

На правах рукописи



Газизуллина Елена Ринатовна

**НОВЫЙ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИЙ СПОСОБ ОЦЕНКИ
АНТИРАДИКАЛЬНОЙ ЕМКОСТИ**

02.00.02 – Аналитическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Казань – 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 руководитель: **Иванова Алла Владимировна**
кандидат химических наук, доцент

Официальные оппоненты: **Короткова Елена Ивановна** доктор химических наук, доцент, профессор отделения Химической инженерии Инженерной школы природных ресурсов ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»
Зайцев Николай Конкордиевич доктор химических наук, доцент, заведующий кафедрой Энергетических технологий, систем и установок Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет»

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», г. Уфа

Защита состоится 6 июня 2019 года в 14 ч. 30 мин. на заседании диссертационного совета Д 212.081.30 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: ул. Кремлевская, 18, Химический институт им. А.М. Бутлерова, Бутлеровская аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» <http://www.kpfu.ru>. Отзывы на автореферат в двух экземплярах просим отправлять по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», отдел аттестации научно-педагогических кадров.

Автореферат разослан «___» апреля 2019 года

И.о. ученого секретаря диссертационного
совета Д 212.081.30, д.х.н., доцент

Г.К. Зиятдинова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Во всех живых организмах постоянно протекают реакции с образованием свободных радикалов, которые в избыточных количествах являются фактором разрушения макромолекул, структур клеток, что может привести к развитию различных заболеваний и патологических состояний. Ингибиторами свободнорадикальных реакций являются вещества – антиоксиданты, способные взаимодействовать с ними с образованием неактивных продуктов. Для исследования антиоксидантных/антирадикальных свойств соединений разработано большое количество способов с использованием модельных окислителей радикальной и нерадикальной природы. Среди них способы, базирующиеся на моделях окислителей радикальной природы, заслуживают большего внимания, поскольку они позволяют интерпретировать результаты анализа по отношению к живому организму.

Существующие способы оценки антирадикальных свойств соединений являются достаточно точными и информативными, однако, имеющиеся недостатки и ограничения, такие как сложность методики и аппаратуры, высокая стоимость приборов препятствуют их широкому использованию. Таким образом, создание более универсального и информативного способа определения антирадикальной емкости (APE) соединений с использованием модели окислителей радикальной природы является актуальной задачей аналитической химии.

Поскольку реакция между радикалами и антиоксидантами сопровождается протонно-электронным переносом, для исследования APE соединений целесообразно использовать электрохимические методы анализа, которые обладают рядом преимуществ: чувствительность, экспрессность, использование простого и недорогого оборудования с возможностью реализации его как в портативном, так и в on-line оформлении, возможность исследования мутных и окрашенных образцов. Перенос электрона с молекулы антиоксиданта на радикал сопровождается изменением электрохимических параметров системы, одним из которых является окислительно-восстановительный потенциал системы, что позволяет использовать потенциометрию в качестве способа регистрации этих процессов.

Степень разработанности темы исследования. Определение APE модельных антиоксидантов и многокомпонентных объектов является актуальной задачей при

поддержании оксидант-антиоксидантного баланса в организме и при лечении заболеваний, связанных с окислительным действием свободных радикалов на макромолекулы. Для исследования антирадикальных свойств объектов разработаны оптические, электрохимические методы анализа и метод ЭПР-спектроскопии, использование которых может быть затруднено ввиду некоторых их недостатков: сложность методик, использование дорогостоящего и трудного в рутинном анализе оборудования, невозможность, в ряде случаев, исследования окрашенных проб, использование сильных окислителей, проведение процедуры анализа в кислой или щелочной среде и сложность интерпретации результатов по отношению к живым организмам.

Поскольку процесс взаимодействия антиоксидантов с радикалами сопровождается протонно-электронным переносом, для определения АРЕ можно использовать простые и надежные электрохимические способы, которым в литературе уделяется мало внимания, а электрохимические способы с использованием радикал-генерирующих систем в литературе встречаются крайне редко. Среди электрохимических методов потенциометрия является достаточно простым и экспрессным методом анализа, которая позволяет использовать универсальные и недорогие приборы, исследовать мутные и окрашенные образцы, проводить анализ в разных средах.

Диссертационная работа является частью исследований, проводимых на кафедре аналитической химии УрФУ им. Б.Н. Ельцина в рамках грантов РНФ № 16-13-00008 и № 17-13-01096, гранта молодых ученых У.М.Н.И.К. – 2016.

Цель работы: создание нового потенциометрического способа определения антирадикальной емкости соединений на модели радикал-генерирующих систем.

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

1. Исследование и выбор модельной системы, включающей окислитель радикальной природы, позволяющий моделировать радикальные процессы, протекающие в живых организмах, и акцептор этих радикалов; изучение реакций взаимодействия свободных радикалов с акцептором;

2. Разработка нового потенциометрического способа определения скорости и константы скорости генерирования пероксильных радикалов, на примере реакции термического распада 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорида (AAPH) с использованием восстановленной формы металла в составе комплексного соединения в

качестве акцептора, включающего выбор условий проведения исследований (температура, концентрации);

3. Разработка потенциометрического способа определения АРЕ объектов с использованием ААРН в качестве модели окислителя на основании изученных закономерностей изменения потенциала системы в процессах генерирования свободных радикалов и ингибирования их антиоксидантами;

4. Описание алгоритмов процедуры анализа, выбор оптимальных условий формирования аналитического сигнала (влияние буферной емкости, ионной силы, рН раствора и концентраций соединений на результат анализа);

5. Определение АРЕ модельных антиоксидантов с разным числом и положением функциональных групп в молекуле;

6. Определение АРЕ экстрактов растительного сырья; проведение корреляционных исследований с известными методами анализа (потенциометрическим методом с использованием системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$, спектрофотометрическими методами с использованием реактива Folin–Ciocalteu и стабильного хромоген-радикала DPPH);

7. Оценка аналитических характеристик потенциометрического способа (расчет показателей точности и предела определения АРЕ).

Научная новизна работы. Впервые показана возможность изучения реакций ингибирования свободных радикалов антиоксидантами с использованием потенциометрического метода.

Предложен способ исследования кинетики реакции генерирования пероксильных радикалов потенциометрическим методом на модели радикал-генерирующей системы ААРН с использованием восстановленной формы металла в составе комплексного соединения. С помощью данного способа рассчитаны значения скорости и константы скорости генерирования пероксильных радикалов в условиях проведения определения АРЕ, согласующиеся с литературными данными.

