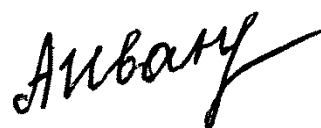


*На правах рукописи*



**Иванова Алла Владимировна**

**ПОТЕНЦИОМЕТРИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ АНТИОКСИДАНТНЫХ И  
АНТИРАДИКАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ВЕЩЕСТВ  
02.00.02 – Аналитическая химия**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора химических наук

**Краснодар**

**2019**

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химико-технологического института федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

Научный консультант: **Брайнина Хьена Залмановна**, доктор химических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ

Официальные оппоненты: **Майстренко Валерий Николаевич**, чл.-корр. АНБ, доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой аналитической химии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», г. Уфа

**Кулапина Елена Григорьевна**, доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии и химической экологии Института химии ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского», г. Саратов

**Зиятдинова Гузель Камилевна**, доктор химических наук, доцент кафедры аналитической химии химического института имени А.М. Бутлерова, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань

Ведущая организация: ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», г. Томск

Защита диссертации состоится "\_\_\_"\_\_\_\_\_2019 г. в 14 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 212.101.16 при ФГБОУ ВО

«Кубанский государственный университет» по адресу: 350040, Краснодар, ул. Ставропольская д. 149, ауд. 3030Л.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», на сайтах ВАК Минобрнауки РФ <http://vak.ed.gov.ru> и ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет» <http://www.kubsu.ru>.

Автореферат разослан "\_\_\_"\_\_\_\_\_2019 г.

Ученый секретарь  
диссертационного  
совета

Киселева  
Наталия Владимировна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Процессы жизнедеятельности организма неразрывно связаны с образованием активных кислородных метаболитов (АКМ) радикальной и нерадикальной природы, являющихся промежуточными продуктами реакции последовательного восстановления кислорода до воды. АКМ вовлекаются в два типа процессов: с одной стороны, реализация защитных реакций организма; с другой стороны, избыточное образование АКМ и их вторичных продуктов приводит к «окислительному стрессу» (ОС) организма. Развитию ОС препятствуют вещества с антиоксидантными свойствами как эндогенного, так и экзогенного происхождения. В настоящее время, пожалуй, нельзя найти ни одной области медицины, биохимии, биофизики, фармации, пищевой технологии, в которой не изучались бы процессы свободно-радикального окисления и антиоксидантного действия. Тематика исследования антиоксидантных свойств веществ носит междисциплинарный характер и направлена на улучшение здоровья человека и увеличение продолжительности жизни. Одним из актуальных направлений в этой области является создание подходов к определению интегральных параметров антиоксидантной и антирадикальной емкости<sup>1</sup>, т.к. эффективность функционирования антиоксидантной системы организма связана не столько с содержанием того или иного антиоксиданта (АО), сколько с их совокупным действием.

В условиях техногенного развития общества, ухудшения экологической ситуации и роста патологических состояний населения риск возникновения ОС резко возрастает, а, следовательно, исследования антиоксидантных свойств различных объектов (биологических жидкостей, продуктов питания, БАД) становятся еще более востребованными.

Круг существующих подходов к определению интегральных параметров антиоксидантной/антирадикальной емкости/активности достаточно широк и по способу регистрации сигналообразующей реакции чаще всего используются спектральные методы (спектрофотометрия, флуорометрия, хемилюминесценция, электронный парамагнитный резонанс). С химической точки зрения действие антиоксидантов сводится к электронно-протонно-донорному механизму, поэтому применение электрохимических методов исследования для интегральной оценки антиоксидантных свойств представляется наиболее целесообразным. Помимо соответствия принципов методов природе антиоксидантного действия, электрохимические методы обладают рядом достоинств - доступность, простота эксплуатации, экспрессность, чувствительность, возможность исследования мутных и окрашенных объектов, реализации как в портативном, так и в проточном вариантах анализа.

---

<sup>1</sup> Под емкостью понимается эффективная эквивалентная концентрация антиоксидантов, вступивших в реакцию с окислителем радикальной или нерадикальной природы.

### **Степень разработанности темы диссертационной работы**

Методики определения интегральных параметров антиоксидантной/антирадикальной емкости базируются, в основном, на применении моделей окислителей (i) с участием свободных радикалов, которые можно подразделить на модели с использованием стабильных радикалов и радикал – генерирующих систем, или (ii) с участием химических реагентов нерадикальной природы, изменяющих какие-либо физико-химические свойства системы при взаимодействии с АО исследуемого образца. Разработанные для удобства использования и быстрого скрининга большого количества объектов, многие современные подходы к исследованию интегральных антиоксидантных параметров имеют как концептуальные, так и технические ограничения. Поскольку результаты исследования и выводы относительно эффективности АО в конечном итоге необходимо интерпретировать по отношению к живым организмам, то подходы к исследованию антиоксидантных свойств целесообразно рассматривать не с позиции метода регистрации сигналообразующей реакции, а с позиции **действия АО в биологических средах**. Исходя из вышеизложенного, можно сформулировать следующие основные требования, которые необходимо учитывать при разработке методик определения интегральных параметров антиоксидантной/антирадикальной емкости и от которых, в конечном итоге, будет зависеть широта их распространения:

- ✓ обоснованность выбора модели окислителя;
- ✓ физиологичность условий проведения измерения, включая используемые реагенты, pH и т.д.;
- ✓ реализация одного из механизмов действия антиоксидантов в организме;
- ✓ качество аналитических характеристик методик.

Существующие методики интегральной оценки антиоксидантных свойств редко ориентируются на удовлетворение всех требований. Таким образом, проблема потребности в методиках, дающих надежные и корректные результаты, остается до конца нерешенной, а создание новых подходов для определения интегральных параметров антиоксидантной/антирадикальной емкости до сих пор является востребованным.

**Целью работы** является развитие теории и практики потенциометрического метода в комплексной оценке антиоксидантных и антирадикальных свойств веществ и создание новых методологических подходов для определения антиоксидантной/ антирадикальной емкости (АОЕ/АРЕ) различных объектов, основанных на механизмах действия АО в организме.

Достижение поставленной цели требует решения следующих **задач**:

- сформулировать общие принципы, теоретические и практические подходы к использованию потенциометрии в интегральной оценке антиоксидантных/ антирадикальных свойств веществ;

- теоретически обосновать и экспериментально подтвердить выбор модели окислителя в реакциях электронного и электронно-протонного переноса с АО;

- обосновать выбор метода оценки результата реакций электронного и электронно-протонного переноса с АО на модельный окислитель в виде параметров антиоксидантной и антирадикальной емкости (АОЕ и АРЕ), установить взаимосвязь структура АО – АОЕ/АРЕ;

- разработать экспрессные методики определения АОЕ и АРЕ индивидуальных веществ и многокомпонентных объектов;

- разработать методики определения интегральных параметров АОЕ и АРЕ различных объектов (лекарственных средств, экстрактов растительного сырья, пищевых продуктов, биологических жидкостей), рассчитать основные аналитические и метрологические характеристики;

- провести корреляционные исследования антиоксидантных свойств с использованием новых и известных методик, основанных на разных физико-химических принципах регистрации аналитического сигнала.

### **Научная новизна работы**

1. Сформулированы и теоретически обоснованы критерии выбора модельной системы окислителя для исследования антиоксидантных свойств веществ.

2. Развита концепция применения потенциометрии в изучении реакций электронного и электронно-протонного переноса для решения конкретных аналитических задач, связанных с определением интегральных параметров АОЕ и АРЕ различных объектов.

3. Изучены закономерности протекания реакции  $K_3[Fe(CN)_6]$  с АО, показана возможность использования изменения ОВП системы  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  для оценки антиоксидантных свойств веществ, установлена взаимосвязь структуры АО и его АОЕ.

4. Исследовано влияние хелатирующей способности АО на величину интегрального параметра АОЕ.

5. Изучены закономерности изменения ОВП системы  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  при протекании реакции генерирования пероксильных радикалов, показана возможность использования потенциометрии для оценки кинетических параметров этой реакции (скорости и константы скорости генерирования).

6. Изучены закономерности изменения ОВП радикал-генерирующей системы на модели 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорида (ААРН) в качестве источника пероксильных радикалов в процессах их генерирования и ингибирования антиоксидантами, показана возможность использования потенциометрии для количественной оценки этих процессов.

7. Предложены новые подходы для потенциометрического определения интегральных параметров АОЕ и АРЕ различных объектов.

Новизна предлагаемых подходов подтверждена также 4 патентами РФ.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

1. Разработана методология потенциометрического исследования АОЕ/АРЕ объектов, основанная на закономерном изменении ОВП системы, состоящей из модельного окислителя и исследуемого образца, в процессе реакций электронно-протонного переноса.

2. Сформулированы и теоретически обоснованы критерии выбора модельной системы для исследования антиоксидантных/антирадикальных свойств веществ.

3. Разработана оригинальная потенциометрическая методика определения АОЕ индивидуальных АО и многокомпонентных объектов, основанная на реакции АО с окисленным компонентом системы  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ , рассчитаны стехиометрические коэффициенты реакций.

4. Предложен новый подход к определению скорости и константы скорости реакции генерирования пероксильных радикалов, подобных радикалам, образующимся в организме с использованием потенциометрического метода.

5. Разработана оригинальная потенциометрическая методика определения АРЕ индивидуальных АО и многокомпонентных объектов, основанная на реакции АО с генерируемыми пероксильными радикалами, образующимися в результате распада ААРН, рассчитаны коэффициенты ингибирования.

6. Разработаны и запатентованы алгоритмы определения АОЕ, АРЕ, кинетических параметров реакции генерирования пероксильных радикалов с использованием потенциометрии, определены рабочие условия проведения анализа, исследовано большое количество объектов (индивидуальные вещества природного происхождения и синтезированные, экстракты растительного сырья, лекарственные препараты, пищевые продукты, биологические жидкости), проведены корреляционные исследования с привлечением независимых способов.

7. Оценены аналитические и метрологические характеристики разработанных методик.

8. Аттестованы методики определения антиоксидантной емкости пищевых продуктов, крови и ее фракций.

9. Разработанные методики внедрены в образовательный процесс.

**Методология и методы диссертационного исследования.** Методологической основой при выполнении диссертационного исследования послужили теоретические знания и современные методы исследования антиоксидантных/антирадикальных свойств соединений с использованием моделей окислителей радикальной и нерадикальной природы.

При выборе модельных окислителей руководствовались современными работами в области исследования механизмов химических реакций АО с АКМ, данными по термодинамическим и кинетическим характеристикам. При исследовании электрохимической

обратимости систем и окислительно-восстановительных свойств соединений использовали метод циклической вольтамперометрии. В качестве основного метода исследования АОЕ, АРЕ и кинетики генерирования радикалов использован потенциометрический, как наиболее простой, информативный, более полно отвечающий природе изучаемых процессов. В корреляционных исследованиях в качестве методов сравнения применены известные спектрофотометрические методики с использованием моделей окислителей радикальной и нерадикальной природы.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

- Методология комплексного исследования антиоксидантных свойств веществ, основанная на механизмах действия АО в организме.
- Обоснование выбора потенциометрии и модельных окислителей  $K_3[Fe(CN)_6]$  и ААРН для определения интегральных параметров АОЕ/АРЕ в реакциях переноса электрона и атома водорода.
- Результаты исследования взаимодействия АО с выбранными окислителями методом потенциометрии, количественная оценка этого взаимодействия в виде параметров АОЕ и АРЕ, определение стехиометрических коэффициентов в реакциях электронного переноса и коэффициентов ингибирования в реакциях электронно-протонного переноса.
- Результаты исследования кинетики генерирования пероксильных радикалов на модели распада азоинициатора ААРН потенциометрическим методом в условиях, близких к физиологическим, оценка скорости и константы скорости генерирования.
- Закономерности изменения ОВП радикал генерирующей системы на модели ААРН в качестве источника пероксильных радикалов в процессах их генерирования и ингибирования антиоксидантами.
- Потенциометрические методики определения интегральных параметров АОЕ и АРЕ, отличающиеся простотой, экспрессностью, точностью, воспроизводимостью и их применение в анализе широкого круга модельных веществ и реальных объектов.
- Результаты определения АОЕ и АРЕ индивидуальных АО и реальных объектов (индивидуальные вещества природного происхождения и вновь синтезированные, экстракты растительного сырья, лекарственные препараты, пищевые продукты, биологические жидкости).
- Результаты корреляционных исследований антиоксидантных свойств, полученных с использованием новых потенциометрических и известных методик, основанных на разных физико-химических принципах регистрации аналитического сигнала.

**Степень достоверности и апробации результатов.** Достоверность научных положений, полученных результатов и сформулированных в работе выводов обеспечена использованием современных методов исследования и оборудования для электрохимических и спектроскопических измерений, высокой степенью корреляции полученных

экспериментальных результатов с теоретически ожидаемыми и с независимыми методами исследования, согласованностью с литературными данными, высокими показателями метрологических характеристик.

Разработанные методики определения антиоксидантной емкости пищевых продуктов, продовольственного сырья, БАД, витаминов, биологических материалов (крови и ее фракций) метрологически аттестованы, получен акт внедрения разработанных методик в образовательный процесс.

**Основные положения** диссертационной работы доложены на XV, XVI научно-технической конференции «Датчик» (Судак, 2003, 2004 гг.); на VI, VII, VIII и IX Всероссийских конференциях «Электрохимические методы анализа» (Уфа, Екатеринбург, Россия, 2004, 2008, 2012, 2016 гг.); 6 - м симпозиуме «Биосенсоры и биоаналитическая техника в экологическом и клиническом анализе» (Рим, Италия, 2004 г.); на Научно-технической конференции «Высокоэффективные пищевые технологии, методы и средства для их реализации» (Москва, 2004 г.); на Всероссийской научной конференции с международным участием «Электроаналитика-2005» (Екатеринбург, 2005 г.); на 4-ой научно-практической конференции с международным участием «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека» (Смоленск, 2005 г.); на I Международной конференции «Traditional medicine and dietology – a way to caucasian longevity» (Likani, Georgia, 2006 г.); на Международном конгрессе по аналитическим наукам ICAS-2006 (Москва, Россия, 2006 г.); на XVIII, XX Менделеевских съездах по общей и прикладной химии (Москва, Екатеринбург, Россия, 2007, 2016 гг.); на Международных симпозиумах «Последние достижения в анализе пищевых продуктов» (Prague, Czech Republic, 2007, 2015 гг.); на II Международном Форуме «Аналитика и Аналитики» (Воронеж, 2008 г.); на III Всероссийской конференции с международным участием «Аналитика России» (Краснодар, 2009 г.); на XV конференции по электроанализу (Инсбрук, Австрия, 2009 г.); на симпозиуме с международным участием «Теория и практика электроаналитической химии» (Томск, Россия, 2010 г.); на VIII Международной конференции «Биоантиоксидант» (Москва, 2010 г.); на IV химическом конгрессе (Prague, Czech Republic, 2012 г.); на IX, X Всероссийской конференции «Химия и медицина» (Уфа, Россия, 2013, 2015 гг.); на II, III Съездах аналитиков России (Москва, 2013, 2017 гг.); на Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (Новосибирск, 2013 г.); на конференции «Электроанализ 2015» (Бордо, Франция, 2015 г.); на XX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Екатеринбург, 2016 г.); на международной конференции «Analytical and Bioanalytical Chemistry» (Барселона, Испания, 2018 г.); на III, IV Междисциплинарном Симпозиуме по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике МОБИ-ХимФарма (Севастополь, Новый Свет, Судак, Крым, 2017, 2018, 2019 гг.).



**Публикации.** По результатам диссертации опубликовано 132 работы, в том числе 16 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК, 4 патента РФ, 2 учебных пособия и тезисы более 100 докладов всероссийских и международных научных конференций.

**Личный вклад автора** в исследованиях, проведенных в рамках диссертационной работы, заключается в обосновании методологии исследования антиоксидантных свойств веществ на основании действия АО в организме, развитии теории потенциометрического исследования реакций электронно-протонного переноса, в теоретическом обосновании выбранных моделей окислителей и создании на этой основе новых подходов к определению АОЕ/АРЕ индивидуальных веществ и объектов со сложной матрицей. Работы, выполненные в соавторстве и включенные в диссертацию, состояли в постановке целей и решении задач исследования, интерпретации полученных экспериментальных данных, систематизации результатов исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Международной ассоциации INTAS (проект № 00-273, 2001 – 2004 гг.), Министерства образования РФ (проект № 14024, 2005 г.), Международного научно-технического центра МНТИЦ (проект № 2132, 2003-2005 гг.), РФФИ (проект № 07-03-96071-р\_урал\_a, 2007-2009 гг.), Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно - технической сфере (ГК № 4140p/6479, 2006 – 2007 гг.), в рамках госбюджетной темы Н687.42Г.002/12 (проект № 4.9514.2017/БЧ, 2017-2019 гг.), РНФ (проект № 16-13-00008, 2016-2018 гг.)

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, заключения, списка литературы, приложений. Текст диссертации изложен на 350 страницах, содержит 89 рисунков, 85 таблиц, 3 приложения и 412 библиографических ссылок.

*Во введении* сформулирована актуальность и степень разработанности темы диссертационной работы, поставлены цели и задачи исследования, показана научная новизна и практическая значимость, а также положения, выносимые на защиту.

*Первая глава* посвящена обзору литературы, в котором раскрыты механизмы биологического действия АО, показана связь с механизмами химического превращения АО и рассмотрены основные подходы к исследованию антиоксидантных/антирадикальных свойств веществ, которые классифицированы в соответствии с механизмами. Проведен анализ существующих способов и обоснована необходимость разработки новых подходов в исследовании интегральных параметров антиоксидантных свойств веществ.

