

На правах рукописи



003494 161

Волков Владимир Анастольевич

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
2,2-ДИФЕНИЛ-1-ПИКРИЛГИДРАЗИЛА
С АНТИОКСИДАНТАМИ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

02.00.04 – Физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Тверь – 2010

25 MAR 2010

Работа выполнена на кафедре физической химии: ГОУ ВПО «Тверской государственный университет».

Научный руководитель доктор химических наук, профессор
Пахомов Павел Михайлович

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Ворончихина Людмила Ивановна
доктор химических наук, профессор
Шишкина Людмила Николаевна

Ведущая организация Институт химической физики
им. Н. Н. Семенова РАН

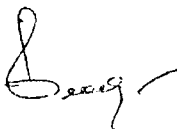
Защита диссертации состоится «18» марта 2010 г. в 15 часов 30 мин на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 212.263.02 при ГОУ ВПО «Тверской государственный университет» по адресу: 170002, г. Тверь, Садовый переулок, 35, ауд. 226.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ГОУ ВПО «Тверской государственный университет» по адресу: 170000, г. Тверь, ул. Володарского, 44а.

Автореферат разослан «15» февраля 2010 г.

С авторефератом можно ознакомиться на официальном сайте ТвГУ <http://university.tversu.ru/aspirants/abstracts/>.

Ученый секретарь совета по
защите докторских и кандидатских
диссертаций Д 212.263.02,
кандидат химических наук, доцент



Феофанова М. А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Антиоксиданты (АО), как вещества, предотвращающие зарождение и развитие свободнорадикальных процессов окисления, нашли широкое применение в химической, пищевой, косметической, фармацевтической промышленности, медицине и сельском хозяйстве; они являются неотъемлемой составной частью всех биологических систем. Свободные радикалы и реакции с их участием играют важную роль в этиологии и патогенезе многих заболеваний человека, а также в старении организма в целом.

Важнейшим источником природных АО являются лекарственные и пищевые растения. При этом значительный интерес представляет исследование антиоксидантных свойств не только веществ, выделенных в химически чистом виде, но и неочищенных растительных экстрактов, содержащих в своем составе сотни и тысячи компонентов, поскольку их суммарная антиоксидантная активность и другие полезные свойства часто превосходят таковые индивидуальных соединений (синергизм антиоксидантов).

В литературе предлагается большое число методов анализа количества и активности антиоксидантов в различных объектах. Эти методы основаны на разных модельных системах, зачастую недостаточно изученных. Вопрос о сопоставимости получаемых разными методами результатах во многих случаях остается открытым. Поэтому углубленное изучение существующих модельных реакций и поиск новых подходов к определению антиоксидантов и их активности является весьма актуальной задачей.

Прямые методы оценки антиоксидантной активности (АОА) как индивидуальных химических соединений, так и композиций сложного состава основаны на изучении влияния антиоксидантов на кинетику модельных реакций окисления углеводов, жирных кислот или биологических материалов, либо на конкуренции изучаемого и модельного АО за радикалы. На практике, однако, очень часто пользуются непрямыми методами, с помощью которых определяются параметры, коррелирующие с антиокислительной активностью антирадикальных антиоксидантов. К их числу относится метод, основанный на взаимодействии АО со стабильным хромоген-радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ). К его достоинствам относятся высокая воспроизводимость, простота выполняемых операций, общедоступность необходимого оборудования, высокая чувствительность, высокая селективность по отношению к антирадикальным АО. В экстрактах растений содержание веществ, взаимодействующих с ДФПГ, хорошо коррелирует с концентрацией фенольных соединений, что указывает на доминирующую роль последних в суммарной активности растительных экстрактов в отношении этого радикала.

Однако до сих пор не был разработан метод определения суммарной эффективной реакционной способности экстрактивных веществ растений в отношении стабильного радикала ДФПГ, полностью отвечающий правилам химической кинетики. Это связано, в частности, с тем, что почти во всех

органических растворителях реакция протекает с большой скоростью, что затрудняет кинетические исследования. Не до конца изучен механизм взаимодействия ДФПГ с антирадикальными АО. Имеющиеся в литературе данные о взаимосвязи химического строения АО и их активности в отношении ДФПГ, на основании которых можно было бы сделать важное заключение о степени сопоставимости этой активности со способностью АО ингибировать реакции цепного перекисного окисления липидов, ведомые алкилперекисными радикалами, основаны на использовании весьма произвольных кинетических параметров.

Цель работы: развитие теории и практики применения стабильного хромоген-радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила для определения количества и активности низкомолекулярных антиоксидантов растительного происхождения. Создание методики кинетического анализа суммарной антирадикальной активности антиоксидантов в экстрактах пищевых и лекарственных растений.

Для достижения поставленной цели предстояло решить следующие задачи:

- уточнить и усовершенствовать методику количественного анализа АО в экстрактах растений по их взаимодействию с радикалом ДФПГ;

- подобрать оптимальные условия проведения реакции АО растительного происхождения с радикалом ДФПГ для анализа их антирадикальной активности;

- выбрать и теоретически обосновать наиболее адекватный кинетический параметр для сравнительного анализа антирадикальной активности экстрактов пищевых и лекарственных растений;

- выявить корреляции химической активности фенольных АО в отношении радикала ДФПГ со строением и термодинамическими параметрами их молекул;

- уточнить механизм реакции фенольных АО со стабильным радикалом ДФПГ;

- провести оценку количества и активности антиоксидантов в экстрактах некоторых пищевых и лекарственных растений и сравнить данные, получаемые с использованием радикала ДФПГ, с результатами, даваемыми другими методами.