Разработан новый потенциометрический способ определения АРЕ природных антиоксидантов, основанный на реакции взаимодействия пероксильных радикалов, образованных в результате распада ААРН, с антиоксидантами образца. Разработанным способом определена АРЕ модельных растворов антиоксидантов и объектов со сложной многокомпонентной матрицей. Показана высокая корреляция результатов определения

АРЕ новым потенциометрическим способом с известными потенциометрическим и оптическими методами на моделях окислителей радикальной и нерадикальной природы.

Теоретическая и практическая значимость работы. В работе представлены термодинамическое и кинетическое обоснования для выбора акцептора радикалов при исследовании реакций генерирования пероксильных радикалов. Установлен порядок реакции акцептора с радикалами. Оценены кинетические характеристики реакции генерирования пероксильных радикалов на модели ААРН в условиях близких к физиологическим.

Разработан потенциометрический способ определения кинетических характеристик реакции генерирования свободных радикалов с использованием в качестве акцептора радикалов восстановленную форму металла в составе комплексного соединения.

Теоретически обоснован и предложен простой и экспрессный потенциометрический способ определения АРЕ соединений разной химической природы с использованием радикал-генерирующих систем.

Определены антирадикальная емкость и коэффициенты ингибирования модельных антиоксидантов. Полученные данные согласуются с литературными. Оценен предел определения антирадикальной емкости и показатели точности определения АРЕ.

Показано и обосновано использование потенциометрического способа для исследования антирадикальных свойств сложных многокомпонентных объектов на примере экстрактов растительного сырья.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследования взаимодействия пероксильных радикалов с акцептором, полученные потенциометрическим методом;
2. Потенциометрический способ исследования кинетики реакции генерирования свободных радикалов на примере ААРН с использованием восстановленной формы металла в составе комплексного соединения;
3. Результаты определения скорости и константы скорости генерирования пероксильных радикалов предложенным потенциометрическим способом;
4. Результаты исследования закономерностей изменения потенциала в процессах генерирования свободных радикалов и ингибирования их антиоксидантами;

5. Новый потенциометрический способ определения АРЕ соединений с использованием радикал-генерирующей системы AAPH;
6. Результаты определения АРЕ модельных антиоксидантов, полученных предложенным потенциометрическим способом;
7. Результаты определения АРЕ объектов со сложной матрицей, исследованных предложенным потенциометрическим способом.

Методология и методы 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 модельной системы радикальной природы руководствовались современными наработками в области исследования радикальных реакций, для этого использовали мировые научные библиографические базы. При выборе реагента в качестве акцептора радикалов для оценки обратимости и окислительно-восстановительных свойств соединений использовали метод циклической вольтамперометрии. В качестве основного метода исследования антирадикальных свойств и кинетики генерирования радикалов был выбран потенциометрический, как наиболее простой, информативный, более полно отвечающий природе изучаемых процессов. В качестве методов сравнения выбраны спектрофотометрический метод определения противорадикальной активности на модели стабильного радикала DPPH, спектрофотометрический метод оценки общего содержания полифенолов, как наиболее точные, утвержденные ГОСТ методы анализа.

Степень достоверности результатов. Высокая степень достоверности работы обеспечена использованием современных методов исследования и современного оборудования для электрохимических и оптических измерений, а также статистической обработкой результатов.

Апробация работы. Результаты исследований, выполненные в рамках данной диссертационной работы, представлены на XX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Екатеринбург, 2016), XXVI Российской молодежной научной конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной химии» (Екатеринбург, 2016), IX Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа с международным участием и Молодежной научной школой (Екатеринбург – Леновка, 2016),

XXVII Российской молодежной научной конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной химии» (Екатеринбург, 2017), Третьем съезде аналитиков России (Москва, 2017), XXVIII Российской молодежной научной конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной химии» (Екатеринбург, 2018), World conference on Analytical and Bioanalytical Chemistry (Барселона, 2018).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 3 статьи, входящие в мировые базы Scopus и Web of Science, тезисы 8 докладов на всероссийских и международных научных конференциях. По результатам работ получены патенты на изобретение: № 2618426 (Дата приоритета 31.12.2015) и № 26121132 (Дата приоритета 16.07.2015) (общее число публикаций автора - 34, из них 5 статей, 2 патента, тезисы 27 докладов).

Личный вклад автора состоял в постановке и решении основных задач, проведении экспериментальных исследований потенциометрического определения кинетических характеристик генерирования пероксильных радикалов и потенциометрического определения АРЕ модельных антиоксидантов и многокомпонентных образцов, интерпретации и анализе полученных результатов.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 6 глав, заключения, списка литературы из 161 наименования. Содержит 154 страницы, 20 таблиц, 51 рисунок.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** раскрыта актуальность, степень разработанности темы исследования, сформулированы цели и задачи работы, определены научная новизна, практическая значимость и положения, выносимые на защиту диссертации.

В **первой главе** рассмотрены основные достижения в области исследования оксидантной и антиоксидантной системы организма, возможные механизмы тушения радикалов антиоксидантами. Описаны основные методы оценки антирадикальных / антиоксидантных свойств соединений, а также методы исследования кинетики генерирования свободных радикалов. Оценены их возможные достоинства и недостатки.

Во **второй главе** представлены сведения о материалах, реактивах, методологической и инструментальной базе диссертационного исследования.

Поскольку для расчета АРЕ объектов необходимо знать значение константы скорости генерирования пероксильных радикалов, полученное в условиях проведения определения АРЕ, **третья глава** посвящена исследованию кинетики реакции генерирования пероксильных радикалов потенциометрическим методом.

Для исследования кинетики реакции генерирования пероксильных радикалов был разработан потенциометрический способ с использованием восстановленной формы металла в составе комплексного соединения $[Me^{Red}L]$ в качестве акцептора радикалов. В качестве источника радикалов выбран азоинициатор ААРН, в результате термического распада которого образуются пероксильные радикалы ($RO_2^{\cdot}$), схожие с радикалами живого организма. Кроме того, ААРН является доступным реагентом со стабильной скоростью термического распада. Для моделирования процессов *in vivo*, все исследования проводили при 37°C в фосфатном буферном растворе (PBS) pH 7.4.

В основу принципа нового способа легла реакция взаимодействия $[Me^{Red}L]$ с генерируемыми радикалами, в результате которой образуется обратимая система типа $[M^{Ox}L] / [M^{Red}L]$. Потенциал системы подчиняется уравнению Нернста. Сдвиг потенциала системы зависит от количества генерируемых радикалов, вступивших во взаимодействие с $[M^{Red}L]$.