*Во второй главе* описаны применяемые методы исследования, приборы и используемые методики. Представлены сведения об используемых реактивах и объектах исследования, а также способах математической обработки полученных результатов.

*Третья глава* посвящена развитию теоретических подходов к исследованию реакций переноса электрона с АО на модельный окислитель

с использованием потенциометрии. Теоретически и экспериментально обоснован выбор модели окислителя для определения интегрального параметра АОЕ, основанного на реакции переноса электрона, а также условий реализации данной реакции. Представлены результаты определения АОЕ модельных индивидуальных АО, показана связь их структуры с величиной АОЕ.

*В четвертой главе* описаны теоретические подходы к исследованию реакций переноса атомов водорода с АО на модельный окислитель с использованием потенциометрии. Обоснован выбор радикал-генерирующей системы и изучена кинетика реакции термического распада ААРН. Изучены закономерности изменения ОВП радикал генерирующей системы на модели ААРН в качестве источника пероксильных радикалов в процессах их генерирования и ингибирования антиоксидантами.

*В пятой главе* представлены результаты определения АОЕ и АРЕ различных реальных объектов – индивидуальных природных АО, синтезированных АО, продуктов питания (ягод, фруктов, овощей, чая, спиртных напитков), лекарств, витаминов, экстрактов растений, биологических объектов (плазма, сыворотка, эритроцитарная масса, диализная жидкость). Оценены аналитические и метрологические характеристики разработанных методик, представлены результаты корреляционных исследований, полученных с использованием новых потенциометрических и известных методик, основанных на других физико-химических принципах.

*В заключении* диссертации резюмированы результаты и подведены итоги проведенного исследования.

*В приложениях* к диссертации представлены копии свидетельств об аттестации методик определения АОЕ пищевых продуктов, продовольственного сырья, БАД, витаминов и биологических объектов, акта внедрения разработанных методик в образовательный процесс.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Система защиты организма от повреждающего действия АКМ представлена веществами с антиоксидантным действием. Структуры основных АО приведены на рисунке 1. Анализ литературных данных показывает, что, по состоянию на сегодняшний день, известны шесть механизмов биологического действия АО (рисунок 2).

При рассмотрении механизмов биологического действия АО с химической точки зрения их превращения сводятся к трем типам реакций:

(i) реакции переноса электрона с АО на субстрат (реакция окисления АО);

(ii) реакции переноса атома водорода с АО на субстрат (реакция окисления АО);

(iii) реакции переноса одной или нескольких пар электронов (реакция комплексообразования АО с ионами металлов переменной валентности).

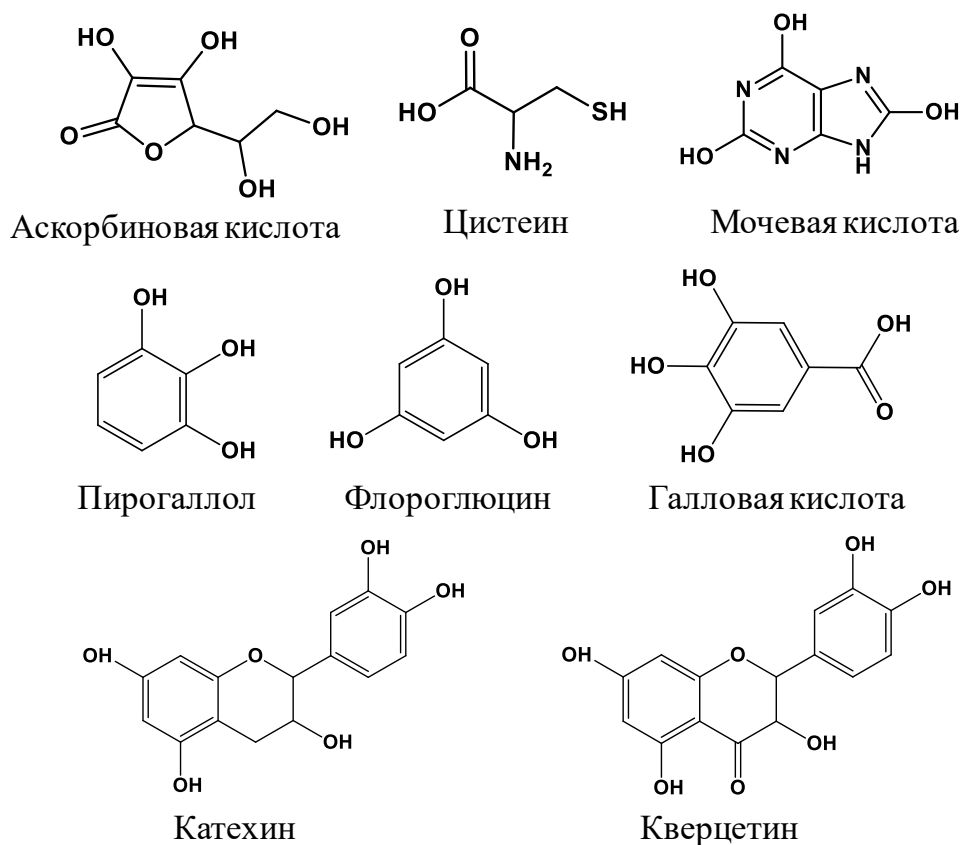


Рисунок 1 – Структурные формулы АО

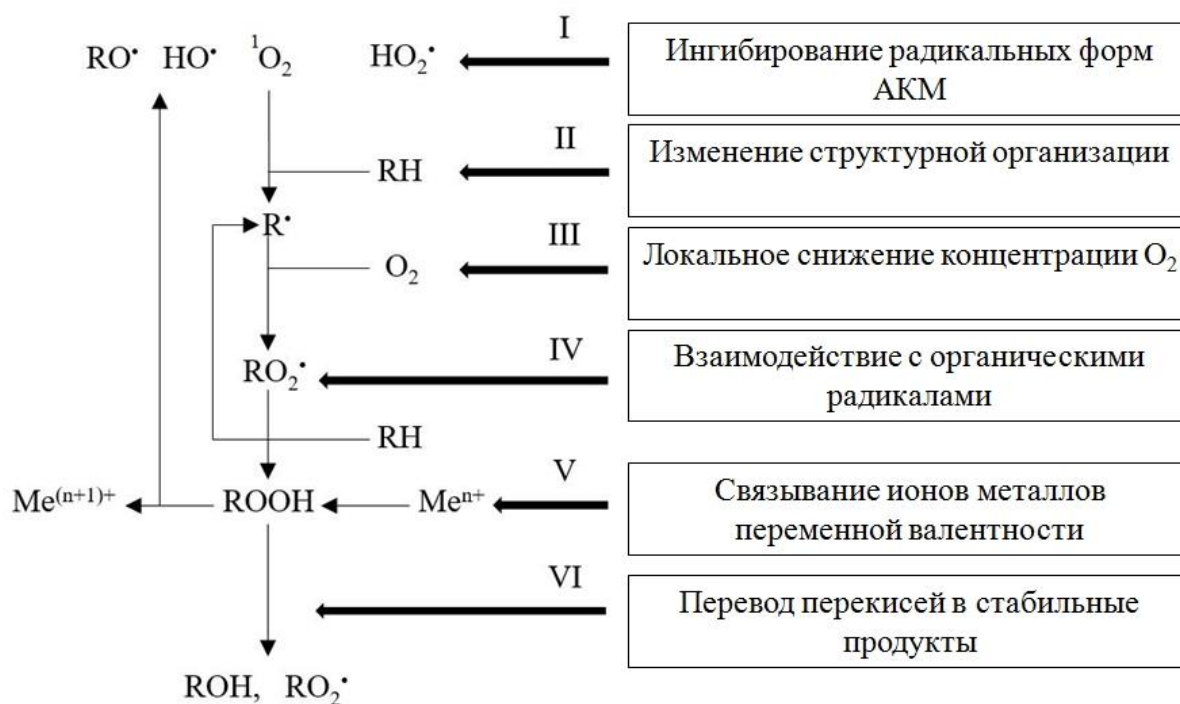


Рисунок 2 - Механизмы биологического действия АО

Существование различных механизмов действия АО и данные, свидетельствующие о том, что способность к улавливанию радикалов непосредственно связана со способностью АО отдавать атома водорода, однако не всегда коррелирует с их ОВП, приводит к выводу, что необходимо создание новых комплексных подходов для исследования антиоксидантных свойств веществ.

### **Потенциометрическое определение интегрального параметра АОЕ, основанного на реакции переноса электрона**

Одной из основных проблем при определении интегрального параметра АОЕ, основанного на реакциях переноса электрона, является обоснованность выбора модели окислителя. Расхождение правильно подобранного окислителя в реакциях переноса электрона с АО на субстрат, может дать информацию об интегральном параметре АОЕ. В литературе, к сожалению, вопросу обоснованности выбора модели окислителя уделяется мало внимания, тогда как от этого напрямую будет зависеть корректность получаемой информации.

### ***Потенциометрия в оценке АОЕ индивидуальных соединений и интегральной величины АОЕ, теоретические подходы***

Термодинамическая возможность протекания реакций между модельным окислителем и антиоксидантами исследуемого образца определяется ОВП сопряженных пар участников, а степень их протекания зависит от разности этих потенциалов и скорости химических взаимодействий АО-окислитель. В предложенных в литературе подходах, как правило, термодинамика реакций не рассматривается. Реакции, положенные в основу многих известных методик определения АОЕ реализуются в кислых или щелочных средах, что не соответствует физиологическим условиям, а, следовательно, данные об антиоксидантных свойствах объектов трудно однозначно интерпретировать по отношению к организму. Существенной является также стехиометрия взаимодействия выбранного окислителя с АО, которая должна соответствовать количеству функциональных групп, проявляющих антиоксидантные свойства. Отсутствие универсальных единиц измерения является существенным препятствием при интерпретации и сравнении результатов исследования. При разработке новых подходов для оценки АОЕ важно также учесть экспрессность анализа и возможность исследования окрашенных образцов.

Таким образом, можно сформулировать требования, выполнение которых необходимо для корректного определения интегральной величины АОЕ:

- реакция переноса электрона с АО на молекулу окислителя должна быть термодинамически возможной;
- ОВП окислителя в условиях анализа должен находиться между потенциалами АКМ и АО, но между ними должна существовать определённая разность.
- реакция окислителя с АО должна реализовываться в условиях, близких к физиологическим;
- реакция окислителя с АО должна протекать стехиометрично в соответствии с количеством функциональных групп, проявляющих антиоксидантные свойства;
- должна быть реализуемой возможность получать результат в универсальных единицах измерения, например, М-экв;

- должна быть обеспечена возможность анализировать широкий круг объектов, в том числе окрашенных;
- скорость ОВ реакции должна быть достаточной высокой.

В таблице 1 приведены стандартные ОВП основных АКМ и их значения, рассчитанные для pH=7. Экспериментально установлено, что ОВП основных АО в нейтральной среде составляют от -0,2 до 0 В. Из этих данных следует, что окислитель, ОВП которого лежит в пределах 0- +0,62 В должен корректно обеспечить необходимые термодинамические условия протекания аналитической сигналообразующей реакции в условиях нейтральной среды.

Таблица 1 - ОВП активных кислородных метаболитов (В, отн. НВЭ)

АКМ	Стандартный потенциал, (pH=0)	Стандартный потенциал (pH=14)	Уравнение полуреакции	Потенциал системы (pH=7)
$\text{H}_2\text{O}_2/\text{OH}^\bullet$	+1.14		$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ + e = \text{OH}^\bullet + \text{H}_2\text{O}$	+0.72
$\text{HO}_2^\bullet/\text{H}_2\text{O}_2$	+1.44		$\text{HO}_2^\bullet + \text{H}^+ + e = \text{H}_2\text{O}_2$	+1.02
$\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$	+1.763		$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2e = \text{H}_2\text{O}$	+1.343
$\text{OH}^\bullet/\text{H}_2\text{O}$	+2.38		$\text{OH}^\bullet + \text{H}^+ + e = \text{H}_2\text{O}$	+1.96
$\text{HO}_2^\bullet/\text{H}_2\text{O}$	+1.65		$\text{HO}_2^\bullet + 3\text{H}^+ + 3e = 2\text{H}_2\text{O}$	+1.23
$\text{O}_2^\bullet/\text{OH}^-$		+0.645	$\text{O}_2^\bullet + 2\text{H}_2\text{O} + 3e = 4\text{OH}^-$	+1.205
$\text{O}_2^\bullet/\text{HO}_2^-$		+0.20	$\text{O}_2^\bullet + \text{H}_2\text{O} + e = \text{HO}_2^- + \text{OH}^-$	+0.62
$\text{HO}_2^-/\text{OH}^\bullet$		+0,184	$\text{HO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + e = \text{OH}^\bullet + 2\text{OH}^-$	+1.024
$\text{OH}^\bullet/\text{OH}^-$		+1.985	$\text{OH}^\bullet + e = \text{OH}^-$	+2.405

В таблице 2 приведены стандартные ОВП соединений, которые наиболее часто используются в качестве модели окислителя при определении АОЕ как интегрального параметра, основанного на реакциях переноса электрона.

Таблица 2 - ОВП модельных окислителей, используемых в качестве реагентов в способах определения интегрального параметра АОЕ

Сопряженная пара окислителя	Метод	Потенциал, В отн. НВЭ
$\text{I}_2/2\text{I}^-$	Кулонометрия	+0.621
$\text{Br}_2/2\text{Br}^-$	Кулонометрия	+1.087
$\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$	Цериметрия	+1.4 - +1.731
$\text{Cu(II)-неокупроин}/\text{Cu(I)-неокупроин}$	CUPRAC	+0.6
ABTS <sup>®</sup>	TEAC	+0.68
$\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3/\text{Fe(II)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3$	FRAP	+0.7
$[1,10\text{-фенантролин}]\text{Fe}^{3+}/[1,10\text{-фенантролин}]\text{Fe}^{2+}$	FRAP	+1.02
1,1-дифенил-2-пикрилгидразил	DPPH метод	+0.495
$\text{K}_3[\text{Fe(CN)}_6]/\text{K}_4[\text{Fe(CN)}_6]$	Предлагаемый метод	+0.36

Сравнивая данные таблиц 1-2, легко видеть, что некоторые из этих моделей, имеют достаточно высокий стандартный потенциал, близкий к потенциалам АКМ, а в случае церия превышает его. С термодинамической

точки зрения в нейтральной среде эти соединения будут хорошо окислять многие вещества, к числу которых могут относиться соединения, не обладающие антиоксидантными свойствами или даже действующие как оксиданты.

Большое распространение получили методы, основанные на реакциях переноса электронов с АО на комплексы железа. Однако, соединения железа в зависимости от окружения имеют различные ОВП. В таблице 3 приведены значения стандартных потенциалов для сопряженной пары  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  в зависимости от природы лиганда.

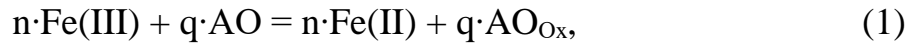
Таблица 3 - Изменение потенциала сопряженной пары  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  в зависимости от природы лиганда

Лиганд	Сопряженная ОВ пара	$E^0$ , В отн. НВЭ
-	$\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$	+0.77
HCl	$[\text{FeCl}_6]^{4-}/[\text{FeCl}_6]^{3-}$	+0.53
$\text{H}_3\text{PO}_4$	$[\text{Fe}(\text{PO}_4)_2]^{4-}/[\text{Fe}(\text{PO}_4)_2]^{3-}$	+0.41
HF	$[\text{FeF}_6]^{4-}/[\text{FeF}_6]^{3-}$	+0.40
KCN	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$	+0.36
ЭДТА	$[\text{FeY}]^{2-}/[\text{FeY}]^{-}$	+0.12
$\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$	$[\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]^{4-}/[\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]^{3-}$	-0.02
1,10-фенантролин	$[\text{Fe}(\text{Phen})_3]^{2+}/[\text{Fe}(\text{Phen})_3]^{3+}$	+1.12
дипиридил	$[\text{Fe}(\text{DP})_3]^{2+}/[\text{Fe}(\text{DP})_3]^{3+}$	+1.10
2,4,6-трипиридил-триазин	$[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{2+}/[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$	+0.7

Из таблицы 3 видно, что в зависимости от лиганда ОВ свойства комплексов железа могут сильно варьироваться. Результаты, полученные этим методом с 2,4,6- трипиридил-триазином, 1,10-фенантролином и цианидами, очевидно, будут отличаться друг от друга.

Для реализации сигналообразующей реакции в нейтральной среде используемые комплексы должны быть достаточно устойчивы. Расчеты условных констант устойчивости показывают, что комплексы железа с фенантролином, дипиридилом и трипиридил-триазином относительно устойчивы только в кислых средах, тогда как комплекс цианидов как с двух-, так и с трех валентным железом достаточно устойчив ( $\beta > 10^8$ ) в широкой области pH, включая нейтральную среду (рисунок 3). К преимуществам выбранной системы можно отнести высокую электрохимическую обратимость. Использование при исследовании антиоксидантных свойств веществ одновременно окисленной и восстановленной форм открывает широкие возможности для применения простого, дешевого, экспрессного потенциометрического способа измерения.

Изменение соотношения концентраций окисленной и восстановленной форм системы, содержащей  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , являющегося результатом протекания реакции переноса электрона с исследуемого АО на окисленный компонент системы (реакция 1), будет сопровождаться изменением потенциала, которое можно достаточно легко зафиксировать.



где АО – антиоксидант, АО<sub>Ох</sub> – продукт окисления антиоксиданта; n, q – стехиометрические коэффициенты реакции.

