

УДК 547.(565+789.1)

В. В. Одарюк, И. Д. Одарюк, Л. В. Каниболоцкая, А. Н. Шендрик

### АНТИРАДИКАЛЬНАЯ СПОСОБНОСТЬ ФЕНОЛЬНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К КАТИОН-РАДИКАЛУ 2,2'-АЗИНО-БИС(3-ЭТИЛБЕНЗТИАЗОЛИН- 6-СУЛЬФОНОВОЙ КИСЛОТЫ)

Изучен процесс взаимодействия двухатомных фенолов и восьми различных дигидроксифенилтиазолов с катион-радикалом 2,2'-азинобис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфоново́й кислоты). Определена их антирадикальная способность. Антиоксидантная функция дигидроксифенилтиазолов в реакции с катион-радикалом обусловлена гидроксикарильными фрагментами молекул. Максимальную антирадикальную способность проявляют резорцин и 2-(4'-гидроксифенил)-4-(2'',4''-дигидроксифенил)тиазол. Их взаимодействие с катион-радикалом сопровождается появлением в ходе реакции новых полос поглощения, не характерных для других изученных соединений.

*Ключевые слова:* тиазолы, фенолы, антирадикальная способность, катион-радикал ABTS<sup>++</sup>.

**Введение.** Катион-радикал 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоново́й кислоты (ABTS<sup>++</sup>) часто используется для исследования индивидуальных и комплексных антиоксидантов [1]. Привлекательность его применения для оценки антирадикальной способности обусловлена относительной простотой процедуры генерации радикала. В сравнении с методом оценки антирадикальных свойств с использованием другого стабильного радикала – 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила, метод с ABTS<sup>++</sup> имеет ряд преимуществ – возможность проводить анализ как в водной, так и в органических средах в широком диапазоне pH, наличие характерных полос поглощения в длинноволновой области спектра с высоким значением коэффициента абсорбции, что позволяет избежать влияния на результат измерений окрашенных антиоксидантов и продуктов их превращений [2].

Ранее для 4-(3',4'-дигидроксифенил)тиазолов (ДФТ) показано высокая антирадикальная активность в отношении 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила [3]. Цель данной работы состояла в изучении антирадикальной способности ДФТ, двухатомных фенолов – структурных аналогов ДФТ, двух стандартных антиоксидантов – Тролокса и ионола в реакции с ABTS<sup>++</sup>.

**Экспериментальная часть.** ABTS – 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоново́й кислоты) диаммониевая соль, Тролокс – 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Aldrich) применялись без дополнительной очистки. Персульфат калия перекристаллизовывали из бидистиллированной воды. Пирокатехин, резорцин очищали сублимацией в вакууме. 4-Метилпирокатехин перекристаллизовывали из толуола. Синтез изученных тиазолов, структуры которых представлены на рис. 1, подробно описан в [4]. Диметилсульфоксид (ДМСО), использовавшийся в качестве растворителя для плохо растворимых в воде ДФТ, очищали перегонкой при пониженном давлении. Все рабочие растворы готовили на бидистиллированной воде непосредственно перед каждой серией опытов.

Генерация ABTS<sup>++</sup> осуществлялась по методике, приведенной в [5]. Согласно [6], его образование в реакции с персульфатом калия осуществляется по брутто-реакции (1). Для получения рабочего раствора исходный раствор катион-радикала разбавляли таким образом, чтобы значение оптической плотности в максимуме при 734 нм составляло  $0,70 \pm 0,05$ , что соответствует концентрации  $4,7 \cdot 10^{-5}$  М, с учетом коэффициента экстинкции равного  $(1,5 \pm 0,6) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [7]



Антирадикальную способность ДФТ и фенолов определяли в фосфатной буферной системе, pH = 7,4. В кювете l=1 см смешивали определенное количество рабочего раствора ABTS<sup>++</sup> и аликвоту исследуемого соединения. Содержимое кюветы перемешивали и регистрировали снижение оптической плотности при 734 нм. Измерения проводили на спектрофотометре СФ-2000 (Россия).