Расчет скорости генерирования проводили по уменьшению концентрации реагента $[Me^{Red}L]$ в каждый момент времени по формуле (1) исходя из разности потенциалов в момент времени t_1 и t_2 .

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

где $\varphi = 10^{(E_1 - E_2) \cdot n \cdot F / R \cdot T \cdot 2,303}$; $C([Me^{Red}L])^0$ и $C([Me^{Red}L])^{t_2}$ - концентрация $K_4[Fe(CN)_6]$ исходная и в момент времени t_2 , М; E_1 и E_2 – потенциалы, измеренные через промежуток времени $t_1 = t$ и $t_2 = ht$, В; h - отношение t_1 к t_2 .

Скорость генерирования пероксильных радикалов определяли по формуле (2):

$$W_i = d[C([Me^{Red}L])]/dt, \quad (2)$$

Константу скорости генерирования пероксильных радикалов (k_i) рассчитывали по формуле (3):

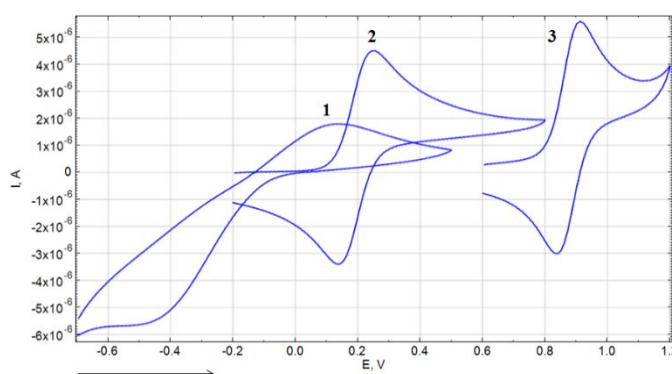
$$k_i = W_i / 2 \cdot C_{AAPH} \quad (3)$$

где $C_{(AAPH)}$ -концентрация инициатора ААРН, М.

При выборе реагента в качестве акцептора радикалов руководствовались следующими требованиями: комплексное соединение должно быть хорошо обратимой окислительно-восстановительной системой; устойчиво в условиях эксперимента, близких к физиологическим; эффективность выбранного акцептора (более высокая скорость реакции радикала с реагентом относительно скорости генерирования радикалов); коэффициент ингибирования акцептора должен быть равным 1; существование термодинамической вероятности протекания реакции между генерируемыми радикалами и реагентом.

В качестве реагентов были выбраны комплексы железа, широко используемые в электрохимических методах анализа, в частности, в потенциометрии: $[Fe(II)-EDTA]^{2-}$, $[Fe(Phen)_3]^{2+}$, $[Fe(CN)_6]^{4-}$. Окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) комплексного соединения сильно зависит от природы лиганда, входящего в его состав, что дает возможность выбрать соединение с необходимым ОВП.

На рисунке 1 приведены циклические вольтамперограммы исследуемых комплексов железа (II). Концентрация реагентов составила 0.3 мМ. Фон - 0.1 М KCl. Скорость развертки 0.1 В/с.



1 - $[Fe(II)-EDTA]^{2-}$, 2 - $[Fe(CN)_6]^{4-}$, 3 - $[Fe(Phen)_3]^{2+}$ Рисунок 1 – Циклические вольтамперограммы комплексов железа (II), зарегистрированные на толсто пленочном углеродсодержащем электроде

По полученным данным рисунка 1 можно сделать вывод, что для системы $[Fe(Phen)_3]^{3+}/[Fe(Phen)_3]^{2+}$ характерно достаточно высокое значение окислительно-восстановительного потенциала в положительной области потенциалов, что затрудняет его взаимодействие с радикалами. Система $[Fe(II)-EDTA]/[Fe(III)-EDTA]^{2-}$ недостаточно обратима, что может привести к искажению результатов ввиду неустойчивости равновесия окислительно-восстановительной системы. Дальнейшие исследования проводили с использованием $K_4[Fe(CN)_6]$.

При добавлении в реакционную смесь акцептора, радикалы вступают в реакции рекомбинации и взаимодействия с реагентом. При высокой концентрации акцептора

($K_4[Fe(CN)_6]$) практически все образующиеся радикалы реагируют с $K_4[Fe(CN)_6]$. При этом квадратичной гибелью $RO_2^\bullet$ можно пренебречь, и скорость расщедования $K_4[Fe(CN)_6]$ равна скорости инициирования (4):

$$-d[K_4[Fe(CN)_6]] / dt = d[K_3[Fe(CN)_6]] / dt = W_i \quad (4)$$

Таким образом, при расчете скорости генерирования радикалов необходимо, чтобы концентрация $K_4[Fe(CN)_6]$ была достаточной для подавления квадратичной гибели радикалов; скорость взаимодействия радикалов с $K_4[Fe(CN)_6]$ должна быть несоизмеримо выше скорости генерирования самих радикалов.

Концентрацию $K_4[Fe(CN)_6]$, необходимую для подавления квадратичной гибели радикалов можно оценить через величину k_3 , которая характеризует активность $K_4[Fe(CN)_6]$ в реакции с оксидантом $RO_2^\bullet$ (5):

$$[K_4[Fe(CN)_6]] \gg 2k_2 \cdot [RO_2^\bullet] / k_3 \gg (2k_2 \cdot W_i)^{0.5} / k_3 \quad (5)$$

Определить величину k_3 можно из анализа кинетических кривых расщедования $K_4[Fe(CN)_6]$ при относительно высоких значениях скорости генерирования и малых концентрациях $K_4[Fe(CN)_6]$, когда радикалы вступают, преимущественно, в реакции рекомбинации. Скорость расщедования $K_4[Fe(CN)_6]$ в этом случае равна (6):

$$-d[K_4[Fe(CN)_6]] / dt = a[K_4[Fe(CN)_6]] \quad (6)$$

Интегральные кинетические кривые описываются уравнением 1-го порядка (7):

$$\ln [K_4[Fe(CN)_6]] = \ln [K_4[Fe(CN)_6]]_0 - a \cdot t \quad (7)$$

где $a = k_3 \cdot [RO_2^\bullet]$. При $[K_4[Fe(CN)_6]] \rightarrow 0$ концентрация $[RO_2^\bullet] \rightarrow (W_i/2k_2)^{0.5}$, а величина $a \rightarrow k_3 \cdot (W_i/2k_2)^{0.5}$.

Определение скорости взаимодействия и константы взаимодействия $K_4[Fe(CN)_6]$ с пероксильными радикалами k_3 проводили при концентрациях ААРН 0.05 М и 0.01 М.