Научная новизна:

- впервые разработан кинетический метод анализа антирадикальной активности экстрактов пищевых и лекарственных растений по их реакции со стабильным радикалом ДФПГ, соответствующий правилам классической химической кинетики;

- выявлено, что зависимость глубины превращения ДФПГ при взаимодействии с АО экстрактов растений по окончании эксперимента (30 мин от момента смешивания реагентов) от начальной концентрации АО в реакционной системе носит линейный характер, независимо от вида экстракта, в интервале глубин превращения ДФПГ от 0 до 60%, что позволяет

производить экстерполяцию и интерполяцию результатов при количественном определении АО; учитывать поздние (медленные) стадии реакции путем увеличения времени реакции свыше 30 мин не целесообразно;

– установлено, что при использовании этанола в качестве реакционной среды введение кислоты существенно тормозит реакции стабильного радикала ДФПГ с экстрактивными веществами пищевых и лекарственных растений. Степень торможения находится в прямой зависимости от силы вводимой кислоты;

– определены значения концентрации HCl в реакционной среде (этанол), при которых достигается минимум скорости реакции АО экстрактов пищевых и лекарственных растений, а также некоторых индивидуальных фенольных АО, с ДФПГ и, соответственно, максимально подавляется протекание процесса по механизму SPLET (с. 8, формула 2), что позволяет нивелировать влияние на кинетику реакции органических кислот, содержащихся в экстрактах растений;

– установлено, что с увеличением концентрации HCl в реакционной среде (этанол) скорость реакции ДФПГ с фенольными АО растительного происхождения, после достижения минимума, начинает возрастать, что может быть объяснено осуществлением ионного механизма реакции параллельно как по схеме SPLET, так и по схеме ET – PT (с. 8, формула 3). Это устраняет противоречия, имеющиеся между публикациями ряда исследователей;

– установлено, что высокой химической активностью в отношении радикала ДФПГ в среде 0,1 мМ раствора HCl в этаноле обладают только фенольные АО, имеющие в своей структуре *орто*-диоксигруппу в ароматическом кольце, т.е. наблюдаются те же закономерности, что и при взаимодействии фенольных АО с алкилперекисными радикалами. При этом логарифмы констант скорости взаимодействия фенольных АО с ДФПГ линейно убывают с возрастанием значений расчетной энтальпии диссоциации фенольных ОН-групп антиоксидантов;

– установлено, что данные о количестве антиоксидантов в экстрактах растений, получаемые с помощью наблюдения за их реакцией с ДФПГ, хорошо коррелируют (коэффициент корреляции $r=0,95$) с результатами амперометрического количественного анализа АО.

Практическая значимость работы

• Разработанный кинетический экспресс-метод анализа антирадикальной активности экстрактов растений может быть использован в научно-исследовательской практике, а так же в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности для сравнительной оценки антирадикальных свойств продукции растительного происхождения и контроля ее качества.

• Выявление характера зависимости глубины превращения ДФПГ в избранных стандартных условиях проведения реакции его взаимодействия с АО экстрактов растений от начальной концентрации АО в реакционной

системе дает возможность с большей точностью проводить количественный анализ антирадикальных АО;

• Полученные данные о влиянии реакционной среды на скорость взаимодействия АО экстрактов растений со стабильным радикалом ДФПГ позволяют подобрать условия проведения реакции, при которых возможно наблюдение за процессом, начиная с малых глубин превращения, без использования специального оборудования для изучения кинетики быстрых реакций.

• Результаты, свидетельствующие о наличии сходных соотношений структуры и реакционной способности АО в отношении радикала ДФПГ и алкилперекисных радикалов, позволяют в первом приближении производить относительную оценку их активности при ингибировании целных свободнорадикальных окислительных процессов.

• Установленная корреляция между спектрофотометрическим и амперометрическим методами количественного анализа АО дает возможность проводить прямое сопоставление результатов, полученных этими методами.

Достоверность разработанных научных положений и сформулированных выводов обеспечена корреляцией полученных экспериментальных результатов с теоретическими, хорошей сопоставимостью с литературными данными, получением согласованных результатов сравнительных определений спектрофотометрического метода, основанного на взаимодействии АО с радикалом ДФПГ, с независимыми аналитическими электрохимическими и кинетическими методами.

На защиту выносятся:

1. Кинетический метод анализа суммарной антирадикальной активности АО экстрактов пищевых и лекарственных растений.

2. Условия проведения анализа суммарной антиоксидантной емкости экстрактов растений по взаимодействию их АО со стабильным радикалом ДФПГ и установленная корреляция получаемых величин с данными амперометрии.

3. Характер зависимости скорости реакции ДФПГ с индивидуальными фенольными АО природного происхождения, а также АО экстрактов пищевых и лекарственных растений, от реакционной среды и обоснование полученных закономерностей с точки зрения предполагаемого механизма реакции.

4. Установленная корреляция между реакционной способностью фенольных АО растительного происхождения в отношении синтетического стабильного радикала ДФПГ и алкилперекисных радикалов.

5. Взаимосвязь между реакционной способностью фенольных АО в отношении радикала ДФПГ и их химической структурой, а также величиной расчетной энтальпии диссоциации фенольных ОН-групп.