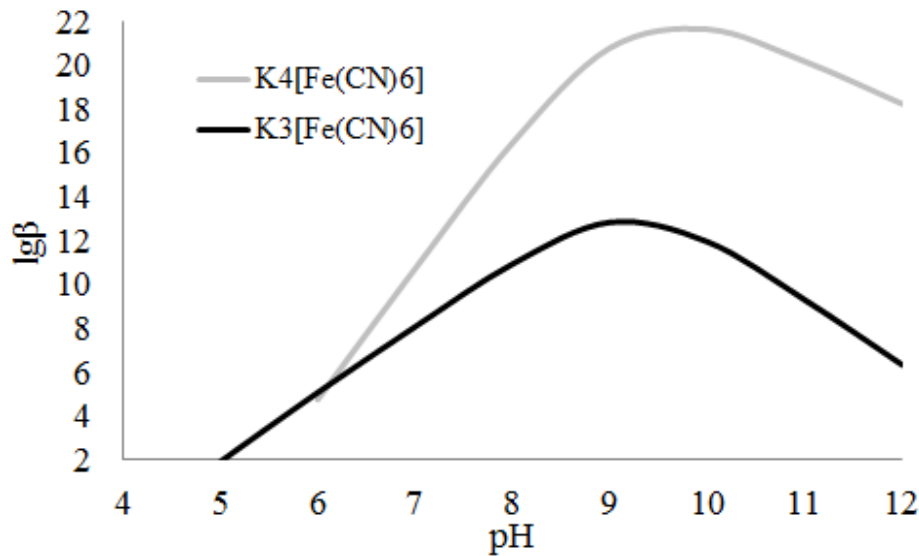


Рисунок 3 - Зависимость условной константы устойчивости комплексов  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  и  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  от pH

Потенциал системы подчиняется уравнению Нернста, поэтому до введения анализируемого образца может быть выражен уравнением:

$$E = E^0 + b \cdot \lg \frac{C_{\text{Fe(III)}}^0}{C_{\text{Fe(II)}}^0} \quad (2)$$

где  $b = 2.3 \cdot RT/nF$ ; E – потенциал в системе до введения анализируемого образца, мВ;  $C_{\text{Fe(III)}}^0$ ,  $C_{\text{Fe(II)}}^0$  – концентрации окисленной и восстановленной форм системы, М.

После завершения реакции окисленного компонента системы с исследуемыми АО потенциал системы будет определяться как:

$$E_1 = E^0 + b \cdot \lg \frac{C_{\text{Fe(III)}}^0 - \sum C_{\text{АО}_{1/z}}}{C_{\text{Fe(II)}}^0 + \sum C_{\text{АО}_{1/z}}} \quad (3)$$

где  $E_1$  – измеряемый потенциал в системе после завершения реакции окисленного компонента системы с исследуемыми АО, мВ;  $\sum C_{\text{АО}_{1/z}}$  – суммарное содержание АО в исследуемом образце, моль-экв/дм<sup>3</sup>.

Суммарное содержание АО в исследуемом образце будет соответствовать интегральному параметру АОЕ исследуемого раствора. Таким образом, изменение потенциала ( $E_1 - E$ ) служит источником информации об АОЕ:

$$\text{АОЕ} = \frac{C_{\text{Fe(III)}}^0 - \alpha \cdot C_{\text{Fe(II)}}^0}{1 + \alpha} \quad (4)$$

$$\text{где } \alpha = \frac{C_{\text{Fe(II)}}^0}{C_{\text{Fe(III)}}^0} \cdot 10^{(E_1 - E)nF/RT}$$

Стехиометрический коэффициент реакции рассчитывали, как

$$n = \frac{AOE}{C}, \quad (5)$$

где  $n$  – стехиометрический коэффициент уравнения 1; АОЕ – антиоксидантная емкость, рассчитанная по уравнению 4 в моль-экв/дм<sup>3</sup>;  $C$  – концентрация АО в моль/дм<sup>3</sup>.

### ***Обоснование и выбор условий проведения измерений АОЕ***

Критериями для выбора рабочего электрода являлись:

1. диапазон потенциалов, измерение которого обеспечивает материал электрода;
2. материал электрода должен обеспечивать Нернстовскую зависимость изменения потенциала системы от соотношения форм системы;
3. быстрое установление равновесного потенциала и его стабильность;
4. подчинение термоактивационным закономерностям.

Из литературных данных известно, что к наиболее подходящим электродам для измерения ОВП относятся электроды, выполненные из платиновых, золотых и стеклоуглеродных материалов. При этом платиновые электроды (ПЭ) используют для измерения ОВП в диапазоне от –0.1 до +0.9 В, электроды из золота – от –0.1 до +0.3 В, электроды из стеклоуглерода (СУЭ) – от –0.9 до +0.8 В. Показано, что на ПЭ установление потенциала происходит значительно быстрее (~10 сек.) по сравнению со СУЭ (~5 мин.). Также в пользу платинового электрода при выборе существенную роль сыграло отсутствие дрейфа и высокая стабильность потенциала по сравнению со СУЭ.

Одной из главных задач при разработке новых методик определения АОЕ является интерпретация получаемых данных по отношению к живым организмам, поэтому фоновый раствор должен обеспечивать условия среды, близкие к физиологическим. Особенности строения АО, функциональные группы которых содержат подвижный атом водорода, могут приводить к изменению кислотности среды при протекании реакции АО с модельным окислителем. Кроме того, многие объекты, такие как экстракты растительного происхождения, например, соки фруктов, имеют кислую среду. Поэтому при выборе фонового раствора необходимо принять во внимание возможность поддержания постоянства рН системы. В качестве фонового раствора выбран К-На-фосфатный буферный раствор с рН 7.2-7.4 с суммарным содержанием солей 0.067 М, обеспечивающим высокую ионную силу ( $I=0.120$ ) и буферную емкость ( $B=0.031$  М), достаточную для компенсации смещения рН.

Возможность варьирования концентрациями и соотношением окисленной и восстановленной форм выбранной системы, а также степенью разбавления пробы позволяет подобрать оптимальные условия для исследования модельных растворов АО и анализа различных реальных объектов. При выборе концентрации компонентов системы и степени разбавления исследуемых образцов руководствовались следующими критериями:



1. Величина сдвига потенциала системы, обусловленная протеканием реакции АО с окисленным компонентом системы должна составлять не менее 20 мВ;
2. Высокая скорость этой реакции;
3. Быстрое установление химического равновесия после прохождения реакции, а следовательно, и установление потенциала системы;
4. Измеряемый потенциал системы постоянного состава должен быть стабилен во времени.

Математические расчеты и экспериментальные данные показали, что 50-100 кратный избыток окисленного компонента системы обеспечивает соответствие заявленным выше критериям. Данные условия подходят для исследования индивидуальных АО, растительных экстрактов, пищевых продуктов.

### ***Исследование взаимодействия водорастворимых модельных АО природного происхождения с выбранным окислителем***

В качестве модельных АО был выбран ряд природных веществ, отвечающих за антиоксидантные свойства объектов растительного происхождения (аскорбиновая кислота, гидрохинон, катехол, пирогаллол, кофейная кислота, рутин, кверцетин и др.) и биологических объектов (цистеин, глутатион, мочева кислота, аскорбиновая кислота).

В таблице 4 приведены стехиометрические коэффициенты  $n$  реакции (1) АО с гексацианоферратом (III) калия, рассчитанные по уравнению (5) для различных концентраций АО. Приведённые стехиометрические коэффициенты в целом соответствуют числу антиоксидантных групп в соединении, что подтверждает корректность использования метода, выбранных единиц измерения, а также правильность сформулированных выше требований.

Несовпадение экспериментального и теоретического значения  $n$  в случае с пирогаллолом, пирокатехином и галловой кислотой может быть обусловлено одновременным протеканием конкурирующих реакций комплексообразования. В случае с рутином несовпадение экспериментального и теоретического  $n$  можно объяснить стерическим фактором.

Наличие функциональной взаимосвязи структура АО – АОЕ позволит исследовать антиоксидантные свойства как уже известных соединений, так и новых синтезированных.

В таблице 5 приведены результаты определения АОЕ модельных растворов некоторых антиоксидантов методом «введено-найдено». Полученные величины имеют значения, близкие к 100%,  $S_T$  не превышает 5 %. Предел обнаружения, определенный по 3 $\sigma$ - критерию составил  $3.5 \cdot 10^{-6}$  моль- экв/дм<sup>3</sup>.

Таким образом, данные, полученные в экспериментах по исследованию стехиометрии реакции (1) и по определению АОЕ методом «введено-найдено» на модельных растворах, позволяют сделать вывод о том, что предложенный подход с использованием системы

$K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  обеспечивает возможность количественной оценки АОЕ водорастворимых веществ природного происхождения.

Таблица 4 - Значения стехиометрических коэффициентов реакции АО с гексацианоферратом (III) калия для различных концентраций АО (М-экв)\*

АО	$n_{\text{эксп}}$			$\bar{n}_{\text{эксп}}$	$n_{\text{теор}}$
	$1 \cdot 10^{-4}$ моль- экв/дм <sup>3</sup>	$3 \cdot 10^{-4}$ моль- экв/дм <sup>3</sup>	$5 \cdot 10^{-4}$ моль- экв/дм <sup>3</sup>		
Цистеин	1.2	1.1	1.1	1.1	1
Глутатион	1.0	0.9	1.0	1.0	1
Мочевая кислота	1.9	1.8	2.0	1.9	2
Аскорбиновая кислота	1.8	2.0	1.9	1.9	2
Гидрохинон	2.1	1.8	2.0	2.0	2
Пирокатехин	4.8	4.8	5.0	4.9	2
Пирогаллол	5.0	5.1	5.3	5.2	2, 4
Кофейная кислота	1.3	1.4	2.0	1.6	2
Рутин	2.8	3.0	2.6	2.8	4
Кверцетин	3.7	4.2	3.8	3.9	2, 4
(+)Катехин	3.9	3.7	4.1	3.9	4
Галловая кислота	4.6	5.2	5.1	5.0	2

\*  $n_{\text{эксп}}$  – экспериментально полученное значение;  $\bar{n}_{\text{эксп}}$  – среднее экспериментально полученное значение;  $n_{\text{теор}}$  – ожидаемое значение, связанное со структурой АО

Таблица 5 - АОЕ некоторых АО методом «введено-найдено» (n=5, P=0.95)

АО	Введено ( $C_1$ ), ммоль-экв/дм <sup>3</sup>	Найдено		$R = \frac{C_2}{C_1} \cdot 100$ , %
		АОЕ ( $C_2$ ), ммоль-экв/дм <sup>3</sup>	$S_r$	
Аскорбиновая кислота	10.0	10.6	0.01	106
	20.0	19.1	0.05	98
Кофейная кислота	10.0	10.4	0.04	104
	20.0	21.6	0.03	108
Кверцетин	20.0	18.6	0.01	93
	40.0	37.9	0.02	95

Следующим важным условием корректной реализации предложенного подхода интегральной оценки АОЕ, является достаточно большая скорость реакции окислителя с основными АО. Регистрация кинетических кривых зависимости изменения потенциала во времени дает возможность оценить период полупревращения АО в реакции с модельным окислителем. На рисунке 4 приведены типичные кинетические кривые изменения потенциала системы при протекании реакции АО с  $K_3[Fe(CN)_6]$ .

В таблице 6 приведены значения константы скорости реакции АО с гексацианоферратом (III) калия, рассчитанные из кинетических кривых в условиях избытка окислителя.

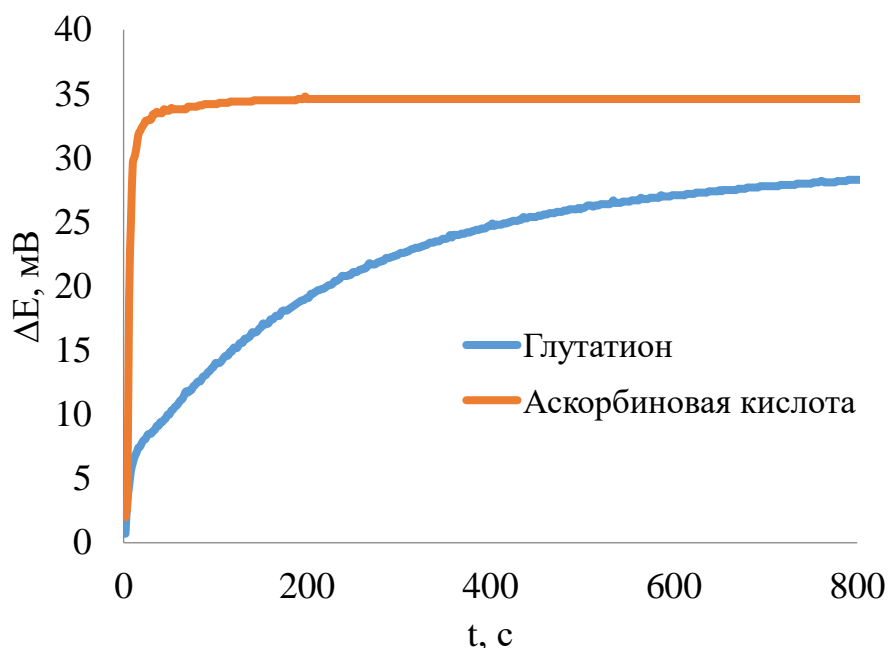


Рисунок 4 - Кинетические кривые изменения ОВП системы от времени реакции при взаимодействии АО с  $K_3[Fe(CN)_6]$ . Исходная концентрация АО  $2 \cdot 10^{-4}$  моль-экв/дм<sup>3</sup>

Таблица 6 - Константы скорости реакций АО с  $K_3[Fe(CN)_6]$  ( $P=0,95$ ,  $n=5$ )

Вещество	k, 1/с				$k_{cp} \pm \delta$ , 1/с	$S_r$
	$2 \cdot 10^{-4}$ моль- экв/дм <sup>3</sup>	$5 \cdot 10^{-4}$ моль- экв/дм <sup>3</sup>	$2 \cdot 10^{-3}$ моль- экв/дм <sup>3</sup>	$5 \cdot 10^{-3}$ моль- экв/дм <sup>3</sup>		
Пирогаллол	0.69	0.69	0.69	0.62	$0.62 \pm 0.08$	0.09
Катехол	0.23	0.23	0.35	0.17	$0.26 \pm 0.07$	0.18
Кофейная кислота	0.23	0.23	0.23	0.23	$0.21 \pm 0.02$	0.06
Гидрохинон	0.23	0.23	0.23	0.14	$0.21 \pm 0.05$	0.18
Аскорбиновая кислота	0.23	0.17	0.17	0.23	$0.21 \pm 0.02$	0.08
Рутин	0.173	0.231	0.139	-	$0.170 \pm 0.003$	0.010
Цистеин	0.17	0.08	-	-	$0.11 \pm 0.09$	0.42
Мочевая кислота	0.05	0.05	-	-	$0.06 \pm 0.02$	0.12
Глутатион	0.0046	0.0042	-	-	$0.0045 \pm 0.0002$	0.019

Показано, что в данных условиях период полупревращения не зависит от начальной концентрации антиоксидантов, поэтому константу скорости реакции находили, пользуясь соотношением (6) для реакций псевдопервого порядка:

$$k = \frac{\ln 2}{\tau_{1/2}}, \quad (6)$$

где  $\tau_{1/2}$  - период полупревращения исследуемого АО, с; k – константа скорости реакции АО с гексацианоферратом (III) калия, 1/с.

Приведённые данные свидетельствуют о том, что реакция переноса электрона с АО на гексацианоферрат (III) калия является достаточно

быстрой, что отвечает сформулированному требованию и позволяет считать потенциометрическую методику определения АОЕ экспрессной и применимой для поточных масштабных исследований.

### **Оценка влияния хелатирующей способности АО на определение АОЕ**

Несмотря на высокие значения константы устойчивости комплексов  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ , значения показателей констант устойчивости для некоторых природных фенолов составляют от 13 до 46 (таблица 1.5 диссертации), что свидетельствует об их высокой комплексообразовательной способности. Это может привести к возникновению конкурирующих реакций образования комплексов железа с полифенолами сопровождающихся полным или частичным разрушением комплекса  $K_3[Fe(CN)_6]$  и, соответственно, оказать влияние на результат определения АОЕ. Возможность протекания конкурирующих реакций комплексообразования оценивали при помощи расчета условных констант устойчивости и метода циклической вольтамперометрии.

На рисунке 5 приведены зависимости условных констант устойчивости от pH для комплексов железа с пирокатехином и галловой кислотой в сравнении с гексацианоферратом. Расчет условных констант показывает, что комплекс железа с пирокатехином более устойчив, чем гексацианоферрат в области pH от 2 до 9, а с галловой кислотой от 2 до 7.

