

УДК 541.127:542.943:535.379

А. В. Белый, Н. И. Белая, Е. Н. Симонова

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНЫХ КРИТЕРИЕВ ОЦЕНКИ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ГИДРОХИНОНА МЕТОДОМ ПОЛЯРОГРАФИИ

Отработана методика определения активности гидрохинона в реакции с промежуточными продуктами ($O_2^{\cdot-}$ и HO_2^{\cdot}) электровосстановления кислорода (ЭВ O_2) до пероксида водорода в водных средах на ртутном каплюющем электроде. В качестве первичных критериев оценки антирадикальной активности гидрохинона могут быть использованы как общеизвестный критерий i_d/i_k относительного изменения предельного тока, так и предложенный в работе параметр $\varphi_{1/2}$ потенциала полувольты ЭВ O_2 в присутствии фенола.

Ключевые слова: гидрохинон, электровосстановление кислорода, антирадикальная активность, антиоксидант.

Введение. Известно [1], что неблагоприятные факторы окружающей среды провоцируют в клетках организма человека неконтролируемый рост свободных радикалов. В результате этих процессов происходит нарушение баланса между скоростью образования и обрыва активных кислородных форм, в результате чего естественная антиоксидантная система организма не успевает справиться с лавинообразным увеличением концентрации радикалов, что приводит к оксидативному стрессу.

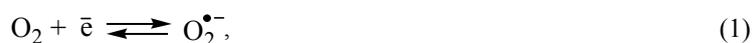
Важную роль в регуляции указанных процессов играют антиоксиданты (АО) экзогенного происхождения, которые прерывают цепные реакции окисления, образуя малоактивные радикалы, легко выводимые из организма. Наиболее интересными в этом плане являются вещества, содержащие в своей структуре фенольные фрагменты [2]. Особенности антиоксидантного действия этих соединений состоят в том, что они могут инактивировать не только радикалы перекисного окисления липидов, но и активные формы кислорода (АФК) как побочные продукты важнейших метаболических реакций с участием молекулярного кислорода, способные взаимодействовать с нерадикальными соединениями и образовывать новые свободные радикалы.

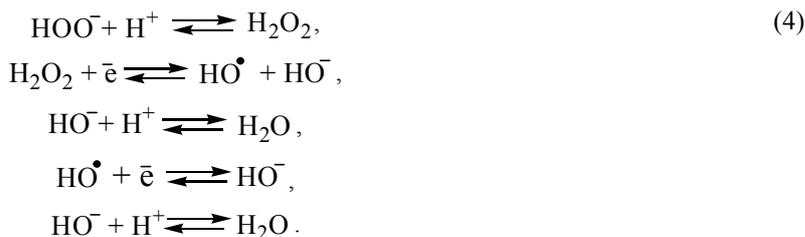
В связи с этим особую актуальность приобретают реакции, моделирующие восстановление кислорода в клетках организма человека и животного. К такой модели относится процесс электровосстановления кислорода (ЭВ O_2) на катоде, проходящий через образование промежуточных активных радикальных форм кислорода. Однако, проведенный литературный обзор [3–5] показал, что исследование антирадикальной активности (АРА) веществ в процессе ЭВ O_2 проводят либо на твердых электродах, либо на ртутных пленочных электродах, поверхность которых не обновляется в ходе эксперимента, что приводит к плохой воспроизводимости полученных результатов и невысокой точности полученных кинетических параметров.

Целью настоящей работы является отработка методики определения первичных критериев оценки антирадикальной активности (АРА) гидрохинона в реакции с промежуточными продуктами ($O_2^{\cdot-}$ и HO_2^{\cdot}) катодного восстановления кислорода (ЭВ O_2) до пероксида водорода в водных средах методом полярографии.

Экспериментальная часть. В качестве фенольного антиоксиданта использовали гидрохинон, очищенный согласно литературной методике [6]. Для приготовления водного фоновго раствора (фосфатного буфера) со значением $pH=6,86$, близкой к физиологической норме, использовали набор стандарт-титров. Антирадикальную активность полученных экстрактов изучали в процессе катодного электровосстановления кислорода (ЭВ O_2) при $T=293\pm 2$ К методами постоянно-токовой полярографии. Исследования проводили на полярографе ПУ-1 в герметичной термостатируемой ячейке с контролем атмосферы и подачей антиоксиданта в реакционную смесь. Рабочим электродом служил ртутный каплюющий электрод, электродом сравнения – донная ртуть. Скорость развертки потенциала составляла 2 – 2,5 мВ/с, диапазон рабочих потенциалов (φ) от 0 до -1 В.