Апробация работы. Основные результаты диссертации доложены и обсуждены на следующих научных конференциях: VII Международной

конференции «Биоантиоксидант», Москва, 25 – 26 октября 2006 г.; III Всероссийской конференции молодых ученых «Окисление, окислительный стресс и антиоксиданты», Москва, 1-3 октября 2008 г.; Всероссийской научно-практической конференции «Исследования и достижения в области теоретической и прикладной химии», Барнаул, 24-26 сентября 2008 г.; VIII и IX Международных молодежных конференциях «Биохимическая физика» ИБХФ РАН – ВУЗы, Москва, 2008 – 2009 г.г.; XIII – XVI Региональных Каргинских чтениях, Тверь, 2006 – 2009 г.г.; конференции студентов и аспирантов Учебно-научного центра по химии и физике полимеров и тонких органических пленок (г. Дубна, 1 – 3 апреля 2002 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ (из них 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК для опубликования результатов диссертационных работ в области химических наук), список которых приведен в автореферате.

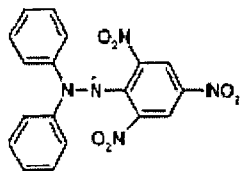
Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 199 наименований, изложена на 137 страницах текста, содержит 10 таблиц, 36 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность научного направления, практическая значимость и новизна, сформулирована цель исследования.

Глава 1. Природные антиоксиданты и их взаимодействие со свободными радикалами

В главе 1 представлен обзор литературных данных о химической структуре и механизмах действия низкомолекулярных АО растительного происхождения. Изложена общая характеристика методов анализа количества



Структурная формула радикала ДФПГ

и активности низкомолекулярных АО. Особое внимание уделено свойствам стабильного радикала ДФПГ и практике его применения для количественного анализа низкомолекулярных АО в различных системах.

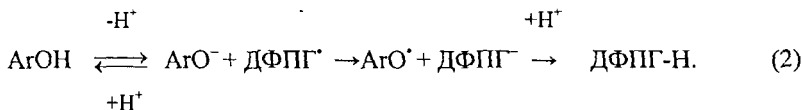
В видимой области спектра ДФПГ в органических растворителях имеет максимум поглощения на длине волны 517 нм, который исчезает при взаимодействии радикала с веществами – донорами атомов водорода или свободными радикалами иного строения.

Согласно имеющимся в литературе данным, при взаимодействии ДФПГ с фенольными АО перенос атома водорода на радикал может протекать, по меньшей мере, по двум независимым конкурирующим механизмам.

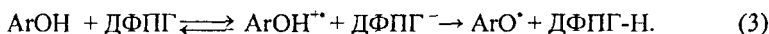
Радикальный механизм НАТ (hydrogen atom transfer), основанный на непосредственном отрыве атома водорода от молекулы АО, протекает с наибольшей скоростью в неполярных растворителях:



Вопрос о втором (ионном) механизме остается дискуссионным. Ряд исследователей считают, что он основан на передаче электрона молекулой ионизированного фенольного АО молекуле ДФПГ, преобладает в растворителях, имеющих высокое сродство к протону, и осуществляется по следующей схеме, которой дано название SPLET (sequential proton loss – electron transfer):



Другие авторы дают второму механизму название ET – PT (electron transfer – proton transfer) и считают, что он протекает по следующей схеме:



Глава 2. Объекты и методы исследования

Объектами настоящего исследования являются низкомолекулярные фенольные АО на примере 9 индивидуальных соединений: пирокатехина, *n*-оксибензойной, 3,4-диоксибензойной, галловой и кофейной кислот, хризина, (-)эпикатехина, кверцетина и рутина, а также АО, содержащиеся в экстрактах 16 пищевых и лекарственных растений.

В качестве основного метода исследования при изучении кинетики взаимодействия радикала ДФПГ с АО растительного происхождения, а также их количественном анализе, применялась УФ-спектроскопия.

Независимым методом сравнения при анализе количественного содержания низкомолекулярных АО в экстрактах растений по их взаимодействию с радикалом ДФПГ был амперометрический метод, основанный на электрохимическом окислении АО.

Выявленные корреляции «структура АО – реакционная способность в отношении ДФПГ» сопоставлялись с таковыми при взаимодействии этих же веществ с алкилперекисными радикалами, константы взаимодействия с которыми были рассчитаны И. Тихоновым и др. (I. Tikhonov et al. // Int. J. Chem. Kinet. – 2009. – Vol. 41. – P. 92-100) по кривым поглощения кислорода, определяемого волноометрически в модельной системе иницированного окисления стирола.

Значения энтальпии диссоциации фенольных ОН-групп антиоксидантов определяли методом аддитивных расчетов.

Математическая обработка данных, в том числе кинетических кривых, и получение констант скорости бимолекулярных реакций и других кинетических параметров, осуществлялись с использованием ПС Microcal Origin 7.0 и SYSTAT TableCurve 2Dv 5.01, в соответствии с общепринятыми методами химической кинетики.

Глава 3. Стандартизация экстрактов пищевых и лекарственных растений по концентрации антиоксидантов

Для более точного определения концентрации в экстрактах растений веществ, активных в отношении радикала ДФПГ, при проведении кинетических исследований, а также упрощения методики количественного анализа АО необходимо было установить характер зависимости глубины превращения ДФПГ за первые 30 мин реакции от начальной концентрации АО в реакционной системе, поскольку данные об этом в литературе отсутствуют. Установлено, что при глубинах превращения от 0 до 60% по окончании наблюдения процесса эта зависимость носит линейный характер (рис. 1).

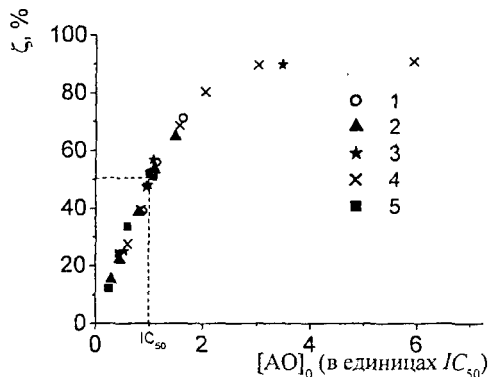


Рис. 1. Зависимость глубины превращения ДФПГ за первые 30 мин реакции (ζ) от относительной концентрации АО в экстрактах полыни обыкновенной (1), клевера лугового (2), пижмы обыкновенной (3), зверобоя продырявленного (4), тысячелистника обыкновенного (5).