На рисунке 2 представлены кинетические кривые расщедования $K_4[Fe(CN)_6]$ на примере 0.05 М ААРН, которые представляют собой параллельные прямые с наклоном, равным скорости инициирования радикалов (А) и кривые расщедования $K_4[Fe(CN)_6]$ в полулогарифмических координатах, взятого в меньших концентрациях на примере 0.1 М ААРН (В).

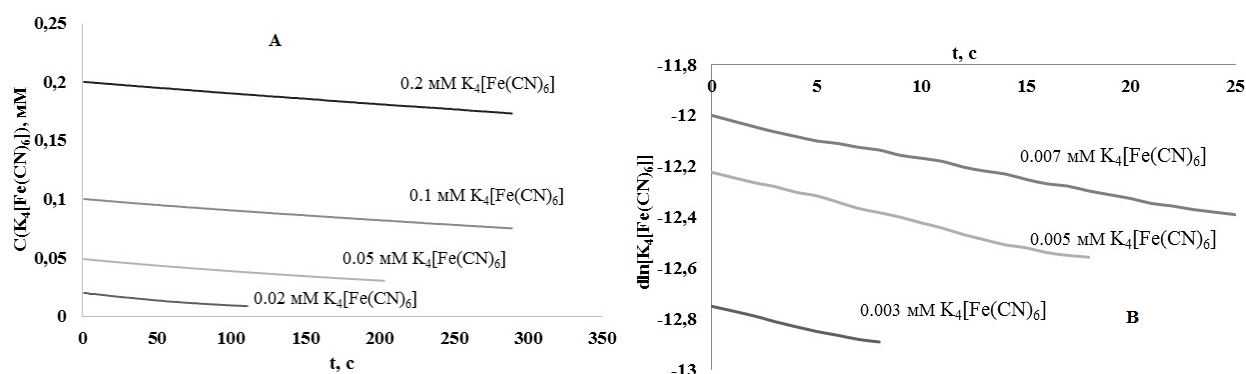


Рисунок 2 – Кинетические кривые расходования $K_4[Fe(CN)_6]$ при взаимодействии с радикалами из 0.05 М ААРН в PBS при 37⁰С (А) и в полулогарифмических координатах для 0.1М ААРН (В)

В таблице 1 представлены значения скорости расходования $K_4[Fe(CN)_6]$ при взаимодействии с радикалами из 0.1М ААРН в PBS при 37⁰С.

Таблица 1 - Скорость расходования $K_4[Fe(CN)_6]$ при взаимодействии с радикалами из 0.1 М ААРН (PBS, 37⁰С, n = 5, P=0.95)

$C(K_4[Fe(CN)_6]), \text{мМ}$	$-d[K_4[Fe(CN)_6]] / dt, 10^7 \text{М} \cdot \text{с}^{-1}$	S_r
0.003	0.77 ± 0.02	0.02
0.005	1.05 ± 0.02	0.02
0.010	1.31 ± 0.03	0.02
0.030	1.72 ± 0.03	0.02
0.040	2.02 ± 0.02	0.01
0.100	2.01 ± 0.02	0.01
0.300	1.95 ± 0.04	0.02
0.500	1.97 ± 0.02	0.01

Исходя из полученных данных, при концентрациях реагента $K_4[Fe(CN)_6] \geq 0.01 \text{мМ}$ значения скорости расходования акцептора не имеют статистически значимой разницы и составляют значение $(1 \pm 0.03) \cdot 10^{-7} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$ ($S_r=0.03$) для 0.05 М ААРН. Для 0.1М ААРН значения расходования акцептора не имеют статистически значимой разницы при концентрации $K_4[Fe(CN)_6] \geq 0.04 \text{мМ}$ и составляют значение $(2 \pm 0.04) \cdot 10^{-7} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$ ($S_r=0.02$). В данных диапазонах концентрации акцептора достаточно для подавления квадратичной гибели радикалов, таким образом, все образующиеся пероксильные радикалы вступают в реакции взаимодействия с акцептором. Из этого следует, что при концентрациях $K_4[Fe(CN)_6] \geq 0.01 \text{мМ}$ для 0.05 М ААРН и $K_4[Fe(CN)_6] \geq 0.04 \text{мМ}$ для 0.1 М ААРН скорость расходования акцептора соответствует скорости генерирования радикалов. Константа

скорости генерирования пероксильных радикалов в обоих случаях составила $1.00 \cdot 10^{-6} \text{ c}^{-1}$, можно считать, что условие (4) выполняется.

Таким образом, 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. Это позволяет проводить опосредованное определение скорости генерирования по реакции образующихся радикалов с $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

На рисунке 3 приведена зависимость начального наклона полулогарифмических анаморфоз кривых изменения концентрации $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ от исходной концентрации $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

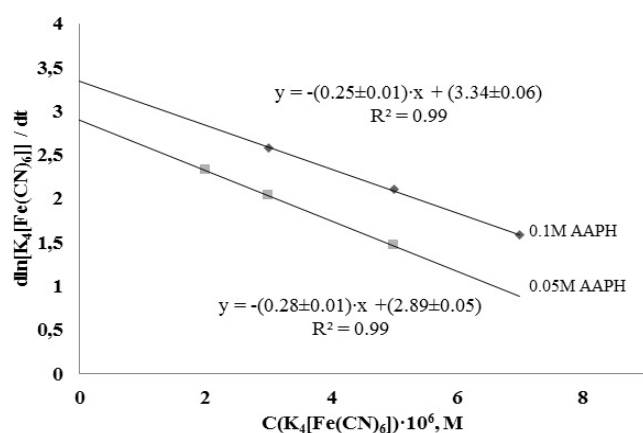


Рисунок 3 — Зависимость параметра a от начальной концентрации $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$

Кривые линейизируются в полулогарифмических координатах и тангенс угла наклона 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 высокую эффективность выбранного реагента $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ в качестве акцептора радикалов.

В таблице 2 приведены соответствующие значения скорости и константы скорости генерирования пероксильных радикалов, полученные при разных концентрациях ААРН в PBS при 37°C.

Линейная зависимость ($R^2=0.99$) скорости генерирования пероксильных радикалов от концентрации инициатора указывает на первый порядок реакции по ААРН, что подтверждает достоверность расчетов скорости генерирования по формуле (2).