**Результаты и их обсуждение.** При введении производных тиазола и фенолов в реакционную систему концентрация катион-радикала быстро уменьшается (рис. 2). При этом наблюдается эквивалентное катион-радикалу образование ABTS, то есть в присутствии антиоксидантов происходит восстановление катион-радикала до исходной молекулы. Исключение составляют соединения I и резорцин для которых количество образовавшегося ABTS ниже количества ABTS<sup>++</sup>, вступившего в реакцию. 2,4-Дифенилтиазол не взаимодействует с ABTS<sup>++</sup>, то есть антирадикальные свойства обусловлены гидроксикарильным фрагментом.

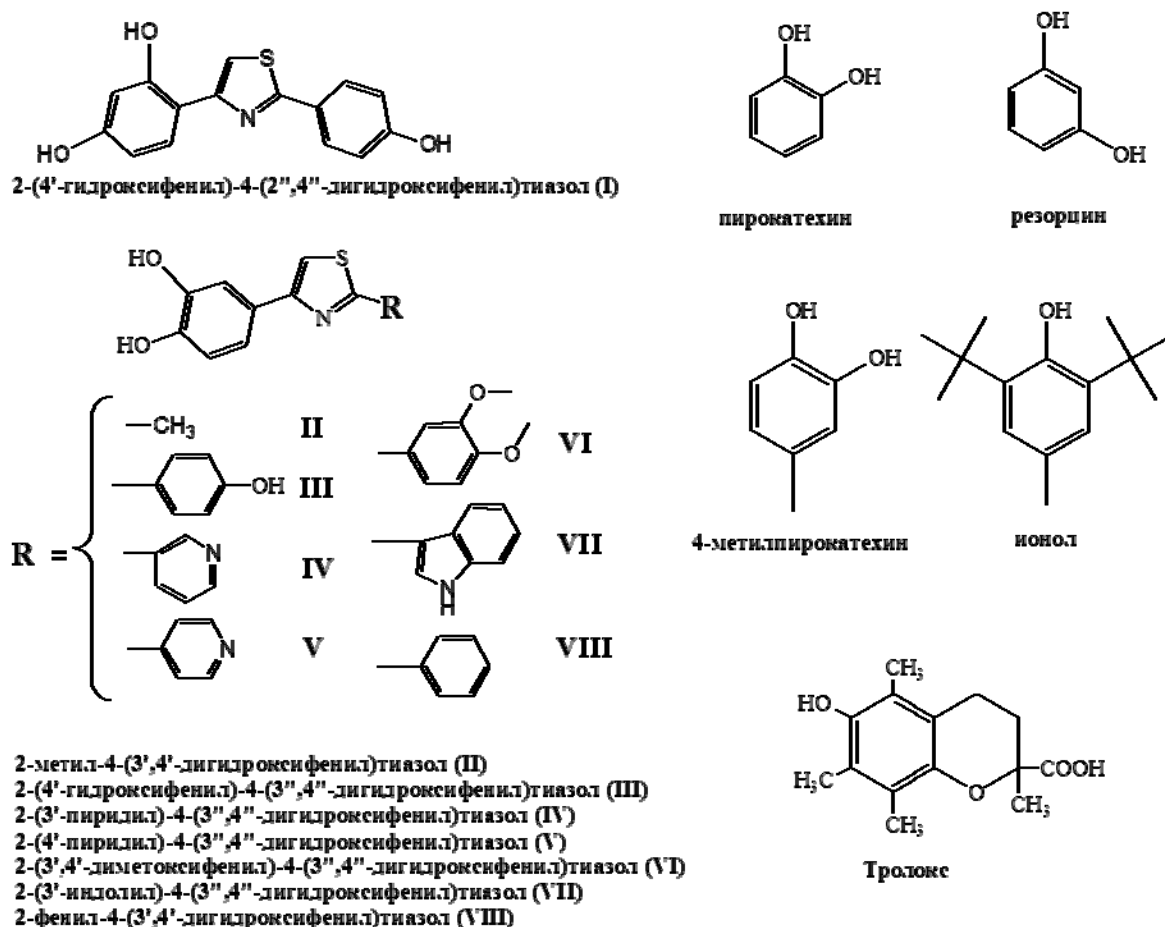


Рис. 1. Изученные субстраты

Кинетические кривые расходования  $ABTS^{++}$  можно разделить на два участка – быстрый начальный и медленный последующий, что согласуется с данными литературы [8, 9]. Антирадикальную способность определяли на основании убыли  $ABTS^{++}$  на первом «быстром» участке кинетической кривой. Для количественной оценки антирадикальной способности использовали стехиометрический коэффициент ( $f_{ABTS^{++}}$ ), который равен тангенсу угла наклона прямой в координатах – количество прореагировавшего  $ABTS^{++}$  к количеству введенного субстрата. Коэффициент  $f_{ABTS^{++}}$  соответствует числу радикалов, погибающих на одной молекуле антиоксиданта. Погрешность характеризовали величиной доверительного интервала углового коэффициента линейной регрессии при  $r=0,95$ .