в описанных условиях эксперимента 1 моль кверцетина взаимодействует с 4,35 моль ДФПГ, получаем формулу для расчета молярной концентрации АО в экстракте, $[AO]_{\text{экстр}}$ (моль/л), в пересчете на стехиометрию кверцетина:

$$[AO]_{\text{экстр}} = [ДФПГ]_0 \cdot V_{\text{сист}} \cdot \zeta / (4,35 \cdot V_{\text{ал}}), \quad (4)$$

где $[ДФПГ]_0$ — начальная концентрация ДФПГ в реакционной системе; $V_{\text{сист}}$ — объем реакционной системы, мл; ζ — глубина превращения ДФПГ через 30 мин после смешивания реагентов; $V_{\text{ал}}$ — объем аликвоты разбавленного экстракта, введенной в реакционную систему, мл.

Концентрация АО в образце, из которого был приготовлен экстракт, $[AO]_{\text{обр}}$ (ммоль/г), может быть рассчитана по формуле:

$$[AO]_{\text{обр}} = [AO]_{\text{экстр}} \cdot V_{\text{экстр}} / m, \quad (5)$$

где $V_{\text{экстр}}$ — объем полученного экстракта, мл; m — масса навески анализируемого образца, взятой для приготовления экстракта, г.

В качестве независимого метода оценки концентрации АО в пищевых и

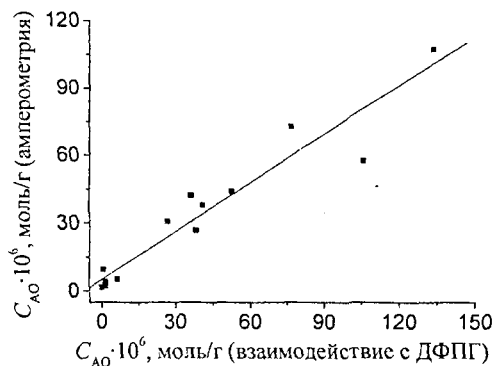


Рис. 2. Корреляционная связь между результатами количественного определения низкомолекулярных АО в различных пищевых и лекарственных растениях, полученными по методу, основанному на взаимодействии АО с радикалом ДФПГ и амперометрическому методу.

лекарственных растениях был использован амперометрический метод. На рис. 2 представлена корреляционная диаграмма, из которой очевидно, что методы дают хорошо сопоставимые результаты ($r=0,95$). Тангенс угла наклона линии регрессии равен $0,72 \pm 0,06$, что означает, что метод, основанный на взаимодействии АО с ДФПГ, дает результаты, превосходящие таковые, получаемые амперометрическим методом, в среднем в $1,4 \pm 0,1$ раза. Исключение составляют лук и чеснок, при анализе содержания АО в экстрактах которых амперометрический

метод демонстрирует результаты, приблизительно на порядок превышающие таковые по взаимодействию с ДФПГ. Таким образом, сопоставляемые методы анализа суммарной антиоксидантной емкости экстрактов растений взаимозаменяемы.

Глава 4. Изучение кинетики взаимодействия 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила с низкомолекулярными антиоксидантами растительного происхождения

Введение кислоты в реакционную среду оказывает существенное влияние на кинетические параметры взаимодействия фенольных АО со стабильным радикалом ДФПГ (рис. 3). В диапазоне концентраций HCl в этаноле от 0 до (0,02-0,1) мМ скорость расхождения ДФПГ монотонно снижается, после чего вновь возрастает.

Причиной снижения скорости процесса при введении в реакционную среду микроколичеств HCl является резкое замедление протекания реакции по механизму SPLET, так как повышение концентрации протонированных

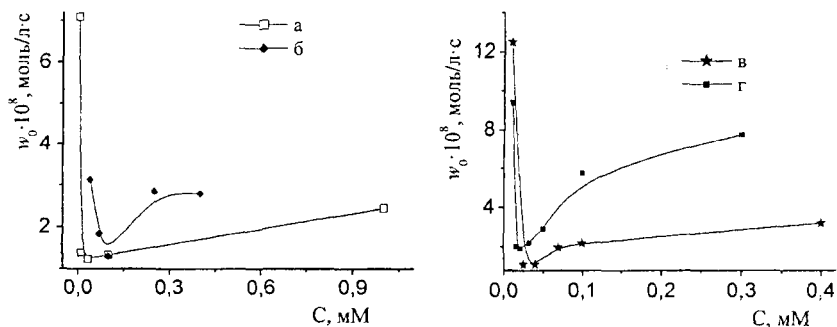
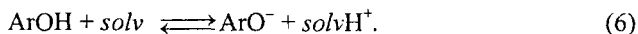


Рис. 3. Изменения начальной скорости реакции ДФПГ ($6,5 \cdot 10^{-5}$ М) с 10-5М галловой кислотой (а); $1,6 \cdot 10^{-5}$ М кофейной кислотой (б); 10-5М эпикатехином (в); $7,5 \cdot 10^{-6}$ М кверцетинном (г) при введении в реакционную среду (этанол) соляной кислоты в различной концентрации

молекул растворителя ($solvH^+$) вследствие введения сильной кислоты приводит к резкому смещению равновесия в сторону недиссоциированных молекул фенольного АО:



При дальнейшем повышении концентрации HCl, сопровождающемся ростом диэлектрической проницаемости среды, что способствует разделению ионных пар при протекании реакции по механизму ET – PT, наблюдается увеличение скорости расходования ДФПГ. Это служит подтверждением реализации этого механизма параллельно со SPLET.