Результаты и их обсуждение. В качестве модельной системы для исследования антирадикальных свойств гидрохинона как фенольного антиоксиданта служил процесс электровосстановления кислорода до перекиси водорода в водной среде на ртутном каплюющем электроде, протекающий по механизму аналогичному восстановлению кислорода в клетках организма человека и животных [3]. В кислых и нейтральных средах ЭВ O_2 на ртутном каплюющем электроде реализуется в несколько стадий по следующей схеме [4]:





При этом наблюдаются (рис. 1) две полярографические волны: первая соответствует восстановлению O_2 до H_2O_2 , а вторая – H_2O_2 до H_2O . В работе исследовали первую волну ЭВ O_2 , соответствующую стадиям (1)–(4), когда на поверхности электрода в качестве промежуточных продуктов восстановления образуются активные кислородные радикалы ($\text{O}_2^{\bullet-}$ – супероксид анион-радикал, HOO^\bullet – гидропероксильный радикал) и пероксид водорода как конечный продукт.

Для установления методики определения активности гидрохинона (PhOH) в процессе восстановления O_2 до H_2O_2 на РКЭ были проведены:

- 1) установление времени полного насыщения раствора фоновый электролит O_2 ;
- 2) идентификация пика ЭВ O_2 ;
- 3) определение величины остаточного тока;
- 4) установление диапазона рабочих концентраций PhOH;
- 5) определение первичных параметров оценки АРА вещества.

Поскольку концентрация кислорода подвержена колебаниям в зависимости от температуры и давления окружающей среды, что явно усложняет методику, то для устранения необходимости контроля кислорода в растворе перед вводом антиоксиданта фосфатный буфер, помещенный в электрохимическую ячейку, барботировали кислородом и перемешивали при помощи механической мешалки в течение 15 мин. со скоростью 300 об/мин до полного насыщения. После успокоения в течение 10 сек. снимали полярограмму тока ЭВ O_2 . Было установлено (рис. 2), что дальнейшее увеличение времени барботирования не приводит к росту предельного тока i_d (в мкА), что свидетельствует о полном насыщении фоновый раствор кислородом, равном его растворимости в данном растворителе.

Пик восстановления кислорода идентифицировали при помощи барботирования аргона через исследуемый раствор. Пик ЭВ O_2 (i_0) на полярограммах полностью исчезал при барботировании аргоном в течение 20–30 мин (рис. 2). Это позволило измерить величину так называемого остаточного тока ($i_{\text{ост.}}$), который обычно искажает форму полярографической волны и мешает правильному измерению силы предельного диффузионного тока (i_d). Поэтому дальнейшее измерение тока восстановления O_2 проводили с учетом установленной величины остаточного тока как $i_d = i_0 - i_{\text{ост.}}$.

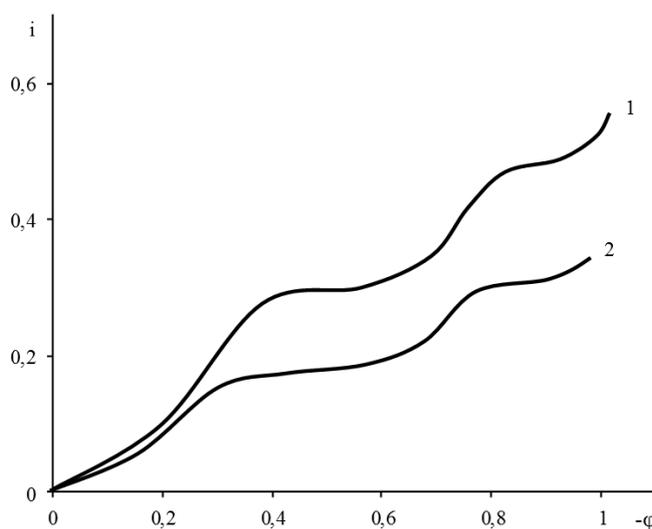


Рис. 1. Полярограммы тока ЭВ O_2 в фосфатном буфере с $\text{pH}=6,86$ при $T=293\pm 2\text{K}$ в присутствии гидрохинона ($C=6,8\cdot 10^{-5}$ моль \cdot л $^{-1}$) (2) и без добавок (1)