Таблица 2 – Кинетические характеристики генерирования 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 ± 0.01	0.01	1.00 ± 0.01
0.10	2.00 ± 0.04	0.02	1.00 ± 0.02
0.15	2.87 ± 0.03	0.01	0.96 ± 0.01
0.20	3.83 ± 0.11	0.03	0.96 ± 0.03
0.30	5.39 ± 0.11	0.02	0.90 ± 0.02
			$k_{icp} \cdot 10^6 = 0.96 \pm 0.04 \text{с}^{-1} (S_r=0.04)$

Значение скорости и константы скорости генерирования пероксильных радикалов при концентрациях ААРН $C_{AAPH} = (0.05 - 0.3) \text{ М}$ составили $W_i = (1.05 - 5.39) \cdot 10^{-7} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$, $k_{icp} = (1.00 \pm 0.02) \cdot 10^6 \text{ с}^{-1}$.

Определение кинетических параметров реакций представляет важное значение для аналитической химии, особенно, при изучении ингибирующих свойств соединений. В данном случае, полученное значение константы скорости генерирования пероксильных радикалов будет использоваться далее при расчете антирадикальной емкости потенциометрическим способом.

Глава 4 посвящена разработке нового потенциометрического способа определения АРЕ соединений на основе изученных закономерностей изменения потенциала в процессах генерирования пероксильных радикалов и ингибирования их антиоксидантами.

Известно, что ингибирование свободных радикалов антиоксидантами сопровождается протонно-электронным переносом. Это дает основание предполагать изменение окислительно-восстановительного потенциала системы в процессах как генерирования радикалов, так и ингибирования их антиоксидантами, а, следовательно, возможность использовать потенциометрический метод для исследования вышеупомянутых процессов.

Условия эксперимента подобраны наиболее близко к физиологическим: фосфатный буферный раствор PBS pH 7.4, температура 37°C .

На рисунке 4 представлены кинетические кривые изменения потенциала (А), зарегистрированные в растворе 0.1 М ААРН (1) и при введении аскорбиновой кислоты

($C_{AK} = 0.2 \text{ мМ}$) в раствор ААРН (2) (t_1 – момент введения аскорбиновой кислоты в раствор ААРН, t_2 – момент полного расходования аскорбиновой кислоты). Определение момента полного расходования антиоксиданта соответствует точке перегиба кривой t_2 , которую по интегральной кривой зависимости потенциала от времени достаточно сложно определить с высокой точностью. Для этого нами предложено использовать момент максимальной скорости изменения потенциала $(dE/dt)_{\max}$, являющегося максимумом производной функции зависимости потенциала от времени при введении антиоксиданта в раствор ААРН (Рисунок 4 В).

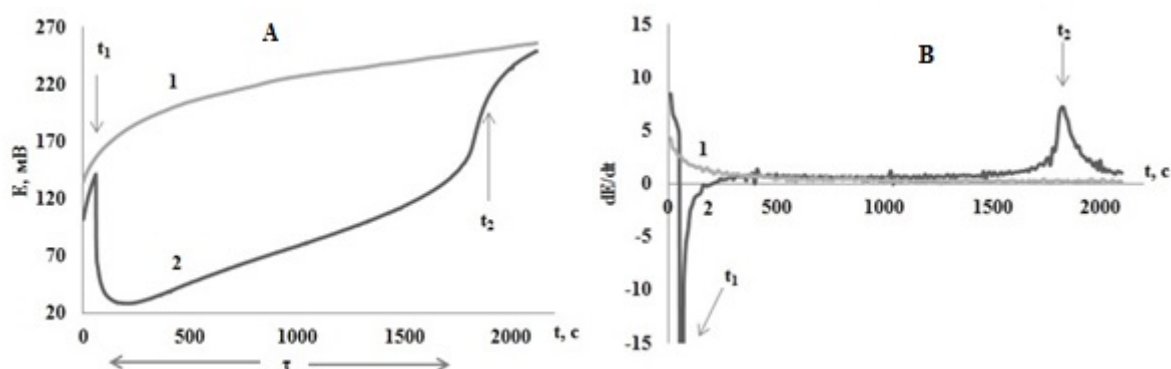
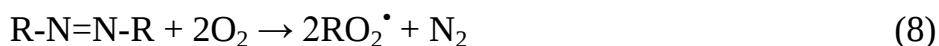
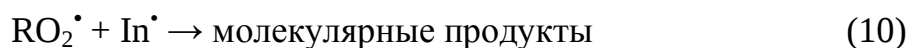
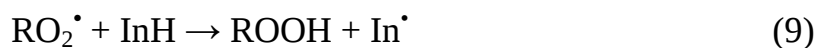


Рисунок 4 – Кинетическая кривая (А) и производная зависимости (В) изменения потенциала от времени при добавлении к 0.1М ААРН аскорбиновой кислоты ($C_{AK} = 0.2 \text{ мМ}$)

На рисунке 4 до точки t_1 наблюдается рост потенциала за счет генерирования пероксильных радикалов в системе (8).



Введение в электрохимическую ячейку ингибиторов (InH) радикальных реакций (t_1) сопровождается снижением потенциала системы в результате взаимодействия ингибиторов с пероксильными радикалами по реакциям (9 - 11):



Завершение периода индукции, то есть времени полного расходования антиоксиданта в реакционной смеси, сопровождается резким повышением потенциала (t_2). В данной работе нами предлагается определять период индукции как время от введения антиоксиданта в раствор инициатора до точки, соответствующей максимальной скорости изменения потенциала $(dE/dt)_{\max}$ (t_2).

Антирадикальная емкость (АРЕ) рассчитывается по формуле (12):

$$\text{АРЕ} = f[\text{InH}] = k_i \cdot [\text{AAPH}] \cdot \tau \quad (12)$$

где АРЕ – антирадикальная емкость, М-экв; τ – период индукции, с; $[\text{InH}]$ – концентрация антиоксиданта, М; k_i – константа скорости генерирования пероксильных радикалов, с^{-1} ; $[\text{AAPH}]$ – концентрация инициатора радикалов, М; f – коэффициента ингибирования, который показывает, сколько обрывов радикальных цепей приходится на одну молекулу ингибитора.

В данном случае под антирадикальной емкостью подразумевается эффективная эквивалентная концентрация антиоксидантов, вступивших в реакцию с радикалами.

Для регистрации сигнала использовали платиновый рабочий электрод и хлорид-серебряный электрод сравнения.

В работе для определения АРЕ использован метод постоянной ионной силы, где в качестве электролита выбран фосфатный буферный раствор (PBS) с высокой буферной емкостью. С целью исключения влияния ионной силы и буферной емкости на результаты проводили исследования АРЕ аскорбиновой кислоты ($C_{\text{АК}} = 0.1 \text{ мМ}$) при разных суммарных концентрациях солей NaH_2PO_4 и K_2HPO_4 фосфатного буфера (таблица 3).