При анализе данных о кинетике взаимодействия ДФПГ с АО экстрактов растений в среде этанола в присутствии кислот получены результаты, сходные с таковыми для индивидуальных фенольных АО.

Введение кислоты в реакционную систему уменьшает скорость процесса, причем при увеличении силы вводимой кислоты значение ее концентрации, соответствующее минимуму скорости реакции, уменьшается, а глубина этого минимума увеличивается. Графические данные, отображающие эти закономерности для пижмы обыкновенной, представлены на рис. 4 и 5.

Экстрактивные вещества пижмы обыкновенной, а также многих других изученных экстрактов растений имели минимумы скорости взаимодействия с радикалом ДФПГ при концентрации HCl в этаноле около 0,1 мМ. Исключение составили АО плодов цитрусовых и лукович луковых, которые реагировали с ДФПГ с минимальной скоростью в диапазоне концентраций HCl 1 – 10 мМ; последнее, возможно, связано с наличием в этих экстрактах фенольных соединений с более низкими, чем у большинства

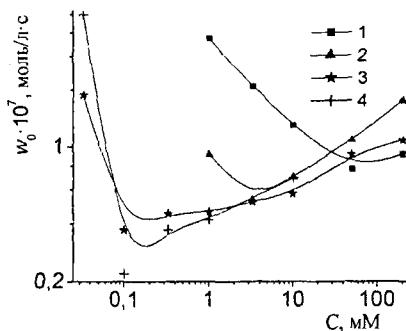


Рис. 4. Изменение начальной скорости реакции ДФПГ с АО экстракта пижмы обыкновенной при введении в реакционную систему кислот в различной концентрации: уксусной (1), монохлоруксусной (2), трихлоруксусной (3), хлороводородной (4). $[ДФПГ]_0 = 6,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $[АО]_0 = IC_{50}$

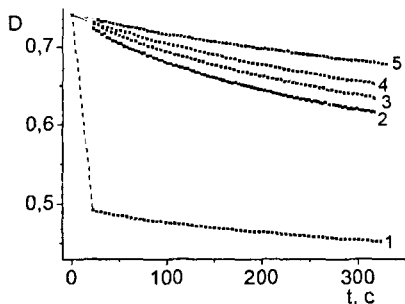


Рис. 5. Кинетические кривые падения оптической плотности ДФПГ при $\lambda = 517 \text{ nm}$ в ходе взаимодействия с АО спиртового экстракта пижмы обыкновенной: без подкисления среды (1); в присутствии 50 мМ уксусной кислоты (2); 3,3 мМ монохлоруксусной кислоты (3); 0,1 мМ трихлоруксусной кислоты (4); 0,1 мМ хлороводородной кислоты (5). $[ДФПГ]_0 = 6,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $[АО]_0 = IC_{50}$

других АО, значениями pK_a фенольных ОН-групп.

Сходство закономерностей изменения кинетических параметров реакции ДФПГ с экстрактивными веществами растений и чистыми фенольными АО при введении в реакционную среду хлороводорода подтверждает определяющую роль фенолов в суммарной антирадикальной активности спиртовых экстрактов растений.

По данным литературы, 1,4-диоксан является растворителем, в котором наблюдается замедление реакции ДФПГ с рядом фенольных АО по сравнению со всеми другими средами. Кинетические эксперименты с экстрактами лекарственных растений продемонстрировали, что начальные скорости их реакций с ДФПГ в среде 1,4-диоксана в большинстве случаев близки по величине к таковым, полученным в среде 0,1 мМ HCl в этаноле (реакции проводились при одинаковых начальных условиях).

Таким образом, в качестве реакционной среды для проведения кинетических исследований взаимодействия стабильного радикала ДФПГ с АО пищевых и лекарственных растений наиболее целесообразно использовать 0,1 – 10 мМ раствор HCl в этаноле. Данный выбор был сделан, исходя из следующего:

- 1) при извлечении природных АО из растительного сырья в качестве экстрагента чаще всего применяется этанол;
- 2) введение сильной кислоты в реакционную систему нивелирует влияние на кинетику процесса органических кислот, содержащихся в

экстрактах растений в разных концентрациях и имеющих разные значения pK_a ;

3) обеспечивается многократное по сравнению почти со всеми другими реакционными средами замедление процесса, который обычно протекает настолько быстро, что его наблюдение без применения специального оборудования для исследования кинетики быстрых реакций возможно только на поздних стадиях. Это позволяет проводить кинетические расчеты с максимальной точностью;

4) относительно малая токсичность этанола по сравнению с другими органическими растворителями, что делает безопасным для здоровья персонала метод анализа антирадикальной активности антиоксидантов, разрабатываемый настоящей работе.

