L.* Determination of the antiradical properties of olive oils using an electrochemical method based on DPPH radical // *Food Chem.* – 2015. – V. 166. – P. 324–329. – doi: 10.1016/j.foodchem.2014.06.042.
11. *Intarakamhang S., Schulte A.* Automated electrochemical free radical scavenger screening in dietary samples // *Anal. Chem.* – 2012. – V. 84, No 15. – P. 6767–6774. – doi: 10.1021/ac301292c.
12. *Magalhães L.M., Santos M., Segundo M.A., Reis S., Lima J.L.F.C.* Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity // *Talanta.* – 2009. – V. 77, No 5. – P. 1559–1566. – doi: 10.1016/j.talanta.2008.10.034.
13. *Andrei V., Bunea A.-I., Tudorache A., Gáspár S., Vasilescu A.* Simple DPPH<sup>•</sup>-based electrochemical assay for the evaluation of the antioxidant capacity: a thorough comparison with spectrophotometric assays and evaluation with real-world samples // *Electroanalysis.* – 2014. – V. 26, No 12. – P. 2677–2685. – doi: 10.1002/elan.201400376.
14. *Amatongchai M., Laosing S., Chailapakul O., Nacapricha D.* Simple flow injection for screening of total antioxidant capacity by amperometric detection of DPPH radical on carbon nanotube modified-glassy carbon electrode // *Talanta.* – 2012. – V. 97. – P. 267–272. – doi: 10.1016/j.talanta.2012.04.029.
15. *Oliveira G.K.F., Tormin T.F., Sousa R.M.F., de Oliveira A., de Morais S.A.L., Richter E.M., Munoz R.A.A.* Batch-injection analysis with amperometric detection of the DPPH radical for evaluation of antioxidant capacity // *Food Chem.* – 2016. – V. 192. – P. 691–697. – doi: 10.1016/j.foodchem.2015.07.064.
16. *Apak R., Güçlü K., Demirata B., Ozyürek M., Celik S.E., Bektaşoğlu B., Berker K.I., Ozyurt D.* Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay // *Molecules.* – 2007. – V. 12, No 7. – P. 1496–1547. – doi: 10.3390/12071496.
17. *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. – doi: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb05699.x.
18. *Stasko A., Brezova V., Biskupic S., Misik V.* The potential pitfalls of using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl to characterize antioxidants in mixed water solvents // *Free Radical Res.* – 2007. – V. 41, No 4. – P. 379–390. – doi: 10.1080/10715760600930014.
19. *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. – doi: 10.1016/j.aca.2008.02.047.
20. *Zhuang Q.-k., Scholz F., Pragst F.* The voltammetric behaviour of solid 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) microparticles // *Electrochem. Commun.* – 1999. – V. 1, No 9. – P. 406–410. – doi: 10.1016/S1388-2481(99)00086-7.
21. *Ziyatdinova G., Snegureva Yu., Budnikov H.* Novel approach for the voltammetric evaluation of antioxidant activity using DPPH<sup>•</sup>-modified electrode // *Electrochim. Acta.* – 2017. – V. 247. – P. 97–106. – doi: 10.1016/j.electacta.2017.06.155.
22. *Berg J.M., Romoser A., Banerjee N., Zebda R., Sayes C.M.* The relationship between pH and zeta potential of ~30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to in vitro toxicological evaluations // *Nanotoxicol.* – 2009. – V. 3, No 4. – P. 276–283. – doi: 10.3109/17435390903276941.
23. *Li Z., Zhou Y., Yu T., Liu J., Zou Z.* Unique Zn-doped SnO<sub>2</sub> nano-echinus with excellent electron transport and light harvesting properties as photoanode materials for high performance dye-sensitized solar cell // *CrystEngComm.* – 2012. – V. 14, No 20. – P. 6462–6468. – doi: 10.1039/C2CE25954K.

24. *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. – doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

Поступила в редакцию  
13.12.17

---

**Зиятдинова Гузель Камилевна**, доктор химических наук, доцент кафедры аналитической химии  
Казанский (Приволжский) федеральный университет  
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия  
E-mail: *Ziyatdinovag@mail.ru*

**Снегурева Юлия Владимировна**, студент кафедры аналитической химии  
Казанский (Приволжский) федеральный университет  
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия

**Будников Герман Константинович**, доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии  
Казанский (Приволжский) федеральный университет  
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия  
E-mail: *Herman.Budnikov@kpfu.ru*

---

ISSN 2542-064X (Print)  
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI  
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2018, vol. 160, no. 1, pp. 17–31

---

**2,2-Di(4-Tert-Octylphenyl)-1-Picrylhydrazyl as a Novel Modifier of the Electrode for the Voltammetric Evaluation of Antioxidant Activity**

*G.K. Ziyatdinova<sup>\*</sup>, Yu.V. Snegureva, H.C. Budnikov<sup>\*\*</sup>*

*Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*

E-mail: *<sup>\*</sup>Ziyatdinovag@mail.ru, <sup>\*\*</sup>Herman.Budnikov@kpfu.ru*