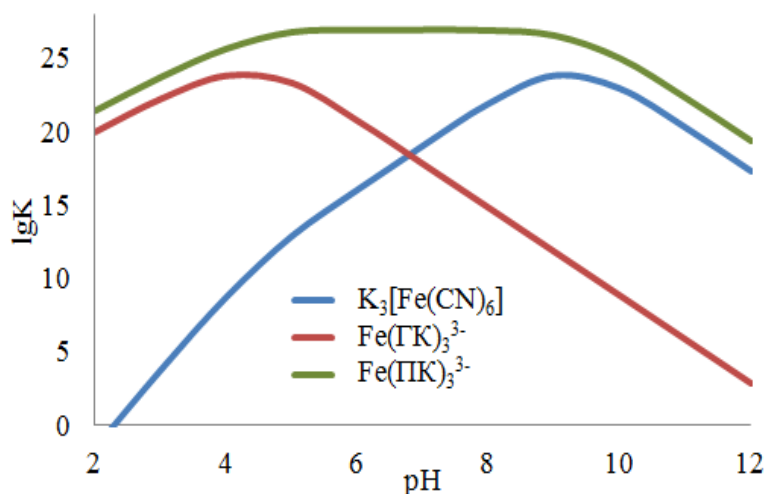


Рисунок 5 - Зависимость условной константы устойчивости комплексов железа с пирокатехином (ПК), с галловой кислотой (ГК),  $K_3[Fe(CN)_6]$  от pH

На ЦВА рисунка 6 наблюдается появление нового пика при добавлении к раствору гексацианоферрата пирокатехина, отличного от пиков гексацианоферрата и пирокатехина (зарегистрированных по отдельности), который при повышении pH сдвигается в отрицательную сторону и постепенно сливается с пиком гексацианоферрата. Аналогичная ситуация в кислой среде наблюдается и в случае добавления галловой кислоты к раствору гексацианоферрата. При pH 2-4 возникает пик, который при увеличении pH до 7 сливается с пиком гексацианоферрата, а при дальнейшем увеличении pH до 10 снова сдвигается в положительную область потенциалов. Экспериментальные данные, полученные методом ЦВА полностью согласуются с расчетом условных констант устойчивости.

Такой характер изменения вольтамперограмм может свидетельствовать о протекании конкурирующих реакций комплексообразования. Количественный эффект конкурирующего комплексообразования на значение АОЕ оценить не представляется возможным, можно только говорить о том, что протекание конкурирующих реакций имеет место в случае некоторых полифенолов с высокими значениями константы устойчивости их комплексов с железом. С одной стороны, данные исследования объясняют завышенные значения стехиометрических коэффициентов для пирокатехина, пирогаллола и галловой кислоты (таблица 5). С другой стороны, образование прочных комплексов с ионами железа является одним из механизмов антиоксидантного действия веществ в организме человека.

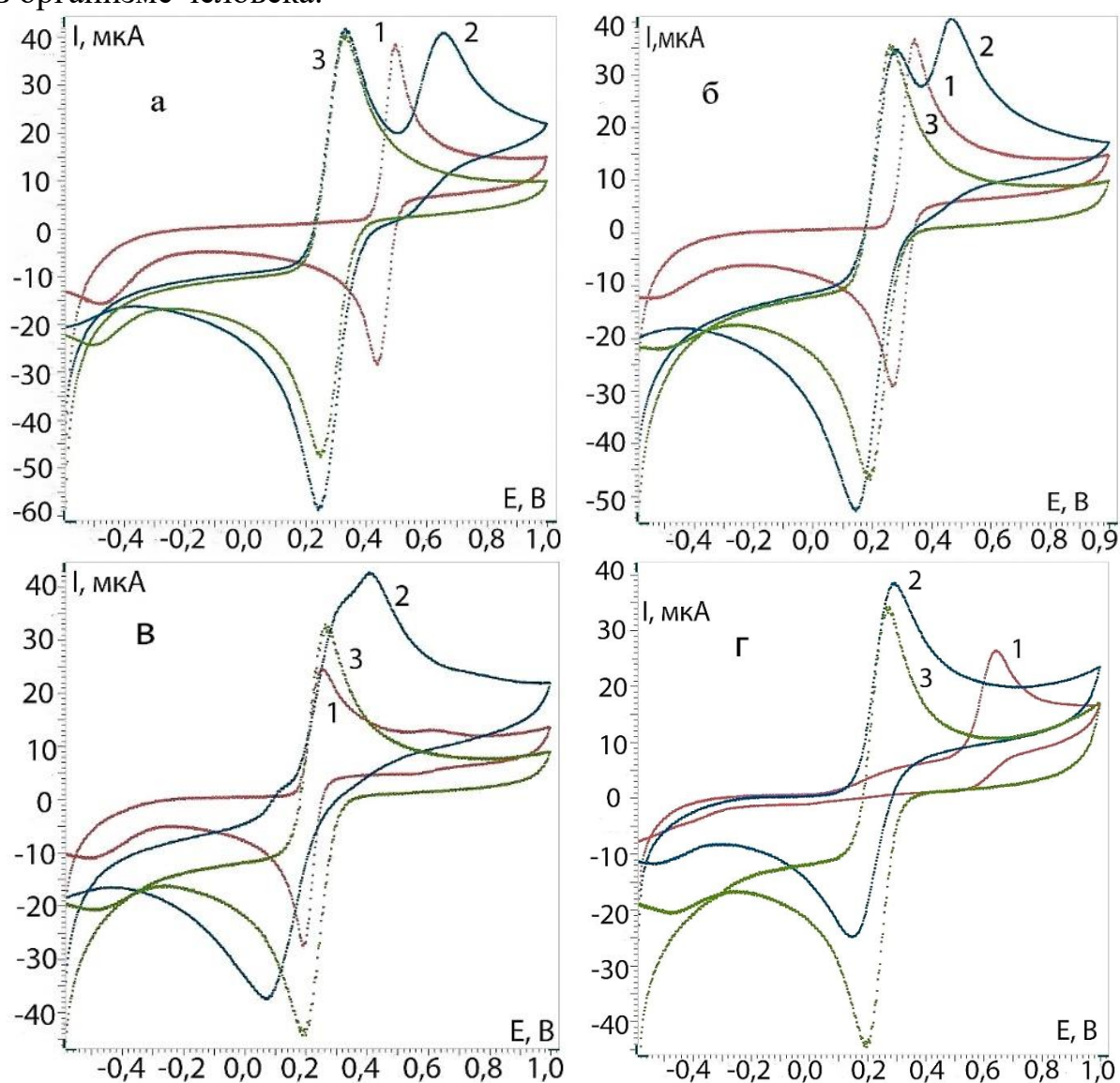


Рисунок 6 - ЦВА 1 – пирокатехина, 2 - гексацианоферрата с пирокатехином, 3 - гексацианоферрата при рН 2 (а), 5 (б), 7 (в), 10 (г)

Таким образом, при потенциометрическом определении АОЕ в ряде случаев регистрируется суммарный эффект антиоксидантного действия, связанный как с переносом электрона с АО на гексацианоферрат, так и с

переносом пары электронов с образованием ковалентной связи по донорно-акцепторному механизму.

### Потенциометрическое определение интегрального параметра АРЕ, основанного на реакции переноса атома водорода

В подходах, основанных на реакциях с переносом атома водорода, измеряется способность АО «гасить/перехватывать» свободные радикалы. Поскольку в организме образование свободных радикалов происходит непрерывно, то для разработки методик, основанных на реакции переноса атома водорода лучше использовать не стабильные радикалы, а радикал – генерирующие системы. Электронно-протонный перенос с молекулы АО на радикал также должен сопровождаться изменением ОВП системы, что позволяет использовать потенциометрию в качестве способа регистрации этих процессов.

Требования к модели окислителя (радикала) в реакции электронно-протонного переноса можно сформулировать следующим образом:

- источником радикалов должна являться радикал-генерирующая система;
- генерация радикалов должна реализовываться в условиях, близких к физиологическим;
- образующиеся радикалы должны быть схожи по природе и строению с радикалами, образующимися в организме;
- доступность источника радикалов;
- должны быть известны кинетические параметры реакции генерирования радикалов в условиях проведения анализа;
- электронно-протонный перенос с молекулы АО на радикал также должен сопровождаться изменением ОВП системы;
- должна быть реализуемой возможность получать результат в универсальных единицах измерения, например, М-экв;
- должна быть обеспечена возможность анализировать широкий круг объектов, в том числе окрашенных.

В качестве источника радикалов выбран азоинициатор 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорида (рисунок 7), успешно используемый в хемилюминесцентных методах исследования антирадикальных свойств и удовлетворяющий первым четырем из перечисленных выше требований.

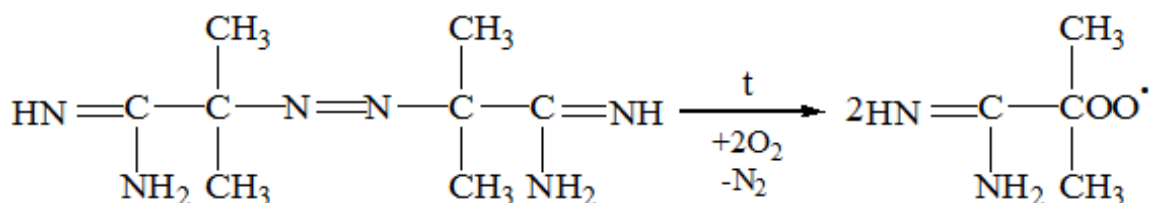


Рисунок 7 - Схема распада ААРН

Процессы электронно-протонного переноса (ингибирования радикала) могут быть охарактеризованы параметром антирадикальной емкости, который можно рассчитать следующим образом:

$$\text{APE} = f[\text{InH}] = k_i \cdot [\text{R-R}] \cdot \tau, \quad (7)$$

где АРЕ – антирадикальная емкость, М-экв;  $\tau$  – период индукции, с (время за которое АО полностью израсходуется в реакции с радикалами);  $[InH]$  – концентрация антиоксиданта, М;  $k_i$  – константа скорости генерирования радикалов,  $s^{-1}$ ;  $[R-R]$  – концентрация инициатора радикалов, М;  $f$  – коэффициента ингибирования, который показывает, сколько обрывов радикальных цепей приходится на одну молекулу ингибитора.

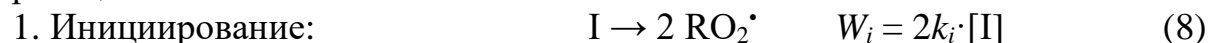
Таким образом, для определения АРЕ необходимо обладать информацией как о (I) времени полного расходования АО, так и о (II) константе скорости генерирования радикалов.

### ***Исследование кинетики генерирования свободных радикалов потенциометрическим методом***

Данные, имеющиеся в литературе о скорости и константе скорости генерирования пероксильных радикалов, либо представлены в узком диапазоне рН и температур, либо недостаточно хорошо согласуются между собой. Для получения наиболее достоверных результатов антирадикальных свойств соединений необходимо владеть информацией о реальной скорости или константе скорости генерирования радикалов в конкретных условиях, в которых реализуется данная реакция.

Для исследования кинетики реакции генерирования пероксильных радикалов предложен новый подход с использованием восстановленной формы металла в составе комплексного соединения  $[Me^{Red}L]$  в качестве акцептора радикалов и потенциометрической детекцией.

Кинетическая схема взаимодействия  $[Me^{Red}L]$  с радикалами  $RO_2^{\cdot}$ , образующимися при распаде инициатора I, включает в себя следующие реакции:



Новый подход для определения кинетических параметров реакции генерирования пероксильных радикалов основан на взаимодействии последних с восстановленной формой металла в составе комплексного соединения  $[Me^{Red}L]$ , результатом которой является образование обратимой системы типа  $[Me^{Ox}L]/[Me^{Red}L]$ . ОБП такой системы подчиняется уравнению Нернста. Сдвиг потенциала системы будет зависеть от количества генерируемых радикалов, вступивших во взаимодействие с  $[Me^{Red}L]$ . Значение потенциала системы  $[Me^{Red}L]/[Me^{Ox}L]$  к моменту времени  $t_1$  можно выразить согласно уравнению Нернста:

$$E_{[Me^{Ox}L]/[Me^{Red}L]}^{t_1} = E_{[Me^{Ox}L]/[Me^{Red}L]}^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C([Me^{Ox}L])^{t_1}}{C([Me^{Red}L])^0 - C([Me^{Ox}L])^{t_1}} \quad (11)$$

В момент времени  $t_2 = h \cdot t$ , учитывая, что скорость генерирования остается постоянной, потенциал равен:

$$E_{[Me^{Ox}L]/[Me^{Red}L]}^{t_2} = E_{[Me^{Ox}L]/[Me^{Red}L]}^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{h \cdot C([Me^{Ox}L])^{t_1}}{C([Me^{Red}L])^0 - h \cdot C([Me^{Ox}L])^{t_1}} \quad (12)$$



Расчет скорости генерирования проводили по уменьшению концентрации акцептора  $[\text{Me}^{\text{Red}}\text{L}]$  в каждый момент времени по формуле (13) исходя из разности потенциалов в момент времени  $t_1$  и  $t_2$ .

$$C([\text{Me}^{\text{Red}}\text{L}])^{t_2} = C([\text{Me}^{\text{Red}}\text{L}]^0) - \frac{C([\text{Me}^{\text{Red}}\text{L}]^0)(h - \varphi)}{h \cdot (1 - \varphi)} \quad (13)$$

где  $\varphi = 10^{(E_1 - E_2) \cdot n \cdot F / R \cdot T \cdot 2,303}$ ;  $C([\text{Me}^{\text{Red}}\text{L}]^0)$  - исходная концентрация акцептора, М;  $C([\text{Me}^{\text{Red}}\text{L}]^{t_2})$  - концентрация акцептора в момент времени  $t_2$ , М;  $E_1$  - потенциал, измеренный через промежуток времени  $t_1 = t$ , В;  $E_2$  - потенциал, измеренный через промежуток времени  $t_2 = ht$ , В;  $h$  - отношение  $t_1$  к  $t_2$ .

Скорость генерирования ( $W_i$ ) пероксильных радикалов определяли по формуле:

$$W_i = d\{C([\text{Me}^{\text{Red}}\text{L}])\}/dt, \quad (14)$$

где  $C([\text{Me}^{\text{Red}}\text{L}])$  - концентрация акцептора, М.

Константу скорости генерирования пероксильных радикалов ( $k_i$ ) рассчитывали как:

$$k_i = \frac{W_i}{2 \cdot C(\text{AAPH})} \quad (15)$$

где  $C(\text{AAPH})$  - концентрация инициатора ААРН, М.

При выборе реагента в качестве акцептора радикалов руководствовались следующими требованиями:

- Высокие значения условной константы устойчивости комплексов при  $\text{pH}=7$ ;
- Термодинамическая вероятность протекания реакции между генерируемыми радикалами и реагентом ( $E_{\text{RO}_2^\bullet} > E_{\text{Me}^{\text{Red}}\text{L}}$ ) в условиях, близких к физиологическим;
- Образующаяся в результате реакции с пероксильными радикалами ОВ система типа  $[\text{Me}^{\text{Ox}}\text{L}]/[\text{Me}^{\text{Red}}\text{L}]$  должна быть обратима;
- Скорость взаимодействия пероксильных радикалов с реагентом должна быть несоизмеримо выше, чем скорость образования этих радикала;
- Коэффициент ингибирования акцептора должен равняться 1.

В качестве возможных акцепторов пероксильных радикалов были исследованы комплексы железа. Комплексные соединения железа широко применяются в электрохимических методах анализа, в частности, в потенциометрии. Поскольку ОВП комплексного соединения зависит от природы лиганда, входящего в его состав (Таблица 3), это дает возможность выбрать соединение с необходимым потенциалом. При ОВ превращении ионов железа, входящих в комплексное соединение, происходит перенос одного электрона, что делает эти соединения удобными при использовании в качестве акцептора радикалов, т.к. одноэлектронный перенос будет обеспечивать обрыв одной радикальной цепи.

Данных об ОВП системы ААРН в литературе не приводится. Известно, что стандартные электродные потенциалы свободных радикалов, в т.ч. пероксильных, имеют значения от 0.7 В до 2.4 В (Таблица 1), что дает основание считать их веществами с ярко выраженными свойствами окислителя. Исходя из значений стандартных потенциалов системы



$\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  в составе различных комплексных соединений (таблица 3) в качестве акцептора пероксильных радикалов в дальнейших исследованиях использовали комплекс железа (II) с ЭДТА  $[\text{Fe(II)-EDTA}]^{2-}$  и  $\text{K}_4[\text{Fe(CN)}_6]$ . С целью учета конкурирующих кислотно-основных взаимодействий, рассчитаны условные константы устойчивости комплексов при разных значениях pH раствора. Согласно расчетам, оба комплекса с железом (II) и (III) имеют значения условной константы устойчивости более  $10^8$  при pH=7.

На рисунке 8 приведены графики изменения потенциала системы от времени реакции 8. Зависимости изменения концентрации комплексов  $[\text{Fe(II)-EDTA}]^{2-}$  и  $\text{K}_4[\text{Fe(CN)}_6]$  во времени, рассчитанные по формулам 13-14, имеют практически линейный вид ( $R^2=0.998$  и  $0.996$  соответственно), что дает возможность рассчитывать скорость генерирования пероксильных радикалов по расходу акцептора.