Для изучения взаимосвязи химического строения и антирадикальной активности фенольных АО были экспериментально получены константы скорости их взаимодействия с радикалом ДФПГ в среде 0,1 мМ раствора HCl в этаноле, которые приведены в табл. 1. Частные порядки по реагирующим компонентам близки к 1, а общий порядок составляет около 2. Высокая реакционная способность антиоксиданта по отношению к радикалу ДФПГ, как и при взаимодействии с алкилперекисными радикалами, определяется наличием в его структуре *орто*-диоксигруппы в ароматическом кольце. Константы скорости взаимодействия с радикалами фенольных АО, не имеющих *орто*-диоксигруппы, на два-три порядка ниже. Наличие в ароматическом кольце карбоксильной группы (сильный электрофильный заместитель) понижает константу скорости при переходе от пирокатехина к 3,4-диоксибензойной кислоте с 4,1 до 1,3 л/моль·с. Отделение карбоксильной группы от ароматического кольца двумя атомами углерода (кофейная кислота) увеличивает k до 4,7 л/моль·с, превышая таковую для пирокатехина. Наличие в положении 1' эпикатехина электронодонорного заместителя приводит к повышению реакционной способности *орто*-диоксигруппы с возрастанием k до 8,1 л/моль·с. Наибольшей активностью в отношении ДФПГ обладает галловая кислота, имеющая рядовое расположение 3 ОН-групп.

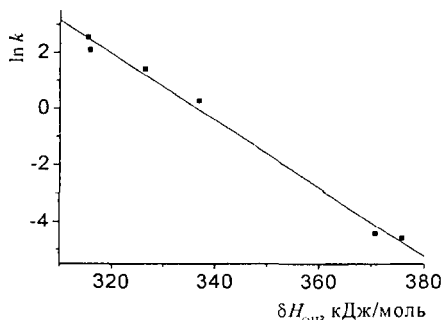
Таким образом, начальный (быстрый) этап реакции ДФПГ с фенольными АО определяется переходом атомов водорода с ароматических *орто*-диоксигрупп на радикал, в то время как на поздних стадиях процесса во взаимодействие вступают только одиночные фенольные ОН-группы. Поскольку эти группы обладают очень слабой ингибирующей активностью, при анализе суммарной антиоксидантной емкости экстрактов растений поздние стадии взаимодействия ДФПГ с АО можно не учитывать. Время реакции 10 – 30 минут при количественном анализе АО следует считать оптимальным. Увеличение этого времени до нескольких часов, предлагаемое

Таблица 1. Бимолекулярные константы скорости взаимодействия фенольных АО со стабильным радикаломДФПГ в среде 0,1 мМ раствора НСl в этаноле

№ п/п	Наименование АО	Структурная формула	k , л/моль·с
1	Пирокатехин		$4,1 \pm 0,4$
2	<i>п</i> -оксибензойная кислота		$\sim 10^{-2}$
3	3,4-диоксибензойная кислота		$1,3 \pm 0,1$
4	Галловая кислота		$12,7 \pm 0,3$
5	Кофейная кислота		$4,7 \pm 0,5$
6	Хризин		$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-2}$
7	Эпикатехин		$8,1 \pm 0,3$
8	Рутин		$3,7 \pm 0,1$

рядом исследователей, не обосновано. Данные об активности фенольных АО в отношении ДФПГ в первом приближении можно рассматривать как характеристику их антиокислительной активности, поскольку продукты окисления ароматических *орто*-диоксигрупп - *орто*-хиноны – вещества нерадикальной природы, неспособные вступать в реакции продолжения цепей окисления.

Логарифмы констант скорости взаимодействия фенольных АО с ДФПГ в среде 0,1 мМ раствора HCl в этаноле линейно убывают с возрастанием значений расчетной энтальпии диссоциации OH групп фенольных



ОН-групп антиоксидантов (рис. 6).
Автором предложено при определении суммарной активности экстрактивных веществ растений в отношении радикала ДФПГ использовать в качестве кинетического параметра начальную скорость реакции при описанных выше стандартных условиях.

Рис. 6. Корреляционная связь расчетной энтальпии диссоциации OH групп фенольных АО и логарифмов констант скорости их взаимодействия с радикалом ДФПГ в среде 0,1 мМ раствора HCl в этаноле

Зная начальную концентрацию АО в реакционной системе (в пересчете на стехиометрично кверцетина), можно определить эффективную

константу скорости реакции в начальный момент времени ($k_{эфф}^0$):

$$(k_{эфф}^0)_0 = w_0 / ([AO]_0 [ДФПГ]_0), \quad (7)$$

где w_0 – начальная скорость реакции.

По своему физическому смыслу $(k_{эфф}^0)_0$ есть сумма констант скоростей взаимодействия индивидуальных антиоксидантов с ДФПГ, умноженных на их мольную долю в сумме АО данного экстракта:

$$(k_{эфф}^0)_0 = k_1 \frac{(C_1)_0}{[AO]_0} + k_2 \frac{(C_2)_0}{[AO]_0} + \dots + k_n \frac{(C_n)_0}{[AO]_0}, \quad (8)$$

где $(C_1)_0, (C_2)_0, \dots, (C_n)_0$; k_1, k_2, \dots, k_n – начальные концентрации индивидуальных АО и соответствующие им константы скорости реакции с ДФПГ.

$k_{эфф}$ является переменной, монотонно убывающей величиной, поскольку в ходе реакции меняется состав АО в сторону уменьшения доли наиболее активных соединений, быстро расходующихся в начале процесса.

Значение величины w_0 , как и $(k_{эфф}^0)_0$, определяется, главным образом, величинами констант скорости и мольной долей в сумме АО наиболее активных компонентов, которые и вносят наибольший вклад в антиоксидантные свойства экстракта.

С помощью ПК Microcal Origin 7.0 и (независимо) SYSTAT TableCurve 2Dv 5.01 получено уравнение, аппроксимирующее все кинетические кривые взаимодействия ДФПГ с АО экстрактов растений с высокой точностью ($r^2 > 99,9\%$):

$$D_{ДФПГ} = D_\infty + A_1 \exp(-t/a_1) + A_2 \exp(-t/a_2), \quad (9)$$

где $D_{\text{ДФПГ}}$ – оптическая плотность раствора при $\lambda=517$ нм, t – время от начала реакции; D_{∞} , A_1 , A_2 , a_1 , a_2 – параметры, подбираемые программой. В программном меню Origin этому уравнению дано название «Exponential Decay – Second Order»; буквенные обозначения параметров автором изменены с учетом их физического смысла.