Таблица 3 – АРЕ аскорбиновой кислоты при разных суммарных концентрациях солей NaH_2PO_4 и K_2HPO_4 фосфатного буфера ($C_{\text{ААРН}} = 0.1$, pH 7.4, 37°C , $n = 5$, $P = 0.95$)

№ п/п	$\Sigma C_{\text{соли}}$, М	АОЕ, 10^4 М-экв	S_r
1	0.014	2.11 ± 0.01	0.05
2	0.027	2.10 ± 0.01	0.04
3	0.067	2.12 ± 0.01	0.05
4	0.135	2.51 ± 0.01	0.03

Таким образом, в диапазоне суммарной концентрации солей NaH_2PO_4 и K_2HPO_4 от 0.014 до 0.067 влияние ионной силы на результаты измерений не обнаружено. На основании этих исследований выбран PBS с суммарной концентрацией солей 0.067 М (ионная сила 0.120, буферная емкость 0.031 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 ходе взаимодействия антиоксиданта с радикалами ААРН отбирали аликвоту через определенные промежутки времени и анализировали раствор известным

потенциометрическим методом с использованием системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ в качестве модели окислителя. В таблице 4 представлены результаты определения периода индукции, полученные из производной зависимости потенциала от времени (τ^*) и найденные экстраполяцией зависимости остаточной концентрации антиоксидантов от времени взаимодействия (τ^{**}).

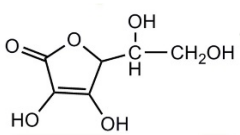
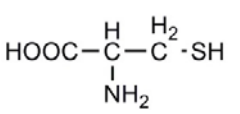
Таблица 4 – Результаты определения периода индукции аскорбиновой кислоты и цистеина при разных концентрациях ($n=5$, $P=0.95$)

Антиоксиданты	C, mM	τ^* , мин	S_r	τ^{**} , 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

Статистически значимых различий между полученными значениями не выявлено. Таким образом, определение периода индукции по точке максимальной скорости изменения потенциала $(dE/dt)_{\max}$ является обоснованным.

Проведено определение АРЕ модельных растворов аскорбиновой кислоты и цистеина при разных концентрациях (Таблица 5).

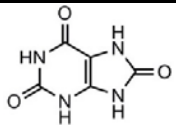
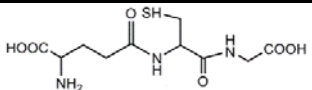
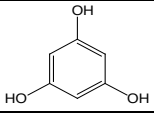
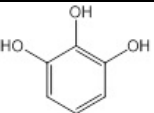
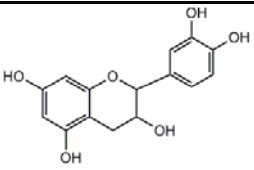
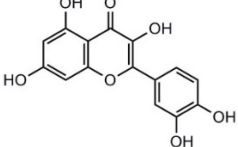
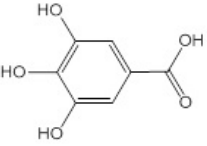
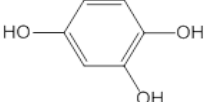
Таблица 5 – АРЕ, период индукции и коэффициент ингибирования модельных растворов аскорбиновой кислоты и цистеина ($C_{AAPH}=0.1M$, $n=5$, $P=0.95$)

Антиоксидант	Структурная формула	C, mM	АРЕ, mM-экв	τ , мин	f	S_r
Аскорбиновая кислота		0.10	0.22±0.01	18.2	2.2	0.05
		0.20	0.36±0.04	30.2	1.8	0.01
		0.30	0.44±0.02	34.5	1.5	0.04
		0.40	0.52±0.05	42.8	1.3	0.01
Цистеин		0.10	0.13±0.01	11.5	1.3	0.01
		0.20	0.20±0.01	18.1	1.0	0.05
		0.30	0.23±0.04	20.0	0.8	0.02
		0.40	0.32±0.03	27.2	0.7	0.01

Коэффициент ингибирования уменьшается с ростом концентрации, что согласуется с литературными данными.

Предложенным способом определена АРЕ растворов модельных антиоксидантов, содержащих -ОН, -NH, -SH функциональные группы. Результаты приведены в таблице 6.

Таблица 6 – АРЕ, период индукции и коэффициент ингибирования модельных растворов антиоксидантов ($C_{AAPH}=0.1M$, $C_{AO}=10^{-4} M$; $n=5$, $P=0.95$)

Антиоксидант	Структурная формула	τ , мин	f	АРЕ, 10^4 mM-экв	S_r
Мочевая кислота		26.2	3.1	3.07 ± 0.39	0.05
Глутатион		10.8	1.3	1.31 ± 0.34	0.02
Флороглucin		17.7	2.1	2.07 ± 0.83	0.07
Пирогаллол		27.8	3.2	3.23 ± 0.37	0.05
Катехин		35.6	4.2	4.23 ± 0.05	0.02
Кверцетин		24.2	2.9	2.85 ± 0.06	0.02
Галловая кислота		13.0	4.1	4.12 ± 0.21	0.05
Гидрохинон		31.8	3.8	3.75 ± 0.04	0.01
Оксигидрохинон		7.2	0.9	0.85 ± 0.03	0.03

Коэффициенты ингибирования изученных антиоксидантов принимают значения от 1 до 4, что связано как с количеством активных групп в молекуле антиоксиданта, так и с механизмом обрыва цепей на молекуле антиоксиданта.

Согласно критерию 3σ , предел обнаружения АРЕ в водных растворах составил $6.20 \cdot 10^{-6} M$ - экв ($n = 5$, $P = 0.95$), что является достаточной величиной для определения АРЕ объектов с малым содержанием ингибитора.

Таким образом, в данной работе предложен оригинальный прямой способ определения АРЕ на основании изученных зависимостей изменения потенциала в процессах генерирования радикалов и ингибирования их антиоксидантами. Предложенный новый способ позволяет определять как кинетические характеристики, такие как период индукции, так и термодинамические характеристики, а именно коэффициент ингибирования антиоксидантов. Новый потенциометрический способ является достаточно информативным, простым в исполнении, не требует дорогостоящего оборудования и реактивов, позволяет проводить исследования разных по составу проб, получать воспроизводимые результаты.