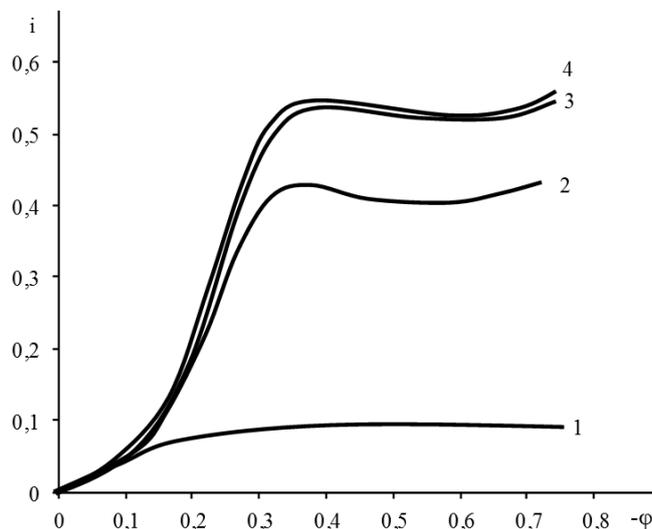


Рис. 2. Полярограмма тока ЭВ O_2 в фосфатном буфере с $\text{pH}=6,86$ при $T=293\pm 2\text{K}$, насыщенном кислородом в течении: 2–10 мин.; 3–20 мин.; 4–30 мин.; 1 – линия остаточного тока при отсутствии кислорода в фоновом растворе электролита

По представленной методике исследовали влияние на катодное ЭВ O_2 фенольного антиоксиданта – гидрохинона, который быстро вступает во взаимодействие с АФК и способен влиять на кинетику процесса, уменьшая ток восстановления кислорода (рис. 1). Для этого делали съемку полярограммы фонового фосфатного буфера. При отсутствии посторонних пиков раствор считался чистым. Затем в электрохимическую ячейку добавляли раствор гидрохинона с заданной концентрацией, перемешивали раствор 20 сек., время успокоения – 10 сек. и фиксировали изменение тока ЭВ O_2 . Строгое выдерживание времени и скорости перемешивания и успокоения раствора значительно уменьшает ошибку эксперимента. При полярографировании исследуемой системы в присутствии гидрохинона наблюдается смещение потенциала полуволны $\phi_{1/2}$ в более положительную область и уменьшение величины предельного тока, который является кинетическим i_k (рис. 3), поскольку, согласно перечисленным характерным признакам [7, 8], в системе протекает электродный процесс с последующей лимитирующей химической реакцией.

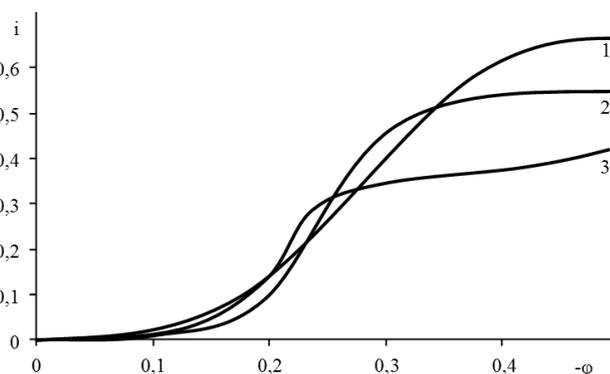
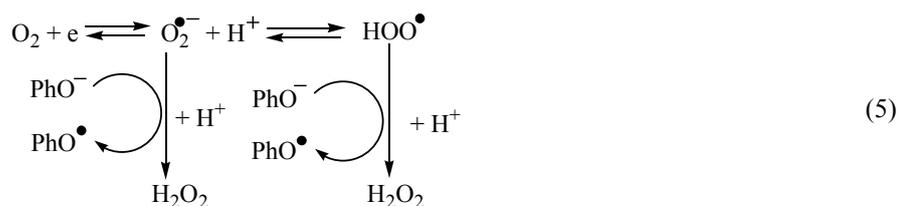


Рис. 3 – Полярограммы тока ЭВ O_2 в фосфатном буфере с $pH=6,86$ (1) в присутствии гидрохинона (моль·л⁻¹): 2 – $1,8 \cdot 10^{-5}$; 3 – $3,5 \cdot 10^{-5}$. $T = 293 \pm 2$ К.