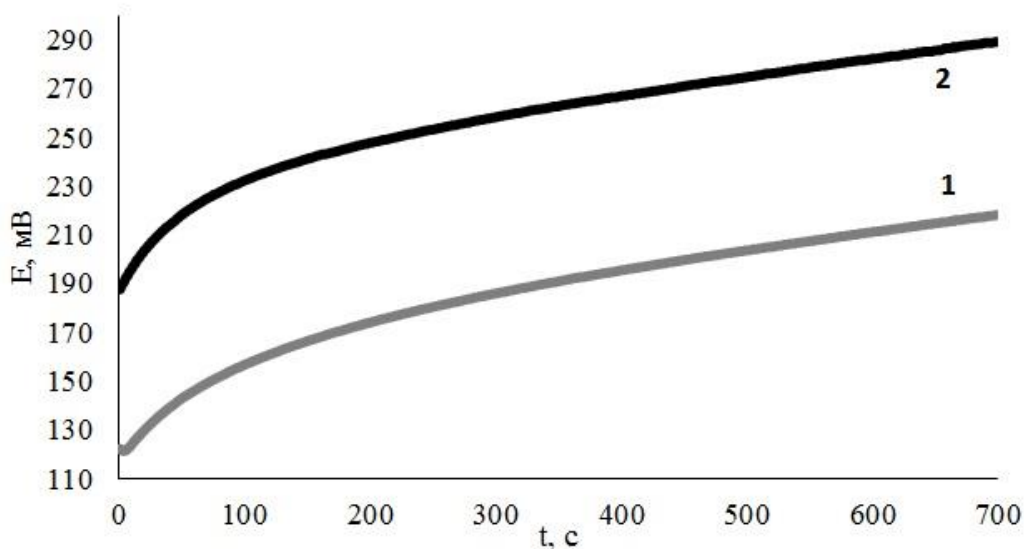


Рисунок 8 - Зависимости потенциала системы от времени, полученные при использовании 1 -  $[\text{Fe(II)-EDTA}]^{2-}$ , 2 -  $\text{K}_4[\text{Fe(CN)}_6]$

В таблице 7 приведены значения величины скорости и константы скорости генерирования пероксильных радикалов, рассчитанные по изменению концентрации  $[\text{Fe(II)-EDTA}]^{2-}$  и  $\text{K}_4[\text{Fe(CN)}_6]$  в реакции 10.

Важно отметить, что данные, полученные с использованием  $[\text{Fe(II)-EDTA}]^{2-}$  недостаточно воспроизводимы ( $k_i \cdot 10^{-6} = 1.00 \pm 0.1$ ), а значение константы скорости генерирования ( $k_i$ ) зависит от концентрации акцептора. Это может быть связано с низкой электрохимической обратимостью системы  $[\text{Fe(II)-EDTA}]/[\text{Fe(II)-EDTA}]^{2-}$ , выявленной методом ЦВА. Скорость генерирования, измеренная с использованием  $\text{K}_4[\text{Fe(CN)}_6]$  в изученных условиях, не зависит от концентрации акцептора, следовательно порядок реакции по  $\text{K}_4[\text{Fe(CN)}_6]$  можно принять равным нулю, а полученные константы скорости генерирования хорошо воспроизводятся при разных концентрациях акцептора ( $k_i \cdot 10^{-6} = 0.92 \pm 0.06$  ( $S_r=0.04$ )). Таким образом, в качестве акцептора радикалов выбран гексацианоферрат калия, как наиболее полно удовлетворяющий перечисленным выше требованиям.

Таблица 7 - Скорость ( $W_i$ ) и константа скорости генерирования ( $k_i$ )  $RO_2^\bullet$ , рассчитанные по изменению концентрации акцептора ( $C_{AAPH}=0.1$  М,  $T=37^\circ C$ ) ( $n=5$ ,  $P=0.95$ )

Соединение	C, mM	$W_i$ , $10^{-7} M \cdot c^{-1}$	$S_r$	$k_i$ , $10^{-6} c^{-1}$	$\bar{k}_i$ , $10^{-6} c^{-1}$
[Fe(II)-EDTA] $^{2-}$	0.20	$2.4 \pm 0.2$	0.07	$1.18 \pm 0.08$	$1.00 \pm 0.1$ ( $S_r = 0.13$ )
	0.25	$1.9 \pm 0.2$	0.08	$0.97 \pm 0.08$	
	0.30	$1.7 \pm 0.1$	0.08	$0.86 \pm 0.07$	
(K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ])	0.15	$1.7 \pm 0.1$	0.05	$0.87 \pm 0.07$	$0.92 \pm 0.06$ ( $S_r = 0.04$ )
	0.20	$1.9 \pm 0.2$	0.06	$0.94 \pm 0.09$	
	0.25	$1.8 \pm 0.1$	0.04	$0.88 \pm 0.06$	
	0.30	$1.9 \pm 0.1$	0.03	$0.97 \pm 0.05$	

Известно, что в отсутствие акцептора радикалов, устанавливается стационарная концентрация радикалов:

$$[RO_2^\bullet] = (W_i/2k_2)^{0.5} \quad (16)$$

В присутствии K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] радикалы вступают в реакции рекомбинации и взаимодействия с реагентом. В стационарных условиях скорость инициирования радикалов равна скорости их расходования:

$$W_i = 2k_2 \cdot [RO_2^\bullet]^2 + k_3 \cdot [RO_2^\bullet][K_4[Fe(CN)_6]] \quad (17)$$

При высокой концентрации K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], когда выполняется условие:

$$k_3 \cdot [RO_2^\bullet][K_4[Fe(CN)_6]] \gg 2k_2 \cdot [RO_2^\bullet]^2 \quad (18)$$

практически все образующиеся радикалы реагируют с K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]. При этом квадратичной гибелью  $RO_2^\bullet$  можно пренебречь, и скорость расходования K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] равна скорости инициирования:

$$-d[K_4[Fe(CN)_6]] / dt = d[K_3[Fe(CN)_6]] / dt = W_i \quad (19)$$

Таким образом, при расчете скорости генерирования радикалов необходимо соблюсти следующие условия:

- концентрация K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] должна быть достаточной для подавления квадратичной гибели радикалов;
- скорость взаимодействия пероксильных радикалов с K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] должна быть несоизмеримо выше скорости генерирования самих радикалов.

Концентрацию K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], необходимую для подавления квадратичной гибели радикалов можно оценить, исходя из выражений (17-18), через величину  $k_3$ , которая характеризует активность K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] в реакции с оксидантом  $RO_2^\bullet$ :

$$[K_4[Fe(CN)_6]] \gg 2k_2 \cdot [RO_2^\bullet] / k_3 \quad (20)$$

$$[K_4[Fe(CN)_6]] \gg (2k_2 \cdot W_i)^{0.5} / k_3 \quad (21)$$

Определить величину  $k_3$  можно из анализа кинетических кривых расходования K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] при относительно высоких значениях скорости генерирования и малых концентрациях K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], когда радикалы вступают, преимущественно, в реакции рекомбинации. Скорость расходования K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] в этом случае равна:

$$-d[K_4[Fe(CN)_6]] / dt = a[K_4[Fe(CN)_6]] \quad (22)$$

Интегральные кинетические кривые описываются уравнением 1-го порядка:

$$[K_4[Fe(CN)_6]] = [K_4[Fe(CN)_6]]_0 \exp(-a \cdot t) \quad (23)$$

$$\ln [K_4[Fe(CN)_6]] = \ln [K_4[Fe(CN)_6]]_0 - a \cdot t, \quad (24)$$

где  $a = k_3 \cdot [\text{RO}_2^*]$ .

При  $[\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]] \rightarrow 0$ , концентрация  $[\text{RO}_2^*] \rightarrow (W_i/2k_2)^{0.5}$ , а величина  $a \rightarrow k_3 \cdot (W_i/2k_2)^{0.5}$ .

Экспериментально установлено, что скорость генерирования и константа скорости генерирования не зависят от концентрации реагента в интервале (0.01 – 0.2) мМ для 0.05 М ААРН и (0.04 – 0.5) мМ для 0.1 М ААРН, следовательно, порядок реакции по  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  можно принять равным нулю.

На рисунке 9 приведена зависимость начального наклона полулогарифмических анаморфоз кривых изменения концентрации  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  от исходной концентрации  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . Кривые линеаризируются в полулогарифмических координатах и тангенс угла наклона анаморфоз увеличивается с уменьшением концентрации  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  до предельного значения 0.0334 для 0.1 М ААРН и 0.0289 для 0.05 М ААРН. Используя значение константы рекомбинации, приведенное в литературе, равное  $2k_2 = 5.2 \cdot 10^4 \text{ (M} \cdot \text{c)}^{-1}$  можно оценить значение  $k_3 = (1.9 \pm 0.2) \cdot 10^4 \text{ (M} \cdot \text{c)}^{-1}$ . Достаточно высокое значение  $k_3$  указывает на эффективность выбранного реагента  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  в качестве акцептора радикалов, а также на то, что скорость взаимодействия пероксильных радикалов с  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  несоизмеримо выше, чем скорость образования самих радикалов.

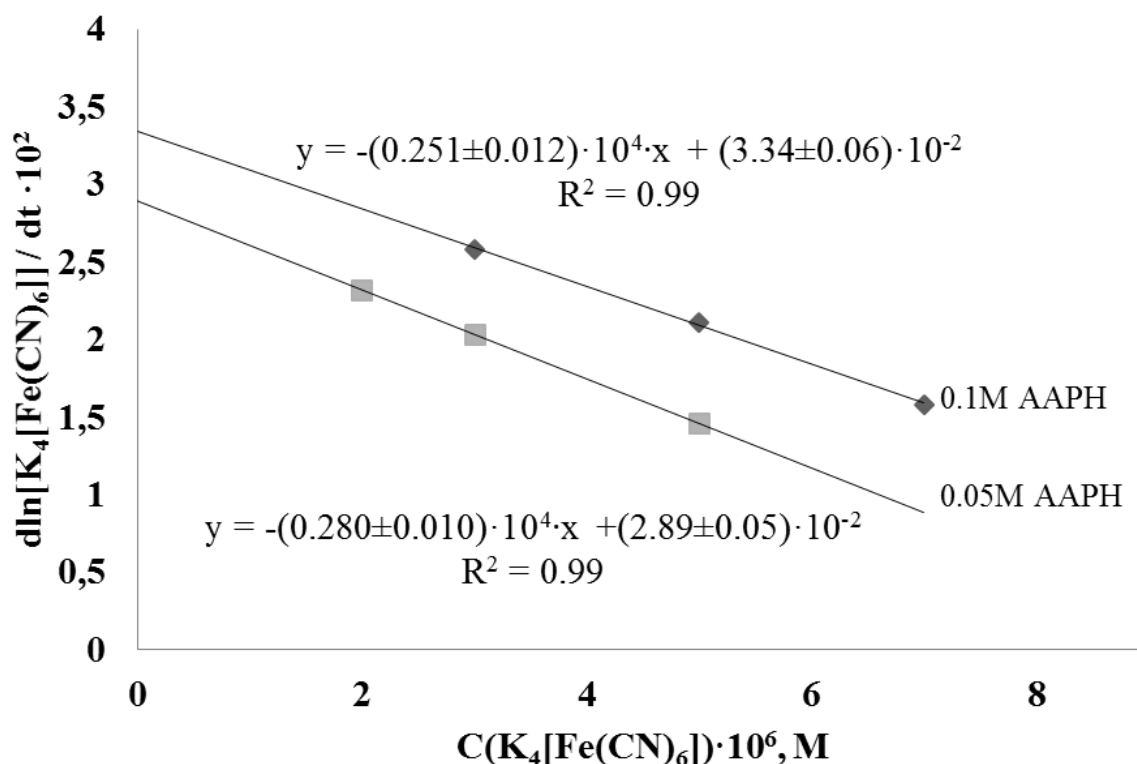


Рисунок 9 - Зависимость параметра  $a$  от начальной концентрации  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$

В таблице 8 приведены соответствующие значения скорости и константы скорости генерирования пероксильных радикалов, полученные при разных концентрациях ААРН в фосфатном буферном растворе при 37°C. Линейный характер зависимости ( $R^2=0.99$ ) скорости образования пероксильных радикалов от концентрации ААРН ( $C_{\text{ААРН}}$ ) позволяет

использовать для расчета скорости выражение (14), справедливого для реакции первого порядка по инициатору.

Таблица 8 - Скорость генерирования ( $W_i$ ) и константа скорости генерирования ( $k_i$ ) пероксильных радикалов определенные по реакции взаимодействия  $K_4[Fe(CN)_6]$  с ААРН в разных концентрациях ( $C(K_4[Fe(CN)_6]) = 0.2\text{ мМ}$ ,  $n=5$ ,  $P=0.95$ )

$C_{(AAPH)}, \text{ М}$	$W_i, 10^{-7} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$	$S_r$	$k_i, 10^{-6} \text{ с}^{-1}$
0.05	$1.05 \pm 0.01$	0.01	$1.00 \pm 0.01$
0.10	$2.00 \pm 0.04$	0.02	$1.00 \pm 0.02$
0.15	$2.87 \pm 0.03$	0.01	$0.96 \pm 0.01$
0.20	$3.8 \pm 0.1$	0.03	$0.96 \pm 0.03$
0.30	$5.4 \pm 0.1$	0.02	$0.90 \pm 0.02$
			$k_{icp} \cdot 10^6 = 0.96 \pm 0.04 \text{ с}^{-1} (S_r=0,04)$

В ходе исследования кинетики генерирования пероксильных радикалов были определены диапазоны рабочих концентраций реагента при разных концентрациях инициатора, которые составили (0.01 – 0.2) мМ для 0.05 М ААРН и (0.04 – 0.5) мМ для 0.1 М ААРН. Значение скорости и константы скорости генерирования пероксильных радикалов при  $C_{AAPH} = (0.05 - 0.3) \text{ М}$  составили  $W_i = (1.05 - 5.4) \cdot 10^{-7} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$ ,  $k_{icp} = (1.00 \pm 0.02) \cdot 10^6 \text{ с}^{-1}$ . Полученные данные согласуются с литературными.

Таким образом, новый подход для исследования кинетики реакции генерирования пероксильных радикалов с использованием восстановленной формы металла в составе комплексного соединения  $K_4[Fe(CN)_6]$  в качестве акцептора радикалов с потенциометрической детекцией позволяет получать достоверные данные о константе скорости генерирования пероксильных радикалов, согласующиеся с литературными. Предложенный подход может быть применен для исследования кинетики других радикал-генерирующих систем, используемых в качестве модельных реакций образования свободных радикалов. Полученное значение константы скорости генерирования пероксильных радикалов будет использоваться далее при расчете АРЕ.

### ***Потенциометрическое определение антирадикальной емкости***

В данной работе впервые установлена закономерность изменения ОВП системы в процессах генерирования пероксильных радикалов и их реакции с АО. На рисунке 10 представлены классические кривые изменения люминесценции при добавлении к ААРН тролокса в разных концентрациях (10а), где участок АВ соответствует иницированию радикальной реакции, ВС - взаимодействию генерируемых радикалов с ингибитором (период индукции), CD - завершению периода индукции и дальнейшему радикальному иницированию. На рисунке 10б приведены типичные кинетические кривые изменения потенциала от времени при добавлении к ААРН аскорбиновой кислоты при протекании тех же процессов.

Аналогичный вид кинетических кривых, а также электронно-протонно-донорно-акцепторный характер взаимодействия антиоксидантов

с пероксильными радикалами позволили предложить методику определения АРЕ, основанную на измерении потенциала системы.

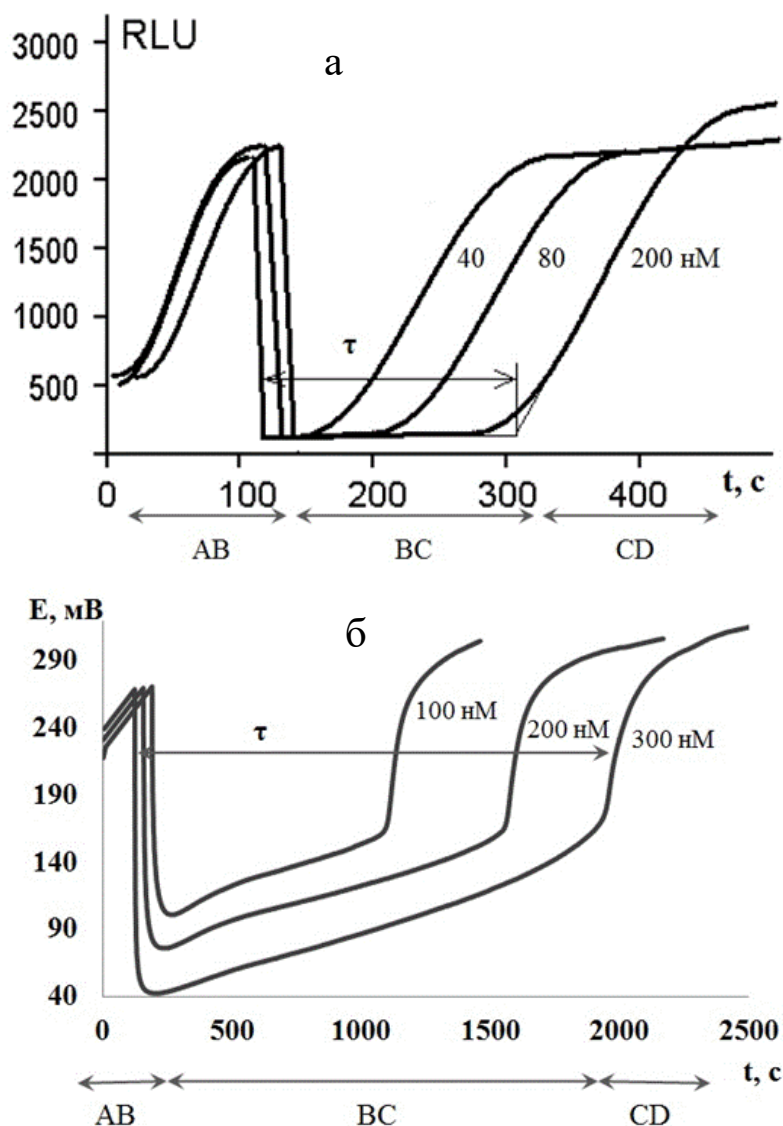
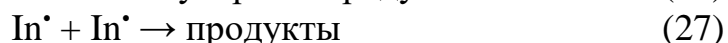
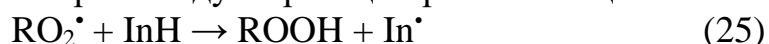


Рисунок 10 – Кинетические кривые изменение интенсивности люминесценции (а) и потенциала (б) при добавлении к ААРН Тролокса (а), аскорбиновой кислоты (б)

Ключевыми стадиями свободнорадикального окисления являются инициирование радикалов и ингибирование их АО. На рисунке 10б на участке АВ наблюдается рост потенциала за счет генерирования пероксильных радикалов в системе по реакции 8. Введение в электрохимическую ячейку ингибиторов радикальных реакций сопровождается снижением потенциала системы (начало участка ВС рисунок 10б) в результате реакции переноса атома водорода с АО на пероксильные радикалы, за которой следуют реакции рекомбинации:



При наличии в системе АО потенциал остается неизменным или незначительно увеличивается, а завершение периода индукции сопровождается резким повышением потенциала (завершение участка ВС рисунок 10б). Период индукции может быть определен из кинетической кривой в точке перегиба, как принято в классических методах. В данной работе предлагается определять период индукции как время от введения антиоксиданта в раствор инициатора до точки, соответствующей максимальной скорости изменения потенциала  $(dE/dt)_{\max}$ .