Таким образом, зная время от смешивания реагентов до начала регистрации кинетической кривой прибором и начальную оптическую плотность ДФПГ, можно экстраполировать кривую на начальный момент и вычислить начальную скорость реакции:

$$w_0 = (A_1/a_1 + A_2/a_2) \cdot \epsilon_{\text{ДФПГ}}^{-1}, \quad (10)$$

где $\epsilon_{\text{ДФПГ}}$ – молярный коэффициент экстинкции ДФПГ в этаноле, равный $(1,15 \pm 0,02) \cdot 10^4$ моль $^{-1}$ ·см $^{-1}$.

Применение уравнения (9) позволяет сгладить шумы на кинетических кривых и, таким образом, снизить погрешности при их дифференцировании.

Кинетические эксперименты продемонстрировали, что разработанный метод применим для анализа антирадикальной активности экстрактивных веществ самого разнообразного растительного сырья (табл. 2 на с. 17). Наибольшей из исследованных образцов антирадикальной активностью

обладал экстракт чая «Каркаде», а также соки плодов цитрусовых и лукович луковых, наименьшей – экстракты надземных частей лекарственных трав. Кинетические кривые, изображенные на рис. 7, демонстрируют, что антирадикальные свойства экстрактов растений характеризуются величиной эффективной константы скорости реакции с ДФПГ в начальный момент времени, а также количественным соотношением высоко- и низкоактивных компонентов. Это соотношение отражает форма кинетической кривой: резкое падение скорости расходования ДФПГ при небольших глубинах его превращения свидетельствует об

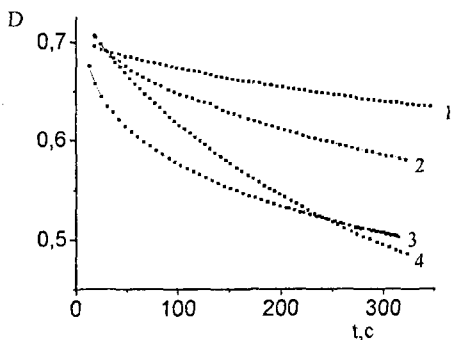


Рис. 7. Кинетические кривые падения оптической плотности раствора стабильного радикала ДФПГ при взаимодействии с АО экстрактов зверобоя продырявленного (1), яблока (2), чая «Каркаде» (3), апельсина (4). $[ДФПГ]_0 = 6,5 \cdot 10^{-5}$ М, $[АО]_0 = IC_{50}$

истощении высокоактивных АО.

Таблица 2. Результаты количественного определения и кинетического анализа низкомолекулярных антиоксидантов в некоторых пищевых и лекарственных растениях

№ п/п	Источник АО	Экстракт	Соотношение «навеска /экстракт», г/л	C _{АО} (в пересчете на кверцетин), мкмоль/г		w ₀ ·10 ⁸ , моль/л·с	(k _{эфф}) ₀ , л/моль·с
				ДФПГ	амперометрия		
1	Мята перечная	Этанол:вода (70:30)	10	106	57,6	2,0	41
2	Зверобой продырявленный	То же	10	134	107	2,1	43
3	Мелисса лекарственная	«	10	41,0	38,1	2,4	49
4	Тысячелистник обыкновенный	«	10	36,4	42,4	2,3	48
5	Ромашка аптечная	«	10	27	31	2,6	53
6	Пижма обыкновенная	«	8,3	53,0	44,0	2,0	41
7	Чай «Каркаде»	Вода	10	38,1	27	24	500
8	Яблоко	Этанол:вода (70:30)	10	1,69	2,15	5,0	100
9	Виноград красный	То же	10	6,6	5,3	4,3	87
10	Лимон	Этанол (96%)	100	1,75	3,6	12,5	256
11	Апельсин	То же	100	1,69	4,0	10,6	217
12	Грейпфрут	«	100	1,82	3,3	9,1	186
13	Лук	«	50	0,22	1,52	10,1	207
14	Чеснок	«	50	0,79	9,3	6,6	135

ПРИМЕЧАНИЕ. Кинетические параметры для АО экстрактов №№ 1-9 получены в среде 0,1 мМ раствора HCl в этаноле, экстрактов №№ 10-14 – 3,3 мМ раствора HCl в этаноле.

Основные результаты и выводы

1. Разработан кинетический метод анализа антирадикальной активности экстрактов пищевых и лекарственных растений по их реакции со стабильным радикалом ДФПГ, обладающий высокой воспроизводимостью, соответствующий правилам классической химической кинетики и учитывающий вклад наиболее активных АО, которые расходуются в самом начале реакции. Этот метод может быть использован для сравнительной оценки их активности в отношении алкилперекисных радикалов, ведущих цепи перекисного окисления липидных веществ, а также ингибирующей активности в отношении свободнорадикального цепного окисления липидов в биологических системах и пищевых продуктах, что создает предпосылки для внедрения этого метода в практику научно-исследовательских и промышленных лабораторий в медицине, сельском хозяйстве, пищевой и фармацевтической промышленности.

2. При анализе активности АО экстрактов пищевых и лекарственных растений в отношении радикала ДФПГ их стандартизацию по концентрации АО рекомендуется осуществлять при таких соотношениях начальной концентрации АО и радикала в реакционной системе, при которых по окончании эксперимента (10 – 30 мин от момента смешивания реагентов) глубина превращения ДФПГ находится в интервале от 0 до 60%. Учет поздних (медленных) стадий реакции не целесообразен.