Received December 13, 2017

**Abstract**

2,2-di(4-*tert*-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl (DTOPPH<sup>\*</sup>) immobilized on the electrode surface has been proposed as a reagent for the evaluation of antioxidant activity (AOA). The electroreduction parameters of DTOPPH<sup>\*</sup> immobilized on glassy carbon electrode (GCE) modified with carbon nanotubes, cerium and tin dioxide nanoparticles dispersed in surfactants have been studied. The best characteristics (system reversibility and maximal reduction currents) have been obtained on the electrode modified with cerium dioxide nanoparticles and cetylpyridium bromide (CPB). The reduction currents of the immobilized DTOPPH<sup>\*</sup> are decreased in the presence of the phenolic antioxidants allowing application of the electrode created for their AOA evaluation. Five minutes have been shown to be enough for the reaction of antioxidants with the immobilized DTOPPH<sup>\*</sup>. AOA evaluation has been performed under conditions of differential pulse voltammetry. EC<sub>50</sub> parameter for tannin, quercetin, catechin and ferulic acid has been found and compared with that one based on the reaction with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl under the same conditions. The approach developed has been applied for the evaluation of AOA in juices and nectars.

**Keywords:** voltammetry, chemically modified electrodes, CeO<sub>2</sub> nanoparticles, stable radicals, antioxidant activity, food analysis

**Acknowledgments.** The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 15-03-03224-a).

#### Figure Captions

- Fig. 1. The cyclic voltammogram of 0.65 mM DTOPPH' immobilized on GCE in phosphate buffer solution, pH 7.4. The potential scan rate is 100 mV/s.
- Fig. 2. Structures of the phenolic antioxidants under investigation.
- Fig. 3. The cyclic voltammograms of DTOPPH'/CeO<sub>2</sub>-CPB/GCE in phosphate buffer solution, pH 7.4 (curve 1) and in the presence of 10 μM quercetin (curve 2). The potential scan rate is 500 mV/s. The exposure time is 10 min.
- Fig. 4. *a*) The differential pulse voltammograms of DTOPPH'/CeO<sub>2</sub> – CPB/GCE in phosphate buffer solution, pH 7.4 (curve 1) and in the presence of ferulic acid at different concentrations: 2 – 10; 3 – 50; 4 – 100; 5 – 500; 6 – 1000 and 7 – 5000 μM. The pulse amplitude is 50 mV; the pulse time is 50 ms; the potential scan rate is 10 mV/s. The exposure time is 5 min. *b*) The dependence of DTOPPH' inhibition on the concentration of ferulic acid.
- Fig. 5. The differential pulse voltammograms of DTOPPH'/CeO<sub>2</sub> – CPB/GCE in phosphate buffer solution, pH 7.4 (curve 1) and in the presence of 200 μL of pomegranate juice (*a*) and mango-orange nectar (*b*) (curve 2). The pulse amplitude is 50 mV; the pulse time is 50 ms; the potential scan rate is 10 mV/s. The exposure time is 5 min.
- Fig. 6. The effect of the sample aliquot volume on the AOA value.

#### References

1. Rahal A., Kumar A., Singh V., Yadav B., Tiwari R., Chakraborty S., Dhama K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *Biomed. Res. Int.*, 2014, vol. 2014, art. 761264, pp. 1–19. doi: 10.1155/2014/761264.
2. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th Ed. Oxford, Oxford Univ. Press, 2007. 888 p.
3. Karadag A., Ozcelik B., Saner S. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Anal. Methods*, 2009, vol. 2, no. 1, pp. 41–60. doi: 10.1007/s12161-008-9067-7.
4. Tyurin V.Yu., Meleshonkova N.N., Dolganov A.V., Glukhova A.P., Milaeva E.R. Electrochemical method in determination of antioxidative activity using ferrocene derivatives as examples. *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.*, 2011, vol. 60, no. 4, pp. 647–655. doi: 10.1007/s11172-011-0100-4.
5. Tyurin V.Yu., Zhang J., Glukhova A., Milaeva E.R. Electrochemical antioxidative activity assay of metalloporphyrins bearing 2,6-di-tert-butylphenol groups based on electrochemical DPPH-test. *Macroheterocycles*, 2011, vol. 4, no. 3, pp. 211–212.
6. Ahmed S., Tabassum S., Shakeel F., Khan A.Y. A facile electrochemical analysis to determine antioxidant activity of flavonoids against DPPH radical. *J. Electrochem. Soc.*, 2012, vol. 159, no. 5, pp. F103–F109. doi: 10.1149/2.jes112300.
7. Milardović S., Iveković D., Grabarić B.S. A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, 2006, vol. 68, no. 9, pp. 175–180. doi: 10.1016/j.bioelechem.2005.06.005.
8. Milardovic S., Iveković D., Rumenjak V., Grabarić B.S. Use of DPPH'/DPPH redox couple for biamperometric determination of antioxidant activity. *Electroanalysis*, 2005, vol. 20, no. 20, pp. 1847–1853. doi: 10.1002/elan.200503312.
9. Pisoschi A.M., Cheregi M.C., Danet A.F. Total antioxidant capacity of some commercial fruit juices: Electrochemical and spectrophotometrical approaches. *Molecules*, 2009, vol. 14, no. 1, pp. 480–493. doi: 10.3390/molecules14010480.
10. Vasilescu I., Eremia S.A.V., Albu C., Radoi A., Litescu S.-C., Radu G.-L. Determination of the antiradical properties of olive oils using an electrochemical method based on DPPH radical. *Food Chem.*, 2015, vol. 166, pp. 324–329. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.06.042.
11. Intarakamhang S., Schulte A. Automated electrochemical free radical scavenger screening in dietary samples. *Anal. Chem.*, 2012, vol. 84, no. 15, pp. 6767–6774. doi: 10.1021/ac301292c.