Антирадикальная емкость рассчитывается по формуле:

$$APE = f[InH] = k_i \cdot [AAPH] \cdot \tau, \quad (28)$$

где APE – антирадикальная емкость, М-экв;  $\tau$  – период индукции, с;  $[InH]$  – концентрация антиоксиданта, М;  $k_i$  – константа скорости генерирования пероксильных радикалов,  $s^{-1}$ ;  $[AAPH]$  – концентрация инициатора радикалов, М;  $f$  – коэффициента ингибирования.

Для регистрации сигнала использовали платиновый рабочий электрод и хлорид-серебряный электрод сравнения. Выбор платинового электрода обусловлен его широким диапазоном измеряемых потенциалов (от -0.1 В до +0.9 В) и чувствительностью к ОВ реакциям. В качестве фонового электролита использовался раствор фосфатного буфера (pH=7.4) с суммарной концентрацией солей  $NaH_2PO_4$  и  $K_2HPO_4$  0.067 М.

Для подтверждения правильности определения периода индукции с использованием метода дифференцирования функции зависимости потенциала от времени, проводили определение остаточной концентрации антиоксиданта в течение всего периода индукции. В таблице 9 представлены результаты определения периода индукции, полученные из производной зависимости потенциала от времени ( $\tau^*$ ) и найденные экстраполяцией зависимости остаточной концентрации аскорбиновой кислоты и цистеина от времени взаимодействия ( $\tau^{**}$ ). Статистически значимых различий между полученными значениями не выявлено, поэтому определение периода индукции по точке максимальной скорости изменения потенциала  $(dE/dt)_{\max}$  является обоснованным.

Таблица 9 - Результаты определения периода индукции аскорбиновой кислоты и цистеина при разных концентрациях ( $n=5$ ,  $P=0.95$ )

Антиоксиданты	C, mM	$\tau^*$ , мин	$S_r$	$\tau^{**}$ , мин	$S_r$
Аскорбиновая кислота	0.1	14.9±0.3	0.02	15.3±0.5	0.03
	0.2	29.1±0.8	0.03	29.4±0.9	0.03
Цистеин	0.1	11.5±0.3	0.03	11.1±0.3	0.03
	0.2	18.2±0.4	0.02	17.7±0.4	0.02

На рисунке 11 приведены интегральные (а) и дифференциальные (б) кинетические кривые изменения потенциала при добавлении к 0.1 М ААРН цистеина в разных концентрациях.

Результаты определения коэффициентов ингибирования ( $f$ ), периодов индукции ( $\tau$ ) и антирадикальной емкости аскорбиновой кислоты и цистеина в разных концентрациях приведены в таблице 10. Коэффициент ингибирования уменьшается с ростом концентрации, что согласуется с

литературными данными, полученными при использовании методов регистрации, основанных на других физико-химических принципах.

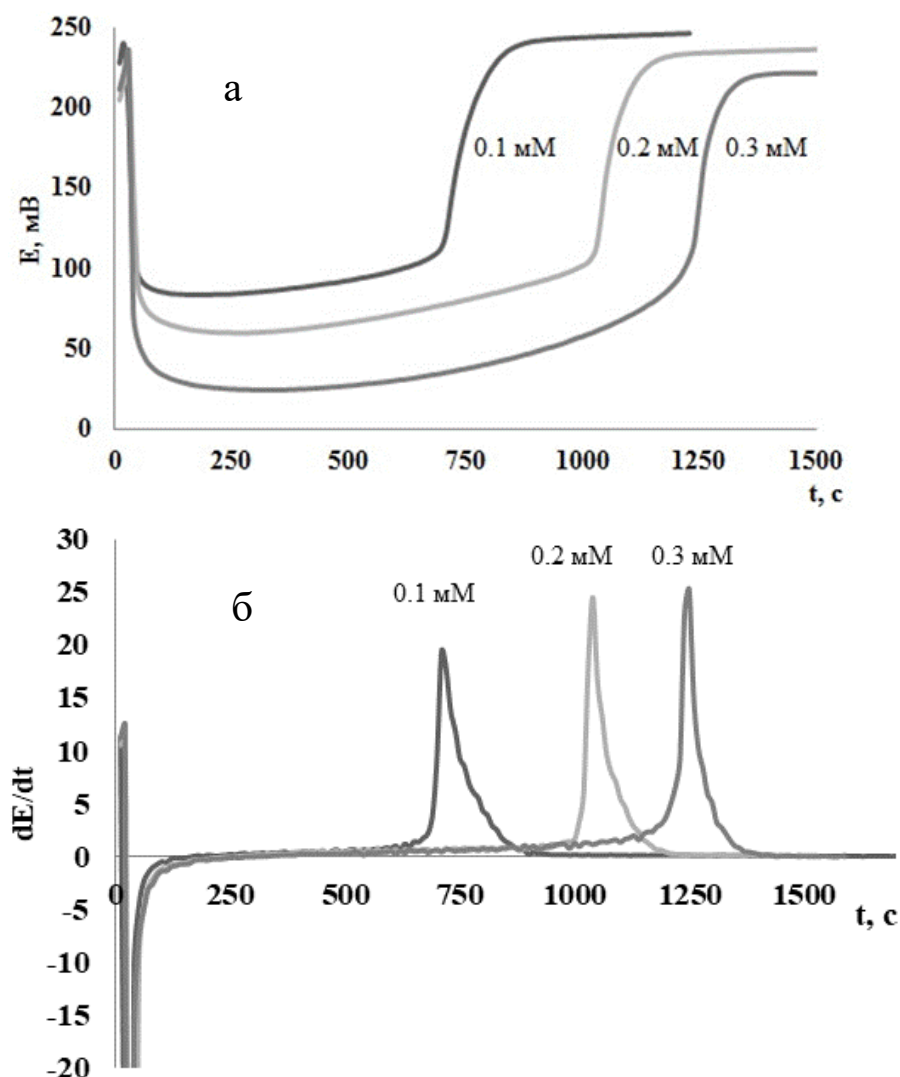


Рисунок 11 - Интегральные (а) и дифференциальные (б) кинетические кривые изменения потенциала при добавлении к 0.1М ААРН цистеина в разных концентрациях

Таблица 10 – АРЕ, период индукции и коэффициент ингибирования аскорбиновой кислоты и цистеина ( $C_{\text{ААРН}}=0.1\text{M}$ ;  $n=5$ ,  $P=0.95$ )

АО	С, ммоль/дм <sup>3</sup>	АРЕ, ммоль- экв/дм <sup>3</sup>	$\tau$ , мин	f	$S_r$
Аскорбиновая кислота	0.10	$0.22 \pm 0.01$	18.2	2.2	0.05
	0.20	$0.36 \pm 0.04$	30.2	1.8	0.01
	0.30	$0.44 \pm 0.02$	34.5	1.5	0.04
	0.40	$0.52 \pm 0.05$	42.8	1.3	0.01
Цистеин	0.10	$0.13 \pm 0.01$	11.5	1.3	0.01
	0.20	$0.20 \pm 0.01$	18.1	1.0	0.05
	0.30	$0.23 \pm 0.04$	20.0	0.8	0.02
	0.40	$0.32 \pm 0.03$	27.2	0.7	0.01

Исследованы модельные растворы АО, содержащих -ОН, -NH, -SH функциональные группы (таблица 11). Коэффициенты ингибирования изученных антиоксидантов принимают значения от 1 до 4, что связано как с их строением, т.е. с количеством активных групп в молекуле антиоксиданта, так и с механизмом обрыва цепей на молекуле антиоксиданта.

Таблица 11 – АРЕ, период индукции и коэффициент ингибирования модельных растворов антиоксидантов ( $C_{AAPH}=0.1M$ ,  $C_{AO}=10^{-4}M$ ;  $n=5$ ,  $P=0.95$ )

АО	$\tau$ , мин	f	АРЕ, $10^{-4}$ моль-экв/дм <sup>3</sup>	$S_r$
Мочевая кислота	26.2	3.1	$3.1 \pm 0.2$	0.05
Глутатион	10.8	1.3	$1.31 \pm 0.03$	0.02
Флороглucin	17.7	2.1	$2.1 \pm 0.1$	0.07
Пирогаллол	27.8	3.2	$3.2 \pm 0.2$	0.05
Катехин	35.6	4.2	$4.23 \pm 0.08$	0.02
Кверцетин	24.2	2.9	$2.85 \pm 0.06$	0.02
Галловая кислота	13.0	4.1	$4.1 \pm 0.2$	0.05
Гидрохинон	31.8	3.8	$3.75 \pm 0.04$	0.01
Оксигидрохинон	7.2	0.9	$0.85 \pm 0.03$	0.03

В случае исследования многокомпонентных объектов антирадикальная емкость представляет собой суммарное содержание антиоксидантов:

$$ARE = \sum_i f_i \cdot [InH]_i \quad (29)$$

Предел обнаружения в водных растворах, определенный по 3 $\sigma$ -критерию составил  $6.20 \cdot 10^{-6}$  моль-экв/дм<sup>3</sup>.

Таким образом, в данной работе впервые изучена зависимость изменения ОВП системы при протекании реакций генерирования пероксильных радикалов и ингибирования их антиоксидантами. Закономерное изменение потенциала связано с переносом атомов водорода с молекулы антиоксиданта на молекулу радикала в процессе ингибирования антиоксидантом пероксильных радикалов, инициируемых ААРН. На основе изучения этих зависимостей предложена оригинальная методика прямого безреагентного определения антирадикальной емкости.

Предложенный новый подход, основанный на реакции переноса атома водорода, позволяет определять как кинетические характеристики, такие как период индукции, так и термодинамические характеристики, а именно АРЕ и коэффициент ингибирования индивидуальных АО. Методики являются достаточно информативными, простыми в исполнении, не требуют дорогостоящего оборудования и реактивов, позволяют проводить исследования разных по составу проб, получать воспроизводимые результаты.



### Исследование АОЕ и АРЕ реальных объектов

В этой части диссертационной работы представлены результаты определения АОЕ и АРЕ большого круга объектов: индивидуальных природных и синтезированных АО, различных продуктов питания, растительных экстрактов, биологических объектов. В автореферате приведены лишь некоторые результаты.

#### Определение АОЕ природных окси- и бензо- производных кумаринов

Кумарины широко распространены в растительном мире и рассматриваются как перспективные нетоксичные антиоксиданты для применения в медицине. Некоторые соединения представлены на рисунке 12.

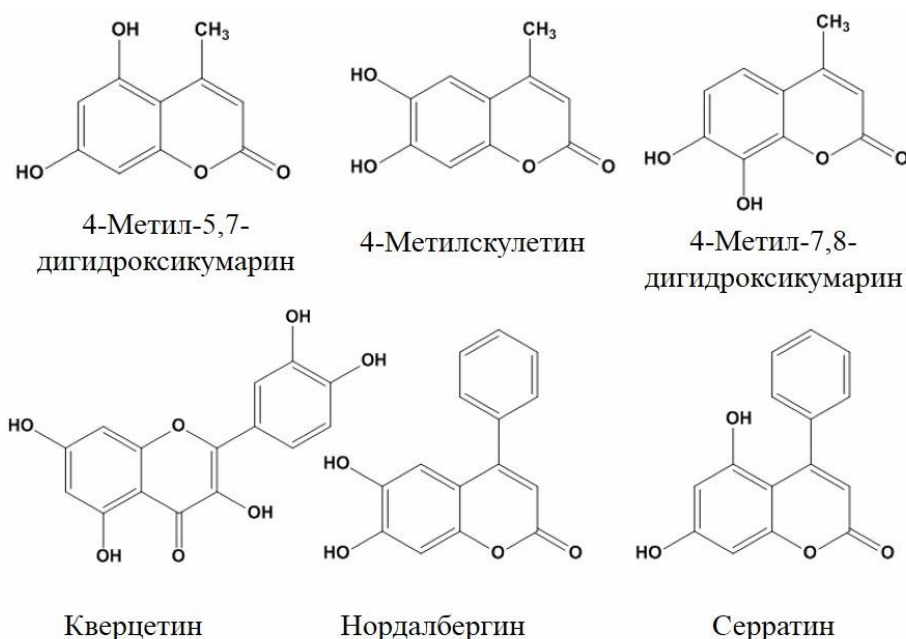


Рисунок 12 – Структура производных кумаринов

Данные, представленные в таблице 12 указывают на взаимосвязь величины АОЕ и структуры соединений. Различное положение ОН-групп сопровождается различием их антиоксидантных свойств (затрудненном переносе электрона от функциональных ОН- групп молекул с мета-положением) и согласуется с расчетными данными, описанными в литературе.

Таблица 12 - АОЕ, стехиометрические коэффициенты и период полупревращения окси- и бензо- производных кумаринов ( $C_{AO}=10^{-4}$  М;  $n=5$ ,  $P=0.95$ )

АО	АОЕ, $10^{-4}$ моль-экв/дм <sup>3</sup>	$S_r$	$\bar{n}_{\text{эксп}}$	$\tau_{1/2}$ , с
Кверцетин	$4.8 \pm 0.2$	0.05	4.8	19
4-метилскулетин	$3.25 \pm 0.07$	0.02	3.25	78
4-метил-7,8-дигидроксикумарин	$3.54 \pm 0.06$	0.03	3.54	286
4-метил-5,7- дигидроксикумарин	$0.98 \pm 0.05$	0.05	0.98	1087
Нордалбергин	$2.96 \pm 0.07$	0.03	2.96	26
Скелетин	$0.64 \pm 0.01$	0.01	0.64	1658

$\bar{n}_{\text{эксп}}$  – стехиометрический коэффициент уравнения (9), рассчитанный по формуле (14).

Представленные данные демонстрируют, что результаты в целом объективно отражают антиоксидантные свойства природных производных кумаринов, а предложенный подход может быть использован для изучения их АОЕ.

### ***Интегральная оценка АОЕ пищевых продуктов***

В диссертационной работе исследована АОЕ различных продуктов питания (фруктов, овощей, ягод) и напитков (соков промышленного производства, вин, пива). Информация об АОЕ продуктов питания может быть использована для оценки качества как самого продукта, так и характеристики сырья и анализа особенностей технологии его изготовления.

В таблице 13 приведены результаты потенциометрического определения АОЕ вин в сравнении с общим содержанием полифенольных соединений. Коэффициент корреляции составил 0,97.

Таблица 13 - Результаты потенциометрического определения АОЕ вин и общего содержания фенольных соединений (ОПФ) (n=6, r=0.95)

Объект исследования	№	Потенциометрия		Метод Фолина-Чокальтеу	
		АОЕ, ммоль-экв/дм <sup>3</sup>	S <sub>г</sub>	мМ (+)катехина	S <sub>г</sub>
натуральные белые полусладкие вина	1	1.2	0.01	1.1	0.02
	2	1.6	0.05	1.0	0.02
	5	1.6	0.01	1.0	0.02
	6	1.9	0.01	0.8	0.01
	7	2.0	0.01	1.1	0.03
натуральные белые сухие вина	3	1.6	0.07	0.9	0.01
	4	1.6	0.05	1.2	0.02
	8	2.4	0.01	1.1	0.02
	9	2.8	0.04	1.3	0.01
	10	3.0	0.04	1.2	0.04
натуральные красные полусладкие вина	11	5.9	0.05	2.6	0.02
	12	12.3	0.03	6.1	0.01
	13	12.3	0.04	6.1	0.01
	14	17.6	0.04	5.7	0.02
натуральные красные сухие вина	15	14.1	0.02	8.1	0.01
	16	20.6	0.05	8.0	0.01
	17	23.9	0.05	8.7	0.01
	18	30.4	0.07	10.4	0.01
	19	32.0	0.01	10.9	0.01

Для оценки достоверности получаемых результатов АОЕ дополнительно использовали метод «введено-найденно», как это принято для объектов со сложной матрицей, к которым относятся вина. В качестве добавки выбрана аскорбиновая кислота, отклонения найденного методом «введено-найденно» значения содержания добавки не превышают 10 %.

Значения АОЕ исследованных образцов пива в целом коррелировали с содержанием экстрактивных веществ в исходном сырье. Наименьшее значение АОЕ было найдено для безалкогольного пива, а наибольшее – в темных сортах пива. Полученные результаты согласуются с данными определения содержания восстанавливающих соединений в пиве с 2,6-дихлорфенол-индофенолятом. На методом вольтамперометрии, где наиболее высокий уровень был отмечен при исследовании темного пива, а самый низкий – в сортах, подвергавшихся дезалкоголизации.