Такая реакция может заключаться во взаимодействии ионизированных форм фенолят-ионов (PhO^-) с кислородными радикалами ($O_2^{\bullet-}$ – супероксид анион-радикал, HO_2^{\bullet} – гидропероксильный радикал) с образованием электрохимически неактивного продукта H_2O_2 :



В качестве первичного параметра АРА вещества использовали величину относительного изменения предельного тока ЭВ O_2 в присутствии АО, предложенную в работе [5]:

$$i_d/i_k = (i_0 - i_{ocm})/i_k$$

Величина i_d/i_k показывает во сколько раз уменьшается концентрация O_2 за счет последующей химической реакции кислородных радикалов с гидрохиноном (5). Причем чем больше i_d/i_k , тем выше эффективность АО. Установлено, что гидрохинон обладает выраженной АОА и значительно уменьшает величину предельного тока ЭВ O_2 . Диапазон рабочих концентраций фенола составляет $10^{-5} - 10^{-6}$ моль·л⁻¹. Линейная зависимость относительного изменения предельного тока ЭВ O_2 от концентрации гидрохинона свидетельствует (рис. 4) о взаимодействии его с АФК, которые генерируются в процессе восстановления O_2 до H_2O_2 .

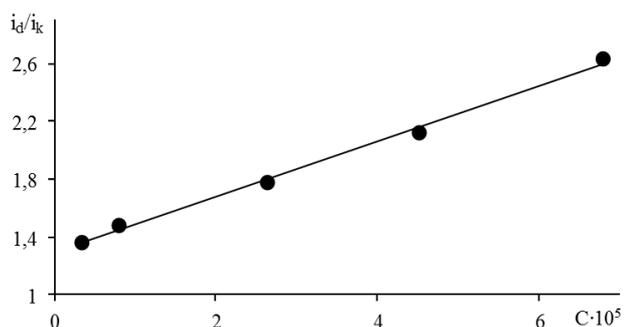


Рис. 4 – Зависимость величины относительного изменения предельного тока ЭВ O_2 (i_d/i_k) от концентрации гидрохинона (моль·л⁻¹)

Примечательно, что смещение в положительную область потенциала полуволны ЭВ O_2 в присутствии гидрохинона $\phi_{1/2}$ по сравнению с волной без добавок (рис. 3) характеризует не только о наличии последующей химической реакции (5), но и может быть характеристикой антирадикальной активности фенола в этой реакции. Такой параметр для подобного типа реакций будет более точным, чем часто применяемый критерий i_d/i_k , поскольку падение концентрации кислорода в системе может осуществляться не только за счет реакции с АФК, но и по реакции молекулярного кислорода с фенольными соединениями [9].

При этом линейный сдвиг потенциала полуволны с ростом концентрации АО в более положительную область указывает на ускорение процесса восстановления кислорода в присутствии гидрохинона (рис. 5) за счет его реакции с кислородными радикалами (5), а значит на рост антирадикальной активности вещества.

Выводы. Отработана методика определения активности гидрохинона в реакции с промежуточными продуктами ($O_2^{\cdot-}$ и HO_2^{\cdot}) электровосстановления кислорода (ЭВ O_2) до пероксида водорода в водных средах на ртутном каплюющем электроде.

В качестве первичных критериев оценки антирадикальной активности гидрохинона могут быть использованы как общеизвестный критерий i_d/i_k относительного изменения предельного тока, так и предложенный в работе параметр $\varphi_{1/2}$ потенциала полуволны ЭВ O_2 в присутствии фенола.

Установлена линейная зависимость относительного изменения предельного тока ЭВ O_2 i_d/i_k от концентрации гидрохинона, что свидетельствует о взаимодействии фенольного антиоксиданта с активными формами кислорода, которые генерируются в процессе восстановления O_2 до H_2O_2 .

Линейный сдвиг потенциала полуволны $\varphi_{1/2}$ с ростом концентрации гидрохинона в более положительную область указывает на ускорение процесса восстановления кислорода в присутствии фенола за счет его реакции с кислородными радикалами, что указывает на высокую антирадикальную активность вещества.