В *Главе 5* представлены результаты определения АРЕ экстрактов растительного сырья. В качестве объектов выбраны экстракты чая разных сортов и марок, водные и этанольные экстракты лекарственного растительного сырья, приобретенного в аптечной сети. Описаны сравнительные исследования антирадикальных свойств экстрактов с известными способами: потенциометрический способ определения антиоксидантной емкости (АОЕ) с использованием системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$, спектрофотометрический способ определения общего содержания полифенолов с использованием реактива Folin–Ciocalteu и спектрофотометрический способ определения противорадикальной активности (ПРА) с использованием радикала DPPH.

На рисунке 5 представлены результаты АРЕ и АОЕ экстрактов чая.

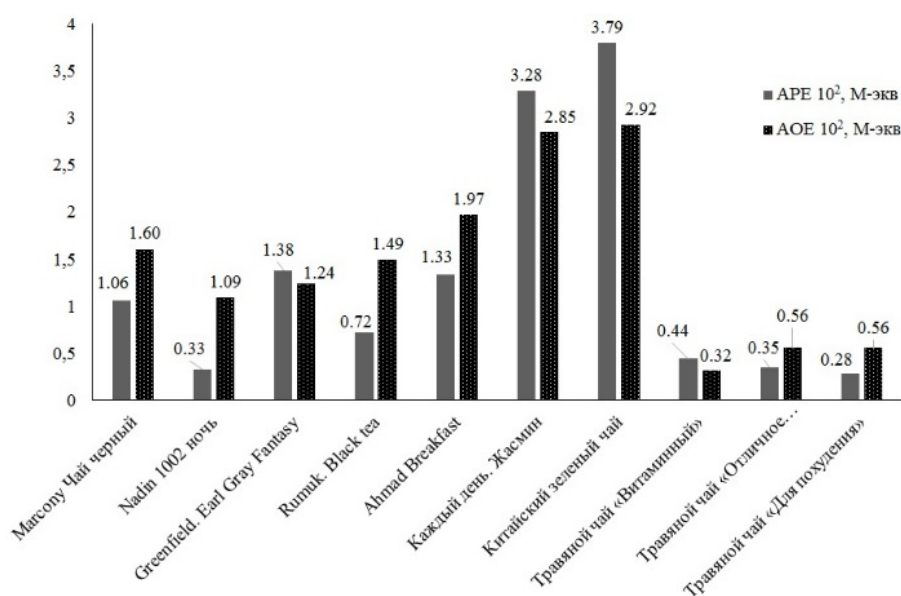


Рисунок 5 – АРЕ и АОЕ разных сортов чая ($P=0.95$; $n=5$)

Степень корреляции двух способов составила 0.85. Разница в значениях АРЕ и АОЕ связаны с использованием моделей окислителей разной природы. В случае исследования АОЕ потенциометрическим методом возможными источниками погрешности результатов анализа могут являться влияние матрицы исследуемого объекта на установление равновесного потенциала системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ и возможное комплексообразование полифенолов с железом.

На рисунке 6 представлены результаты АРЕ и общего содержания полифенолов в эквивалентах галловой кислоты ($C_{ГК}$) водных экстрактов лекарственного растительного сырья.

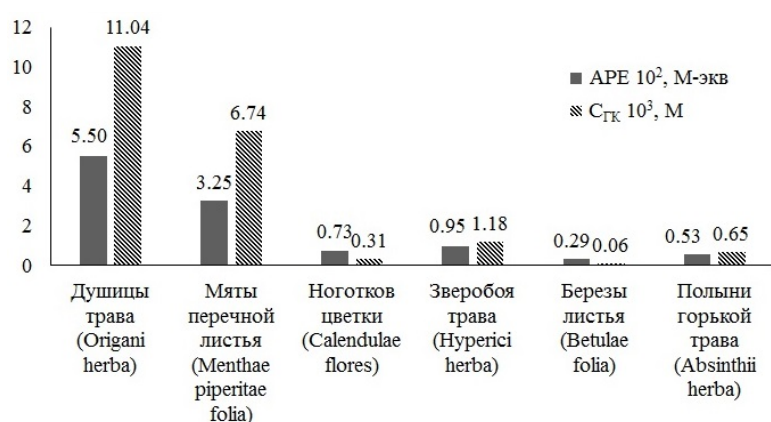


Рисунок 6 – АРЕ и общее содержание полифенолов водных экстрактов лекарственного растительного сырья ($C_{AAPH} = 0.1$ М, $n = 10$, $P = 0.95$)

Степень корреляции результатов АРЕ и общего содержания полифенолов составил 0.99. Разница в абсолютных значениях связана с разной природой используемых радикальных моделей, а также с тем фактом, что спектрофотометрическим способом результаты получены в эквивалентах галловой кислоты.

Результаты АРЕ и ПРА этанольных экстрактов лекарственного растительного сырья представлены на рисунке 7. Степень корреляции результатов АРЕ и ПРА составляет 0.97. Разница в абсолютных значениях связаны с разной природой используемых радикальных моделей, а также с тем фактом, что оптическим методом результаты получены в эквивалентах аскорбиновой кислоты.

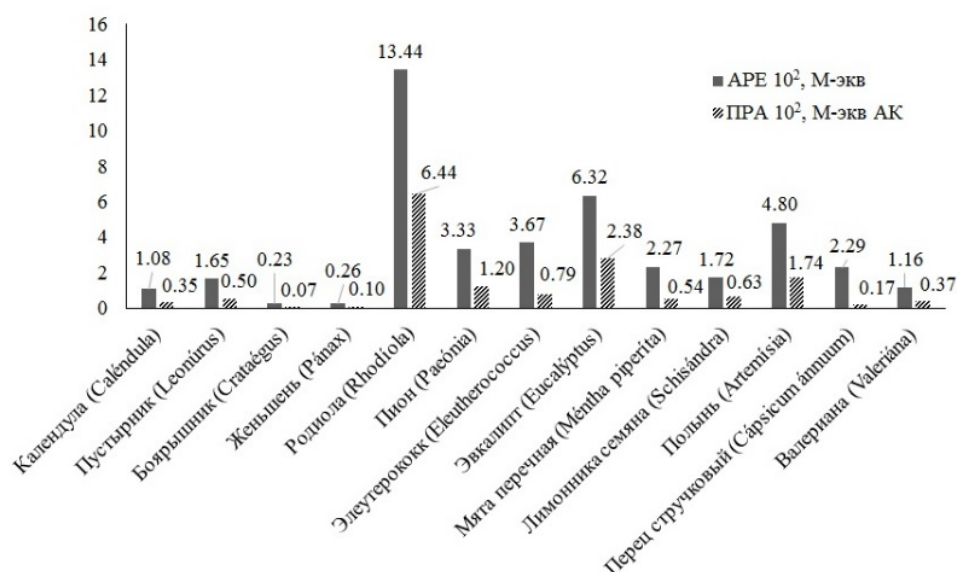


Рисунок 7 – АРЕ и ПРА этанольных экстрактов лекарственного растительного сырья (n = 10, P = 0.95)