### ***Интегральная оценка АОЕ и АРЕ экстрактов растительного сырья***

В работе исследованы настои лекарственных трав. Основными соединениями, обеспечивающими антиоксидантные свойства лекарственного растительного сырья, являются полифенольные соединения, общее содержание которых определяли методом Фолина-Чокальтеу. Коэффициент корреляции общего содержания полифенольных соединений с полученными значениями АОЕ составляет 0.98, а со значениями АРЕ – 0.99. Высокая степень корреляции подтверждает корректность получаемых результатов.

В таблице 14 представлены результаты потенциометрического определения АРЕ и АОЕ экстрактов чая. В целом, значения АОЕ и АРЕ для исследованных чаев коррелируют: степень корреляции составила 0.85. Разница в значениях АРЕ и АОЕ связаны с использованием различных моделей, основанных на разных механизмах реакции АО с окислителем: переносе электрона и переносе атома водорода. Приведенный пример демонстрирует, что АО, входящие в состав одного и того же чая, могут по-разному проявлять себя в реакциях электронного и электронно-протонного переноса.

Таблица 14 - Антирадикальная и антиоксидантная емкость чая (P=0.95; n=5)

Марка чая	АРЕ, $10^{-2}$ моль-экв/дм <sup>3</sup>	S <sub>r</sub>	АОЕ, $10^{-2}$ моль-экв/дм <sup>3</sup>	S <sub>r</sub>
Marcony (Чай черный)	1.06±0.02	0.02	1.60±0.03	0.02
Nadin 1002 ночь	0.33±0.01	0.02	1.09±0.01	0.01
Greenfield. Earl Gray Fantasy	1.38±0.04	0.03	1.24±0.01	0.01
Rumuk. Black tea	0.72±0.01	0.02	1.49±0.04	0.03
Ahmad Breakfast	1.33±0.04	0.03	1.97±0.02	0.07
Каждый день. Жасмин	3.28±0.03	0.01	2.9±0.2	0.03
Китайский зеленый чай	3.79±0.04	0.01	2.92±0.03	0.08
Травяной чай «Витаминный»	0.44±0.01	0.01	0.32±0.03	0.05
Травяной чай «Отличное зрение»	0.35±0.01	0.03	0.56±0.03	0.01
Травяной чай «Для похудения»	0.28±0.01	0.03	0.56±0.02	0.01

### **Определение АОЕ биологических объектов**

Учитывая сложный состав биологических объектов, изучение АОЕ этих объектов требовало проведения дополнительных исследований связанных с анализом растворов, моделирующих состав крови, выбором рабочих концентраций компонентов модельного окислителя, выбора антикоагулянта, степени разбавления анализируемых образцов, влияния условий отбора, хранения и подготовки биологических образцов к анализу. При выборе АО и их концентраций для приготовления модельного раствора опирались на средние значения диапазона содержания, определенные из литературных данных. Для моделирования белкового состава плазмы использовался альбумин. Результаты анализа модельного раствора приведены в таблице 15.

Таблица 15 - Результаты определения АОЕ раствора, моделирующего антиоксидантный состав плазмы крови (ммоль-экв/дм<sup>3</sup>, n=5, P=0.95)

Соединение	Концентрация	АОЕ ожидаемая	АОЕ измеренная	S <sub>r</sub>
Мочевая кислота	0.37·10 <sup>-3</sup> М	0.70	0.75±0.03	0.02
Аскорбиновая кислота	0.06·10 <sup>-3</sup> М			
Глутатион	0.02·10 <sup>-3</sup> М			
Цистеин	0.015·10 <sup>-3</sup> М			
Билирубин	0.01·10 <sup>-3</sup> М			
Альбумин	45 г/л			

Полученные результаты определения АОЕ модельного раствора соответствуют ожидаемому значению согласно его составу с учетом определенных стехиометрических коэффициентов.

На основании проведенных исследований осуществлен выбор рабочих условий определения АОЕ исследуемых образцов. При исследовании способа предотвращения коагуляции крови показано, что гепарин, цитрат натрия и ЭДТА не влияют на результаты определения АОЕ и могут быть использованы в качестве антикоагулянтов. В качестве метода разрушения клеточных мембран клеток крови был выбран термический гемолиз.

Результаты определения АОЕ крови и её фракций представлены в таблице 16.

Таблица 16 - АОЕ цельной крови, плазмы и эритроцитарной массы (ммоль-экв/дм<sup>3</sup>, n = 5, P = 0.95)

Объект №	Цельная кровь		Эритроцитарная масса		Плазма	
	АОЕ	S <sub>r</sub>	АОЕ	S <sub>r</sub>	АОЕ	S <sub>r</sub>
1	12.0 ± 0.5	0.02	18.6±0.7	0.05	1.00±0.04	0.03
2	8.9±0.1	0.05	19.5±0.3	0.03	1.10±0.07	0.03
3	11.6±0.6	0.02	25.5±0.6	0.07	1.59±0.02	0.05
4	6.4±0.3	0.02	18.5±0.6	0.03	0.99±0.06	0.03
5	10.3±0.5	0.02	16.9±0.5	0.04	0.96±0.03	0.03
6	10.2±0.2	0.01	22.8±0.6	0.04	1.20±0.08	0.02
7	12.6±0.1	0.03	22.2±0.8	0.04	1.06±0.04	0.02
8	11.7±0.3	0.01	18.8±0.4	0.03	1.09±0.05	0.03

Одним из подтверждений правильности получаемых результатов являются результаты анализа контрольного образца сыворотки крови, полученного потенциометрическим методом. В результате анализа контрольного образца сыворотки, концентрация антиоксидантов в котором составляет 1.55 ммоль-экв/дм<sup>3</sup>, найденная потенциометрическим методом АОЕ при  $t = 37^{\circ}\text{C}$  составила  $1.50 \pm 0.08$  ммоль-экв/дм<sup>3</sup>.

Результаты сравнительного анализа образцов сыворотки крови способами TAS (Randox) и потенциометрии показывают, что соотношение между величинами (TAS/АОЕ) составляет в среднем  $1.01 \pm 0.04$  (для плазмы 44 пациентов) и  $1.15 \pm 0.03$  (для сыворотки 10 пациентов). Полученные значения АОЕ плазмы и сыворотки крови укладываются в пределы, указанные в литературе.

### **Определение АОЕ и АРЕ витаминных препаратов**

Антиоксидантные лекарственные препараты широко применяются в качестве основных средств терапии или как дополнительные средства коррекции при лечении широкого круга заболеваний. В связи с этим исследование лекарственных препаратов с антиоксидантными свойствами является современной актуальной задачей. В таблице 17 представлены результаты определения суммарного количества молей эквивалентов АО, найденного в витаминных препаратах на основе аскорбиновой кислоты в водной среде и витаминных комплексов на основе А/С/Е - витаминов в водно-этанольной среде, рассчитанного на 1 таблетку для таблетированных форм и на 1 мл для растворов ( $\sum n_{\text{эксп}}$ ) в сравнении с содержанием, заявленным производителем ( $\sum n_{\text{произ}}$ ).

Таблица 17 - Результаты измерений АОЕ и АРЕ витаминных препаратов и витаминных комплексов ( $n=10$ ,  $P=0.95$ )

Наименование	АОЕ		АРЕ		$\sum n_{\text{произ}}, 10^{-4}$ МОЛЬ
	$\sum n_{\text{эксп}}, 10^{-4}$ МОЛЬ	$S_{\Gamma}$	$\sum n_{\text{эксп}}, 10^{-4}$ МОЛЬ	$S_{\Gamma}$	
АК в драже*	6.30	0.06	6.71	0.07	5.68
Мультифорт*	7.99	0.01	6.30	0.02	5.68
АК р-р для инъекций**	6.69	0.06	6.63	0.03	2.84
АК с глюкозой*	3.78	0.04	3.57	0.02	7.10
Веторон**	7.05	0.04	6.90	0.08	5.43
Морской кальций*	1.57	0.04	1.20	0.05	1.14
АК с декстрозой*	21.15	0.02	21.78	0.03	5.57
Перфектил*	3.30	0.04	5.40	0.02	5.68

\* - рассчитано на 1 таблетку; \*\* - рассчитано на 1 мл раствора

Данные таблицы демонстрируют хорошую согласованность экспериментально полученных значений АОЕ и АРЕ со значениями, рассчитанными исходя из заявленного производителем содержания действующих в них веществ. Коэффициент корреляции результатов составил 0,97. Высокая степень корреляции обусловлена тем, что основой

препаратов является аскорбиновая кислота, которая вступает одинаково как в реакции переноса электрона, так и в реакции переноса атома водорода.

### ***Определение АОЕ растворов для офтальмологического применения***

Существует большое количество работ, показывающих эффективность применения АО для профилактики и лечения различных заболеваний глаз. Однако исследования, направленные на изучение антиоксидантных и противорадикальных свойств самих офтальмологических средств, практически не представлены. В таблице 18 приведены значения периодов полупревращения ( $\tau_{1/2}$ ) и АОЕ, полученные потенциометрическим методом, и значения противорадикальной активности (ПРА), полученные спектрофотометрическим способом на моделиДФПГ для исследуемых лекарственных форм. Период полупревращения может являться дополнительной характеристикой действия препаратов с точки зрения эффективности их воздействия и пролонгированного действия, а также сроков хранения. Степень корреляции результатов определения АОЕ и ПРА, полученных с использованием различных подходов, составляет 0.96. Высокая степень корреляции, возможно, обусловлена тем, что в основе используемых способов лежит перенос электрона с АО на окислитель. Информация об антиоксидантных свойствах офтальмологических лекарственных форм может быть использована для повышения эффективности лечения заболеваний различного генеза.

Таблица 18 - Значения АОЕ и ПРА лекарственных форм (n=3, P=0.95)

Название препарата	$\tau_{1/2}$ , мин	АОЕ, $10^{-4}$ моль-экв/дм <sup>3</sup>	S <sub>r</sub>	ПРА (%)	S <sub>r</sub>
Эмоксипин (капли для глаз)	7.7±0.4	138±7	0.05	98±3	0.03
Офтан Катахром	3.0±0.3	6.0±0.7	0.11	7.2±0.6	0.08
Квинакс	0.78±0.07	2.9±0.3	0.09	20±1	0.06
Офтан Тимолол	5.9±0.2	5.2±0.2	0.04	4.9±0.2	0.03
Офтан Дексаметазон	6.8±0.3	6.5±0.9	0.10	9±1	0.07
Люксфен	9.07±0.09	2.90±0.03	0.01	-	-
Каталин	4.4±0.1	2.37±0.07	0.03	8.8±0.4	0.04
Эмоксибел	2.6±0.2	3.6±0.3	0.08	5.0±0.3	0.06
Эмоксипин (р-р для инъекций)	2.5±0.1	3.9±0.2	0.05	5.6±0.3	0.05
Визомитин	7.1±0.4	0.01±0.000(6)	0.06	0.04±0.00(3)	0.07
Тауфон	-	-	-	-	-

### ***Определение АОЕ и АРЕ синтезированных соединений***

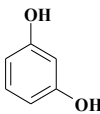
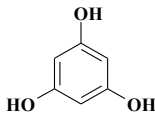
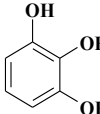
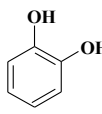
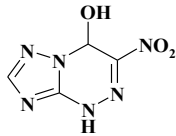
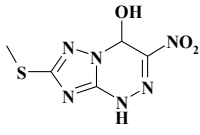
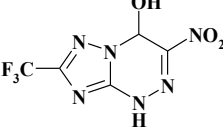
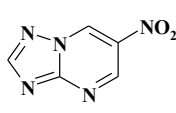
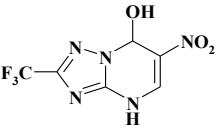
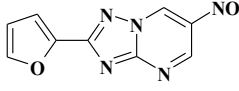
Большой интерес в последнее время вызывают исследования в области направленного синтеза целевых молекул с различными видами биологической активности, в том числе и антиоксидантной.

Известно, что при возникновении заболеваний вирусной этиологии в организме наступает состояние окислительного стресса, связанное с избыточной генерацией АКМ радикальной и нерадикальной природы, которое утяжеляет течение заболевания. При развитии инфекционных

заболеваний очень важно проводить не только противовирусную терапию, но и контролировать ОС организма, корректируя его препаратами антиоксидантного действия. С целью создания препаратов двойного действия были синтезированы новые производные азагетероциклов, обладающие противовирусными свойствами, содержащие остатки моно-, двух- и полиатомных фенолов, отвечающих за антиоксидантное действие.

В таблице 19 представлены результаты определения АОЕ и АРЕ синтезированных аддуктов азолазинов с полифенолами.

Таблица 19 - АОЕ ( $S_r$ ) и АРЕ ( $S_r$ ) аддуктов азолазинов с полифенолами ( $10^{-4}$  моль/дм<sup>3</sup>, n=5, P=0,95)

Азолазин		Полифенол			
					
		-	2.8±0.2 (0.08)	5.2±0.1 (0.02)	4.9±0.2 (0.04)
		-	2.26±0.04 (0.02)	2.84±0.03 (0.01)	7.1±0.1 (0.02)
	-	-	1.49±0.03 (0.02)	2.93±0.03 (0.01)	3.56±0.07 (0.02)
	3.65±0.08 (0.02)	9.0±0.1 (0.01)	3.42±0.07 (0.02)	10.80±0.03 (0.003)	8.1±0.2 (0.03)
	-	1.23±0.02 (0.02)	1.37±0.03 (0.02)	4.21±0.09 (0.02)	2.9±0.2 (0.08)
	2.82±0.03 (0.01)	6.9±0.1 (0.01)	0.31±0.01 (0.03)	2.83±0.04 (0.01)	8.0±0.1 (0.01)
	-	0.97±0.07 (0.07)	1.32±0.05 (0.04)	3.18±0.03 (0.01)	4.31±0.04 (0.01)
	3.81±0.03 (0.01)	4.72±0.01 (0.002)	6.37±0.03 (0.004)	10.5±0.3 (0.03)	8.1±0.2 (0.02)
	-	-	1.04±0.04 (0.04)	1.53±0.01 (0.01)	2.1±0.2 (0.08)
	-	6.07±0.03 (0.005)	5.53±0.06 (0.01)	6.28±0.06 (0.005)	5.86±0.08 (0.01)
	-	1.02±0.02 (0.02)	1.22±0.04 (0.03)	3.7±0.1 (0.03)	4.7±0.3 (0.21)
	-	9.9±0.4 (0.03)	6.72±0.08 (0.01)	2.4±0.2 (0.10)	14.57±0.0 9 (0.006)
	-	-	1.08±0.08 (0.07)	3.0±0.3 (0.09)	2.34±0.08 (0.03)
	-	6.90±0.03 (0.004)	0.713±0.0 6 (0.008)	11.1±0.1 (0.01)	-

Практически все аддукты, за исключением резорцина и некоторых его производных, проявляют антиоксидантные свойства. Соединения с фрагментами пирокатехина, пирогаллола проявляют большую АОЕ относительно аддуктов, содержащих резорциновый и флороглюциновый фрагмент. На величину АОЕ также влияет тип азолазинового фрагмента. Аддукты, в основе которых лежит 6-нитро-триазолотриазин-7-ол проявляют большую АОЕ, чем соединения на основе 6-нитро-триазоло-пиримидин-7-олов. Это может быть объяснено тем, что появление в азинах дополнительного атома азота N5 (положение 5) приводит к смещению электронной плотности с фенольного фрагмента на азолазиновый фрагмент, что облегчает процесс переноса электрона при окислении.

В случае АРЕ наблюдается более сложная взаимосвязь способности переноса атома водорода со значением АРЕ. Наибольшее значение было получено для аддукта фторированного азолазина с пирокатехином.

Поскольку эти объекты являются новыми и данные об их антиоксидантных свойствах отсутствуют, были проведены корреляционные исследования с применением независимых методов. В таблице 20 представлены коэффициенты корреляции для всех применяемых методов (потенциометрических и спектрофотометрических с использованием реактивов Фолина-Чокальтеу и ДФПГ).

Таблица 20 - Корреляция результатов измерения

	АОЕ	ФЧ	ДФПГ	АРЕ
АОЕ	-	0.65	0.67	0.26
ФЧ	-	-	0.66	0.28
ДФПГ	-	-	-	0.40
АРЕ	-	-	-	-

Из представленных данных видно, что результаты, полученные способами, основанными на реакции переноса электрона, коррелировали на 65 - 67 %, тогда как результаты АРЕ показали низкие коэффициенты корреляции со всеми способами. Данный эксперимент подтверждает, что в случае более сложных структур и сопряжения фрагментов с различными типами активности, способность переноса электрона и атома водорода не коррелируют друг с другом. Для получения более полной и объективной информации о свойствах таких соединений, необходимо применять комплексные подходы, учитывающие различные механизмы реакции.

По результатам исследований наиболее перспективными соединениями, проявляющими антиоксидантные свойства, являются аддукты, содержащие в своей структуре остатки пирогаллола и пирокатехина и 6-нитро-триазолотриазин-7-олы. Предлагаемый комплексный подход с использованием потенциометрического определения АОЕ и АРЕ может быть использован для скрининга новых синтезированных соединений в целях выявления наиболее перспективных кандидатов для создания полифункциональных фармпрепаратов.

Комплексное исследование является очень важным в интерпретации антиоксидантных свойств объектов. Несмотря на то, что в ряде случаев АОЕ



и АРЕ коррелируют между собой, абсолютные значения этих величин разные, т.к. стехиометрические коэффициенты в реакциях электронного переноса и коэффициенты ингибирования в реакциях электронно-протонного переноса для одних и тех же АО могут существенно отличаться (Таблица 21). Кроме того, некоторые АО, такие как каротиноиды, не принимают участия в реакциях электронного переноса, тогда как являются эффективными ингибиторами пероксильных радикалов. И наоборот, некоторые восстановители, такие, как сульфит натрия, Sn(II), не являясь АО, участвуют в реакциях электронного переноса и могут искажать результаты определения АОЕ. Хелатирующие свойства полифенолов также будут вносить вклад в величину АОЕ.