Отработанная методика позволит в дальнейшем определить различные кинетические параметры процесса ЭВ O_2 в присутствии фенольных соединений, а также изучить механизм их действия в исследуемой модели.

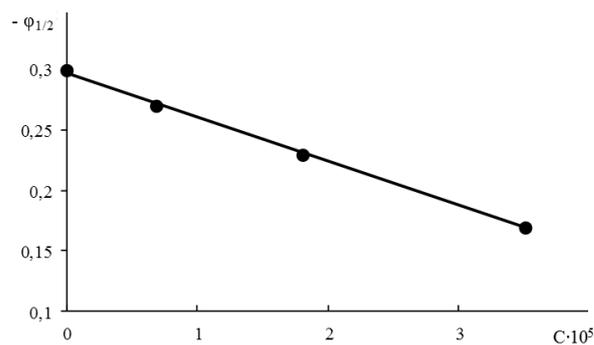


Рис. 5. Зависимость потенциала полуволны ЭВ O_2 ($\varphi_{1/2}$) от концентрации гидрохинона (моль·л⁻¹)

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Меньщикова Е. Б. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания / Е. Б. Меньщикова. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство. – 2008. – 284 с.
2. Vermerris W. Phenolic compound biochemistry / W. Vermerris, R. Nicholson. – Springer, 2006. – 275 p.
3. Исследование антиоксидантных свойств каталазы и супероксиддисмутазы методом вольтамперометрии / Е. И. Короткова, О. И. Липских, М. А. Киселева, В. В. Иванов // Химико-фармацевтический журнал. – 2008. – Т. 42, № 8. – С. 45–47.
4. Korotkova E. I. Investigation of antioxidant and catalytic properties of some biologically active substances by voltammetry / E. I. Korotkova, Y. A. Karbainov, O. A. Avramchik // Analytical and bioanalytical chemistry. – 2003. – Vol. 375. – P. 465–468.
5. Korotkova E. I. Study of antioxidant properties by voltammetry / E. I. Korotkova, Y. A. Karbainov, A. V. Shevchuk // Journal of Electroanalytical Chemistry. – 2002. – Vol. 518. – P. 56–60.
6. Гордон А. Спутник химика. Физико-химические свойства, методики, библиография / А. Гордон, Р. Форд – М.: Мир, 1976. – 541 с.
7. Гейровский Я. Основы полярографии / Я. Гейровский, Я. Кута. – М.: Мир, 1965. – 559 с.
8. Гороховская В.И. Практикум по электрохимическим методам анализа / В. И. Гороховская, В. И. Гороховский. – М.: Высшая школа, 1983. – 190 с.
9. Окисление фенольных антиоксидантов кислородов в водных средах / А. Н. Шендрик, Л. В. Каниболоцкая, И. Д. Одарюк, В. В. Безнос // Украинский химический журнал. – 2009. – Т. 75, № 12. – С. 90–96.

Поступила в редакцию 19.05.2014 г.

РЕЗЮМЕ

Відпрацьована методика визначення активності гідрохінона в реакції з проміжними продуктами ($O_2^{\cdot-}$ і HO_2^{\cdot}) електровідновлення кисню (ЕВ O_2) до пероксиду водню у водних середовищах на ртутному крапаючому електроді. У якості первинних критеріїв оцінки антирадикальної активності гідрохінона можуть бути використані як загальновідомий критерій i_d/i_k відносної зміни граничного струму, так і запропонований в роботі параметр $\varphi_{1/2}$ потенціалу напівхвилі ЕВ O_2 у присутності фенолу.

Ключові слова: гідрохінон, електровідновлення кисню, антирадикальна активність, антиоксидант.

SUMMARY

The technique of determining of hydroquinone activity in the reaction with intermediates ($O_2^{\cdot-}$ and HO_2^{\cdot}) of oxygen electroreduction (O_2 ER) to hydrogen peroxide in aqueous media at the dropping mercury electrode worked out. As the primary criteria for evaluation of antiradical activity of hydroquinone can be used both the well-known criterion i_d/i_k (relative change of the limiting current) and the proposed parameter $\varphi_{1/2}$ half-wave potential of O_2 ER in the phenol presence.

Keywords: hydroquinone, oxygen electroreduction, antiradical activity, antioxidant.