В *Главе 6* оценены показатели точности АРЕ выбранных экстрактов растений. Значения относительной погрешности результатов не превышают 8%; показатели повторяемости и воспроизводимости исследованных экстрактов в относительных единицах составили не более 4%, что позволяет использовать данный способ для исследования антирадикальной емкости широкого круга объектов со сложной матрицей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Обоснован выбор модельной системы, включающей источник радикалов ААРН и акцептор радикалов $K_4[Fe(CN)_6]$ для изучения кинетики генерирования свободных радикалов;
2. Разработан потенциометрический способ исследования кинетики генерирования радикалов с использованием выбранной модели. Определен диапазон рабочих концентраций акцептора при разных концентрациях инициатора: (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 концентрациях ААРН $C_{\text{ААРН}} = (0.05 – 0.3)$ М составили $W_i = (1.05 – 5.39) \cdot 10^{-7} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$, $k_{\text{icp}} = (1.00 \pm 0.02) \cdot 10^{-6} \text{ с}^{-1}$;
3. Разработан потенциометрический способ определения антирадикальной емкости соединений разной химической природы с использованием радикал-генерирующих систем в качестве модели окислителя на примере ААРН;
4. Выбраны оптимальные условия проведения эксперимента (рН 7.4, суммарная концентрацией солей NaH_2PO_4 / K_2HPO_4 0.067 М, ионная сила 0.120, буферная емкость 0.031 М, температура 37°C);

5. Определена АРЕ модельных растворов антиоксидантов, полученные коэффициенты ингибирования согласуются с литературными данными;

6. Определена АРЕ настоев чая, водных и этанольных экстрактов лекарственного растительного сырья. Степень корреляции результатов с потенциометрическим способом исследования АОЕ на модели $K_3[Fe(CN)_6]$ / $K_4[Fe(CN)_6]$ составила 0.85, с известным спектрофотометрическим методом определения общего содержания полифенолов – 0.99, с методом определения ПРА с использованием DPPH – 0.97;

7. Найден предел определения АРЕ потенциометрическим способом ($6.20 \cdot 10^{-6}$ М – экв, $n = 5$, $R = 0.95$). Оценены показатели точности нового потенциометрического способа: значения относительной погрешности не превышают 8%, показатели повторяемости и воспроизводимости исследованных экстрактов в относительных единицах составили не более 4%, что позволяет использовать данный способ для исследования антирадикальной емкости широкого круга объектов со сложной матрицей.

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю к.х.н., доц. Ивановой А.В., а также к.х.н., доц. Герасимовой Е. Л. (УрФУ им. Б. Н. Ельцина, кафедра Аналитической химии) за помощь в работе; д.х.н., проф. Касаикиной О. Т. (Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, РФ) за помощь в постановке некоторых задач исследования и интерпретации результатов и всему научному коллективу кафедры аналитической химии ХТИ УрФУ им. Б.Н. Ельцина.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, определенных ВАК:

1. 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 // Известия АН. Серия химическая. – 2016. – № 2. – С.419-424.

2. 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 // Известия АН. Серия химическая. – 2017. – № 8. – С. 1428-1432.

3. 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. – Vol. 1046. – P. 69-76.

Патенты РФ на изобретение:

4. Патент 26121132 РФ 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.

5. Патент 2618426 РФ 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.

Материалы научных конференций:

6. **Газизуллина, Е.Р.** Потенциометрический метод определения антирадикальной активности с использованием радикальных инициаторов / **Е.Р. Газизуллина**, А.Г. Давлетчурина, Е.Л. Герасимова, А.И. Матерн, А.В. Иванова // Сборник тезисов XX Менделеевского съезда по общей и прикладной химии: сборник. – Екатеринбург, 2016. – Т. 4. – С. 250.

7. Давлетчурина, А.Г. Исследование антирадикальной активности витаминов и витаминоподобных средств потенциометрическим методом / А.Г. Давлетчурина, **Е.Р. Газизуллина**, Е.Л. Герасимова, А.В. Иванова // Сборник тезисов XXVI Российской молодежной научной конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной химии». – Екатеринбург, 2016 г. – С. 122.

8. Окулова, Я.А. Исследование антиоксидантной и антирадикальной активности офтальмологических растворов / Я.А. Окулова, **Е.Р. Газизуллина**, Е.Л. Герасимова, А.В. Иванова // Сборник тезисов XXVI Российской молодежной научной конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной химии». – Екатеринбург, 2016 г. – С. 163.

9. **Газизуллина, Е.Р.** Разработка потенциометрического метода определения антирадикальной активности с использованием радикальных инициаторов / **Е.Р. Газизуллина**, Я.А. Окулова, А.Г. Давлетчурина, Е.Л. Герасимова, А.В. Иванова // Сборник тезисов IX Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа с международным участием и Молодежной научной школой. – Екатеринбург, 2016. – С. 76.

10. Давлетчурина, А.Г. Исследование антиоксидантной емкости витаминов и экстрактов лекарственного растительного сырья потенциометрическим методом / А.Г. Давлетчурина, **Е.Р. Газизуллина**, Е.Л. Герасимова, А.В. Иванова // Сборник тезисов XXVII Российской молодежной научной конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной химии». – Екатеринбург, 2017 г. – С. 93.

11. **Газизуллина, Е.Р.** Новый потенциометрический метод исследования антирадикальной емкости / **Е.Р. Газизуллина**, А.Г. Давлетчурина, Е.Л. Герасимова, А.В. Иванова // Сборник тезисов Третьего съезда аналитиков России. – Москва, 2017 г. – С. 460.

12. Борисова, М.В. Исследование антирадикальных свойств экстрактов лекарственного сырья / М.В. Борисова, **Е.Р. Газизуллина**, Е.Л. Герасимова, А.В. Иванова // Сборник тезисов XXVIII Российской молодежной научной конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной химии». – Екатеринбург, 2018 г. – С. 73.

13. **Gazizullina, E.R.** New potentiometric assay for investigation antiradical capacity / **E.R. Gazizullina**, E.L. Gerasimova, A.I. Matern, A.V. Ivanova // World conference on Analytical and Bioanalytical Chemistry. – Barcelona, 2018. – P. 15.