3. Количественное определение антирадикальных АО в экстрактах растений по их взаимодействию с ДФПГ хорошо коррелирует ($r=0,95$) с аналогичными результатами, получаемыми амперометрическим методом, превышая их в среднем в $1,4 \pm 0,1$ раза, что свидетельствует о взаимозаменяемости указанных методов.

4. Проведение реакции низкомолекулярных АО растительного происхождения со стабильным радикалом ДФПГ в среде 0,1 – 10 мМ раствора HCl в этаноле позволяет снизить ее скорость примерно на два порядка путем подавления механизма SPLET, что обеспечивает возможность наблюдения процесса, начиная с малых глубин превращения, высокую точность расчетов кинетических параметров, а также нивелирует влияние на эти параметры органических кислот, которые содержатся в экстрактах растений.

5. Сходство закономерностей изменения кинетических параметров реакции ДФПГ с экстрактивными веществами растений и чистыми фенольными АО при введении в реакционную среду соляной кислоты подтверждает определяющую роль фенолов в суммарной антирадикальной активности спиртовых экстрактов растений.

6. Ионный механизм взаимодействия ДФПГ с фенольными АО в среде этанола может параллельно осуществляться как по схеме SPLET (перенос электрона с аниона фенольного АО) так и по схеме ET – PT (перенос электрона с неионизированного фенольного АО).

7. При взаимодействии радикалаДФПГ с фенольными АО растительного происхождения в среде 0,1 мМ раствора HCl этаноле наблюдаются закономерности «структура - антирадикальная активность», аналогичные таковым для реакции этих АО с алкилперекисными радикалами. Высокая антирадикальная активность соответствует наличию орто-диоксигруппы в ароматическом кольце, т.е. метод чувствителен преимущественно к фенолам, образующим при окислении орто-хиноны, неспособные к продолжению цепей окисления. Электрофильные заместители в ароматическом кольце понижают реакционную способность фенольных АО в отношении радикалаДФПГ, а электронодонорные в пара-положении к ОН-группе – увеличивают. Основным фактором, определяющим реакционную способность фенольных АО растительного происхождения в отношенииДФПГ в использованной реакционной среде, является энтальпия диссоциации фенольной ОН-группы.

Научные результаты диссертации использованы при выполнении проекта 2.1.1.6867 «Синтез и свойства новых наноструктурированных гидрогелей медицинского назначения на основе супрамолекулярных металлокомплексов» в рамках АВЦП «Развитие научного потенциала высшей школы (2009 – 2010 годы)».

Перечень публикаций по теме диссертации

Статьи в журналах из списка ВАК

1. Волков В. А. Кинетический метод анализа антирадикальной активности экстрактов растений / В. А. Волков, Н. А. Дорофеева, П.М.Пахомов // Химико-фармацевтический журнал. – 2009. – Т. 43, № 6. – С. 27 – 31.
2. Волков В. А. Кинетика взаимодействия радикалаДФПГ с экстрактивными веществами растений в различных средах / В. А. Волков, П.М.Пахомов // Ползуновский вестник. – 2008. – №3. – С. 309 – 313.

Статьи, опубликованные в научных изданиях

3. Волков В. А. Изучение кинетики взаимодействия антиоксидантов экстрактов лекарственных растений со стабильным радикаломДФПГ / В.А.Волков, Н. А. Дорофеева, С. Д. Хижняк, П. М. Пахомов // Биоантиоксидант. VII Международная конференция: Тез. докл. Москва, 25–26 октября 2006г. / Ин-т биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Ин-т химической физики им. Н. Н. Семенова РАН. – М., 2006. – С. 87-89.
4. Волков В. А. Кинетические исследования антирадикальной активности экстрактов лекарственных растений / В. А. Волков, Н. А. Дорофеева, П. М. Пахомов // Физико-химия полимеров: синтез, свойства, применение: Сб. тр. / Твер. гос. ун-т, Твер. регион.обществ. фонд им. акад. В. А. Каргина; отв.ред.: П. М. Пахомов. – Тверь, 2007. – Вып. 13. – С. 153-159.

5. Волков В. А. Сравнительный анализ содержания антиоксидантов в экстрактах некоторых лекарственных растений / В. А. Волков, П. М. Пахомов // Вестник Твер. гос. ун-та. Сер. «Биология и экология». – 2007. – Вып. 5, № 21 (49). – С. 64-67.

6. Волков В. А. Взаимодействие радикалаДФПГ с антиоксидантами растений как кинетическая модель при исследовании их антирадикальной активности / В. А. Волков, П. М. Пахомов // Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты. Всероссийская конференция молодых ученых и Школа им. академика Н. М. Эмачуэля: Доклады и тезисы. Москва, 1–3 октября 2008 г. / Ин-т химической физики им. Н. Н. Семенова РАН и др. – М., 2008. – С.160-162.

7. Волков В. А. Применение радикалаДФПГ для изучения антирадикальной активности экстрактов растений: методические проблемы и пути их решения / В. А. Волков, П. М. Пахомов // Труды VIII Ежегодной Международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика», 11–13 ноября 2008 г., Москва / Ин-т биохимической физики РАН. – М., 2008. – С. 46-49.

Технический редактор А.В. Жильцов
Подписано в печать 12.02.2010. Формат 60 × 84 1/16.
Усл. печ. л. 1,25. Тираж 100 экз. Заказ № 53.
Тверской государственный университет
Редакционно-издательское управление
Адрес: Россия, 170100, г. Тверь, ул. Желябова, 33.
Тел. РИУ: (4822) 35-60-63.