Таблица 21 – Сравнение АО по механизмам химических превращений

Соединение	Механизм				
	I		II		III
	Реакция переноса электрона	n (число электронов)	Реакция переноса атома водорода	f (коэффициент ингибирования)	Реакция комплексообразования
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub></b>	+	<b>2</b>	-	-	-
<b>Sn(II)</b>	+	<b>2</b>	-	-	-
<b>β-каротин</b>	-	-	+	<b>1</b>	-
<b>Азолазины</b>	-	-	+	<b>1-3</b>	-
<b>Пробукол</b>	-	-	+	<b>1</b>	-
<b>α-токоферол</b>	+	<b>1</b>	+	<b>2</b>	-
<b>Пирогаллол</b>	+	<b>4</b>	+	<b>3</b>	+
<b>Кверцетин</b>	+	<b>4</b>	+	<b>3</b>	+
<b>Катехин</b>	+	<b>4</b>	+	<b>4</b>	+
<b>Галловая кислота</b>	+	<b>5</b>	+	<b>4</b>	+
<b>Инол</b>	+	<b>1</b>	+	<b>2</b>	-

### *Метрологические характеристики потенциометрического определения АОЕ и АРЕ*

Показатели прецизионности (повторяемости и воспроизводимости), правильности и точности методики определения АОЕ и АРЕ продуктов питания, растительных экстрактов и биологических образцов определяли в соответствии с требованиями РМГ 61-2003. На основании рассчитанных значений метрологических характеристик можно выделить следующие поддиапазоны определения АОЕ: от 0.5 до 10.0 ммоль-экв/дм<sup>3</sup> с интервалом относительной погрешности (точности) 23%, от 10.0 до 50 ммоль-экв/дм<sup>3</sup> - 18%, от 50 ммоль-экв/дм<sup>3</sup> и выше с интервалом относительной погрешности 8%. Показатели повторяемости и воспроизводимости составили не более 8%

и 10% соответственно, а показатель правильности (интервал относительной систематической погрешности) – не превысил 12%.

Значения относительной погрешности при определении АРЕ растительных экстрактов не превышают 20 %. Показатели повторяемости и воспроизводимости исследованных экстрактов в относительных единицах составили не более 12 %.

Потенциометрические методики определения АОЕ и АРЕ могут быть применены для исследования антиоксидантных свойств широкого круга объектов со сложной матрицей переменного состава. Полученные значения метрологических характеристик для количественного интегрального показателя АОЕ и АРЕ различных объектов со сложной матрицей указывают на высокую стабильность измерений этих параметров с использованием разработанных потенциометрических методик.

## ВЫВОДЫ

1. Сформулированы общие принципы, теоретические и практические подходы к использованию метода потенциометрии в комплексной интегральной оценке антиоксидантных/антирадикальных свойств веществ, основанной на механизмах действия АО.

2. Сформулированы требования к модельным окислителям в реакциях электронного и электронно-протонного переноса, теоретически и экспериментально обоснован выбор системы  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  в реакции переноса электрона, 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорида в реакции переноса атома водорода.

3. Изучены закономерности изменения ОВП системы  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  в процессе протекания реакции электронного переноса с молекулы АО на молекулу модельного окислителя, установлены взаимосвязи структура АО – АОЕ. Показано, что величина стехиометрических коэффициентов реакции АО с модельным окислителем в большинстве случаев коррелирует с количеством гидроксильных групп, присоединенных к бензольному кольцу, флавоновому ядру или ненасыщенному гетероциклу, которые обуславливают антиоксидантные свойства соединений. Константы скорости реакций модельных АО с  $K_3[Fe(CN)_6]$  не превысили 0,0045 1/с, что говорит о высокой скорости реакции переноса электрона.

4. Разработана оригинальная потенциометрическая методика определения АОЕ, основанная на реакции переноса электрона, для исследования индивидуальных веществ и многокомпонентных объектов, выбраны рабочие условия для получения аналитического сигнала, разработаны алгоритмы анализа. Определены рабочие соотношения концентраций окисленного и восстановленного компонентов системы и степени разбавления проб при анализе различных объектов. В качестве фонового раствора выбран фосфатный буферный раствор с pH 7.2-7.4 с суммарным содержанием солей 0.067 М, обеспечивающим высокую ионную силу ( $I=0.120$ ) и буферную емкость ( $B=0.031$  М), достаточную для компенсации смещения pH. В качестве рабочего электрода выбран

платиновый электрод. Предел обнаружения в водных растворах (на примере аскорбиновой кислоты) согласно  $3\sigma$ - критерию составил  $3.5 \cdot 10^{-6}$  моль-экв/дм<sup>3</sup>.

5. Изучено влияние хелатирующей способности полифенолов на величину интегрального параметра АОЕ при помощи метода ЦВА и расчета условных констант устойчивости. Показано, что в случае некоторых полифенолов (пирокатехин, пирогаллол, галловая кислота) регистрируется суммарный эффект, связанный как с реакцией переноса электрона с молекулы полифенола на  $K_3[Fe(CN)_6]$ , так и с реакцией конкурирующего комплексообразования.

6. Предложен новый подход для оценки кинетических параметров реакции генерирования пероксильных радикалов потенциометрическим методом с использованием в качестве акцептора радикалов восстановленной формы металла в составе комплексного соединения. В качестве акцептора радикалов теоретически обоснован  $K_4[Fe(CN)_6]$ . Показана эффективность выбранного акцептора путем оценки константы взаимодействия с генерируемыми пероксильными радикалами ( $k_3$ ), которая составила  $(1.9 \pm 0.2) \cdot 10^4$  (М·с)<sup>-1</sup>. Изучена кинетика реакции распада 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорида, значение скорости и константы скорости генерирования пероксильных радикалов при  $C_{AAPH} = (0.05 - 0.3)$  М составили  $W_i = (1.05 - 5.39) \cdot 10^{-7}$  М·с<sup>-1</sup>,  $k_{icp} = (1.00 \pm 0.02) \cdot 10^6$  с<sup>-1</sup>.

7. Изучены закономерности изменения ОВП радикал-генерирующей системы на модели AAPH в качестве источника пероксильных радикалов в процессах их генерирования и ингибирования, основанного на реакции электронно-протонного переноса с молекулы АО на молекулу радикала, установлена взаимосвязь структура АО – АРЕ. Предложен способ определения периода индукции реакции по максимальной скорости изменения потенциала системы  $(dE/dt)_{max}$ . Показано, что коэффициенты ингибирования АО в реакции с пероксильными радикалами в целом соответствуют количеству гидроксильных групп, присоединенных к бензольному кольцу, флавоновому ядру или ненасыщенному гетероциклу.

8. Разработана оригинальная безреагентная потенциометрическая методика определения АРЕ, основанная на реакции переноса атома водорода с АО на генерируемые пероксильные радикалы, для исследования индивидуальных веществ и многокомпонентных объектов. Выбраны рабочие условия для получения аналитического сигнала, разработаны алгоритмы анализа. В качестве фонового раствора, как и в случае определения АРЕ выбран фосфатный буферный раствор с рН 7.2-7.4, в качестве рабочего электрода выбран платиновый электрод. Предел обнаружения в водных растворах (на примере аскорбиновой кислоты) согласно  $3\sigma$ - критерию составил  $6.20 \cdot 10^{-6}$  моль-экв/дм<sup>3</sup>.

9. Разработаны методики определения интегральных параметров АОЕ и АРЕ различных объектов (индивидуальных природных и синтезированных АО, лекарственных средств, экстрактов растительного сырья, пищевых продуктов, биологических жидкостей). Выявлена достоверная корреляция значений АОЕ и АРЕ, полученных

потенциометрическим методом для лекарственных средств, экстрактов растительного сырья, пищевых продуктов со значениями, полученными спектрофотометрическими методами с использованием реактива Фолина - Чокальтеу и модели стабильного радикала ДФПГ; значений АОЕ биологических образцов со значениями, полученными методом TAS RANDOX. Показано, что при исследовании сложных сопряженных систем значения АОЕ и АРЕ слабо коррелируют, что связано с различной способностью соединений вступать в реакции переноса электрона и переноса атома водорода.

10. Разработанные на основе проведенных исследований методики прошли метрологическую аттестацию: «Методика определения антиоксидантной активности пищевых продуктов, продовольственного сырья, БАД и витаминов методом потенциометрии с применением анализатора МПА-1» (свидетельство УНИИМ - № 224.04.10.063/2007); «Методика определения антиоксидантной активности проб биологических материалов методом потенциометрии с применением анализатора МПА-1» (свидетельство УНИИМ - № 224.11.10.067/2007).

### **Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:**

#### *Статьи*

1. Брайнина, Х.З. Оценка антиоксидантной активности пищевых продуктов методом потенциометрии / Х.З. Брайнина, **А.В. Иванова**, Е.Н. Шарафутдинова // Изв. вузов. Серия «Пищевая технология». – 2004. – № 4. – С. 73 – 75.

2. Shpigun, L.K. Flow injection potentiometric determination of total antioxidant activity of plant extracts / L.K. Shpigun, M.A. Arharova, Kh.Z. Brainina, **A.V. Ivanova** // Analytica Chimica Acta. – 2006. – V. 573-574. – P. 419-426.

3. Brainina, Kh. Z. Potentiometry as a method of antioxidant activity investigation / Kh.Z. Brainina, **A.V. Ivanova**, E.N. Sharafutdinova, E.L. Lozovskaya, E.I. Shkarina // Talanta. – 2007. – V. 71. – P. 13-18.

4. Brainina, K.Z. Potentiometric determination of antioxidant activity of food and herbal extracts / K.Z. Brainina, **A.V. Ivanova**, E.N. Sharafutdinova, S.Yu. Saraeva // Comprehensive Analytical Chemistry ch. coll: Electrochemical sensor analysis. – 2007. – V. 49. – P. e277 – e283.

5. Brainina, K.Z. Screen-printed enzyme-free electrochemical sensors for clinical and food analysis (Review) / K.Z. Brainina, A.N. Kositzina, **A.V. Ivanova** // Comprehensive Analytical Chemistry ch. coll: Electrochemical sensor analysis. – 2007. – V. 49. – P. 643 – 666 .

6. Шарафутдинова, Е.Н. Потенциометрический метод определения антиоксидантной активности: оценка основных метрологических характеристик / Е.Н. Шарафутдинова, О.В. Инжеватова, Н.В. Тоболкина, **А.В. Иванова**, Х.З. Брайнина //Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2008. – Т. 24. – № 6. – С. 9 – 14

7. Brainina, Kh.Z. New Electrochemical Methods of Determining Anti-Oxidant Activity of Blood and Blood Fractions / Kh.Z. Brainina, L.V. Alyoshina,

E.L. Gerasimova, Ya.E. Kazakov, Ya.B. Beykin, S.V. Belyaeva, T.I. Usatova, O.V. Inzhevatova, **A.V. Ivanova**, M.Ya. Khodos // *Electroanalysis*. – 2009. – V. 21. – P. 618 – 624.

8. Brainina, Kh.Z. Antioxidant Activity Evaluation Assay Based on Peroxide Radicals Generation and Potentiometric Measurement / Kh.Z. Brainina, E.L. Gerasimova, O.T. Kasaikina, **A.V. Ivanova** // *Analytical Letters*. – 2011. – V. 44. – № 8. – P. 1405 – 1415.

9. Шарафутдинова, Е.Н. Качество пищевых продуктов и антиоксидантная активность / Е.Н. Шарафутдинова, **А.В. Иванова**, А.И. Матерн, Х.З. Брайнина // *Аналитика и контроль*. – 2011. – Т. 15. – № 3. – С. 281 – 286

10. **Иванова, А.В.** Потенциометрическое определение водорастворимых антиоксидантов с использованием комплексов металлов / А. В. Иванова, Е. Л. Герасимова, И. А. Кравец, А. И. Матерн // *Журн. аналитической химии*. – 2015. – Т. 70. – № 2. – С. 156 – 160.

11. **Ivanova, A. V.** Potentiometric Study of Antioxidant Activity: Development and Prospects /A. V. Ivanova, E. L. Gerasimova, Kh. Z. Brainina // *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. – 2015. – V. 45. – №4. – P. 311 – 322.

12. **Иванова, А. В.** Исследование кинетики термического распада 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин)дигидрохлорида потенциометрическим методом с использованием комплексов металлов / А. В. Иванова, Е. Л. Герасимова, Е. Р. Газизуллина, А. Н. Козицина, А. И. Матерн // *Изв. РАН. Сер. химическая*. – 2016. – № 2. – С. 419 – 424.

13. **Иванова, А. В.** Исследование антиоксидантной активности и суммарного содержания полифенолов лекарственного растительного сырья / А. В. Иванова, Е. Л. Герасимова, Е. Р. Газизуллина, К. Г. Попова, А. И. Матерн // *Журн. аналитической химии*. – 2017. – Т. 72. – № 4. – С. 363 – 368.

14. **Иванова, А. В.** Потенциометрический метод определения кинетических характеристик радикальных реакций в водных средах /А. В. Иванова, Е. Л. Герасимова, Е. Р. Газизуллина, А. Г. Давлетчурина, А. Н. Козицина, О.Т. Касаикина // *Изв. РАН. Сер. химическая*. – 2017. – № 8. – С. 1428 – 1432.

15. **Иванова, А. В.** Антиоксидантная и противорадикальная активность лекарственных средств, предназначенных для лечения офтальмологических заболеваний / А.В. Иванова, Е.Л. Герасимова, Е.Р. Газизуллина, Я.А. Окулова, А.И. Матерн, В.Л. Русинов // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2018. – Т. 52. – № 8. – С. 16 – 21.

16. **Ivanova, A. V.** New antiradical capacity assay with the use potentiometric method /A.V.Ivanova, E.L.Gerasimova, E.R.Gazizullina // *Analytica Chimica Acta*. – 2019. – V. 1046. – P. 69-76.

#### *Патенты РФ*

1. Пат. 2235998 РФ. МПК G01N 27/60. Способ определения оксидантной/антиоксидантной активности растворов / Х.З. Брайнина, **А.В. Иванова**; заявл. 14.11.2002; опубл. 10.09.2004, бюл. № 25.

2. Пат. 2532406 РФ. МПК G01N 27/26. Способ потенциометрического определения антиоксидантной/оксидантной активности с использованием

комплексов металлов / **А.В. Иванова**, Е.Л. Герасимова, И.А. Кравец, А.И. Матерн; заявл. 22.03.2013; опубл. 10.11.2014, бюл. № 31.

3. Пат. 2612132 РФ. МПК G01N 27/00, G01N 27/26, G01N 27/30, G01N 31/00. Способ потенциометрического определения скорости генерирования пероксильных радикалов / **А.В. Иванова**, Е.Л. Герасимова, Е.Р. Газизуллина, А.И. Матерн; заявл. 16.07.2015; опубл. 02.03.2017, бюл. № 7.

4. Пат. 2618426 РФ. МПК G01N 27/26. Способ определения антиоксидантной активности с использованием радикальных инициаторов / **А.В. Иванова**, Е.Л. Герасимова, Е.Р. Газизуллина, А.И. Матерн; заявл. 31.12.2015; опубл. 03.05.2017, бюл. № 13.

#### *Учебные пособия*

1. **Иванова, А. В.** Электрохимические методы исследования биологических объектов: лабор. практикум: [учеб.-метод. пособие] / А.В. Иванова, А.Н. Козицина, Е.Л. Герасимова, С.Ю. Сараева, Ю.А. Глазырина, А.И. Матерн; под общ. ред. С.Ю. Сараевой; науч.ред. В.И. Кочеров // МОН РФ, Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина. – Екатеринбург: Издательство Уральского университета. – 2014. – 52 с.

2. Козицина, А.Н. Электрохимические методы анализа: учебное пособие. А.Н. Козицина, **А.В. Иванова**, Ю.А. Глазырина, Е.Л. Герасимова, Т.С. Свалова, Н.Н. Малышева, А.В. Охохонин // МОН РФ, Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина. — Екатеринбург: Издательство Уральского университета. – 2017. — 128 с.

Автор выражает искреннюю благодарность: сотрудникам ИБХФ РАН им. Н.М. Эммануэля и лично директору д.х.н. **Бурлаковой Е.Б.**; руководителю отдела ИХФ РАН им. Н.Н. Семенова д.х.н. Касикиной О.Т.; профессору кафедры аналитической химии КФУ Будникову Г.К.; профессору кафедры органической химии ХТИ УрФУ, чл.-кор. РАН Русинову В.Л.; коллективу медицинского диагностического центра г. Екатеринбурга и лично директору д.м.н. Бейкину Я.Б; Заведующему Центра гемодиализа и трансплантации почки Злоказову В.Б.; ФГУП «УралТест»; г.н.с. лаборатории аналитической химии и методов разделения ИОНХ РАН им. Н.С.Курнакова д.х.н. Шпигун Л.К.; сотрудникам УрГЭУ к.х.н. Алешиной Л.В., к.х.н. Шарафутдиновой Е.Н.; сотрудникам кафедры аналитической химии ХТИ УрФУ д.х.н. Козициной А.Н., к.х.н. Герасимовой Е.Л, Газизуллиной Е.Р. и заведующему кафедрой д.х.н. Матерну А.И. за содействие в организации и проведении представленных исследований.