12. Magalhães L.M., Santos M., Segundo M.A., Reis S., Lima J.L.F.C. Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity. *Talanta*, 2009, vol. 77, no. 5, pp. 1559–1566. doi: 10.1016/j.talanta.2008.10.034.
13. Andrei V., Bunea A.-I., Tudorache A., Gáspár S., Vasilescu A. Simple DPPH<sup>•</sup>-based electrochemical assay for the evaluation of the antioxidant capacity: A thorough comparison with spectrophotometric assays and evaluation with real-world samples. *Electroanalysis*, 2014, vol. 26, no. 12, pp. 2677–2685. doi: 10.1002/elan.201400376.
14. Amatatongchai M., Laosing S., Chailapakul O., Nacapricha D. Simple flow injection for screening of total antioxidant capacity by amperometric detection of DPPH radical on carbon nanotube modified-glassy carbon electrode. *Talanta*, 2012, vol. 97, pp. 267–272. doi: 10.1016/j.talanta.2012.04.029.
15. Oliveira G.K.F., Tormin T.F., Sousa R.M.F., de Oliveira A., de Morais S.A.L., Richter E.M., Munoz R.A.A. Batch-injection analysis with amperometric detection of the DPPH radical for evaluation of antioxidant capacity. *Food Chem.*, 2016, vol. 192, pp. 691–697. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.07.064.
16. Apak R., Güçlü K., Demirata B., Ozyürek M., Celik S.E., Bektaşoğlu B., Berker K.I., Ozyurt D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 2007, vol. 12, no. 7, pp. 1496–1547. doi: 10.3390/12071496.
17. 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. doi: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb05699.x.
18. Stasko A., Brezova V., Biskupic S., Misik V. The potential pitfalls of using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl to characterize antioxidants in mixed water solvents. *Free Radical Res.*, 2007, vol. 41, no. 4, pp. 379–390. doi: 10.1080/10715760600930014.
19. 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. doi: 10.1016/j.aca.2008.02.047.
20. Zhuang Q.-k., Scholz F., Pragst F. The voltammetric behaviour of solid 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) microparticles. *Electrochem. Commun.*, 1999, vol. 1, no. 9, pp. 406–410. doi: 10.1016/S1388-2481(99)00086-7.
21. Ziyatdinova G., Snegureva Yu., Budnikov H. Novel approach for the voltammetric evaluation of antioxidant activity using DPPH<sup>•</sup>-modified electrode. *Electrochim. Acta*, 2017, vol. 247, pp. 97–106. doi: 10.1016/j.electacta.2017.06.155.
22. Berg J.M., Romoser A., Banerjee N., Zebda R., Sayes C.M. The relationship between pH and zeta potential of ~30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to in vitro toxicological evaluations. *Nanotoxicology*, 2009, vol. 3, no. 4, pp. 276–283. doi: 10.3109/17435390903276941.
23. Li Z., Zhou Y., Yu T., Liu J., Zou Z. Unique Zn-doped SnO<sub>2</sub> nano-echinus with excellent electron transport and light harvesting properties as photoanode materials for high performance dye-sensitized solar cell. *CrystEngComm*, 2012, vol. 14, no. 20, pp. 6462–6468. doi: 10.1039/C2CE25954K.
24. 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. doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

**Для цитирования:** Зиятдинова Г.К., Снегурева Ю.В., Будников Г.К. 2,2-Ди(4-трет-октилфенил)-1-пикрилгидразил как новый модификатор электрода для вольтамперометрической оценки антиоксидантной активности // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2018. – Т. 160, кн. 1. – С. 17–31.

**For citation:** Ziyatdinova G.K., Snegureva Yu.V., Budnikov H.C. 2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl as a novel modifier of the electrode for the voltammetric evaluation of antioxidant activity. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2018, vol. 160, no. 1, pp. 17–31. (In Russian)