Для индивидуальных веществ  $f_{ABTS^{++}}$  линейно связан с Тролоковым эквивалентом ТЕАС (Trolox equivalent antioxidant capacity), который на настоящий момент часто используется для характеристики антирадикальной способности соединений. ТЕАС указывает, какая концентрация вещества взаимодействует с таким же количеством катион-радикала, что и 1мМ раствор Тролокса, выступающего в качестве эталонного соединения [5]. В отличие от  $f_{ABTS^{++}}$ , ТЕАС не дает информацию о химической стороне взаимодействия антиоксиданта со стабильным радикалом, поэтому для индивидуальных соединений представляется более целесообразным определять величину  $f_{ABTS^{++}}$ .

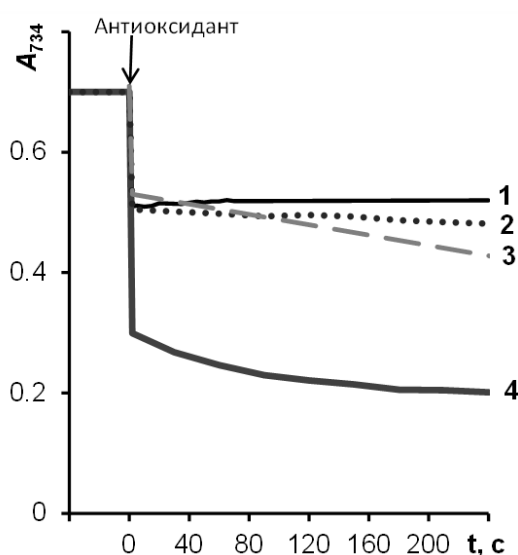


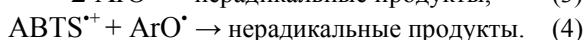
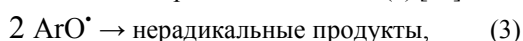
Рис. 2. Кинетические кривые расходования  $ABTS^{++}$  в реакции с антиоксидантами, фосфатная буферная система, pH 7,4,  $[ABTS^{++}]_0 = 4,7 \cdot 10^{-5}$  М. 1 – Тролокс,  $C_0 = 5,7 \cdot 10^{-6}$  М; 2 – пирокатехин,  $C_0 = 5,0 \cdot 10^{-6}$  М; 3 – соединение VII,  $C_0 = 5,7 \cdot 10^{-6}$  М; 4 – резорцин,  $C_0 = 5,0 \cdot 10^{-6}$  М.

Для изученных антиоксидантов наблюдается прямолинейная зависимость между количеством введенного антиоксиданта в интервале концентраций  $1 \cdot 10^{-6}$ – $2 \cdot 10^{-5}$  М и количеством прореагировавшего  $ABTS^{*+}$  (рис. 3),  $R^2 = 0,9$ – $0,999$ , за исключением соединений **I**, **III** и резорцина.

Первой стадией взаимодействия фенольных антиоксидантов с  $ABTS^{*+}$  является восстановление катион-радикала до  $ABTS$  с образованием соответствующего гидроксирадикального радикала [10, 11]:



Реакция (2) является обратимой [11, 12]. За ней следуют реакции диспропорционирования или рекомбинации радикала антиоксиданта (3), или его взаимодействие с еще одним катион-радикалом  $ABTS^{*+}$  (4) [10]:



Величина стехиометрического коэффициента будет определяться конкуренцией реакций (3) и (4) и может изменяться для одноатомных фенолов от 1 до 2 [10]. Так, для Тролокса и ионола  $f_{ABTS^{*+}}$  равны 2 и 1 соответственно (таблица), что согласуется с литературными данными [11]. Эти крайние значения можно получить исходя из представленного механизма, если для первого соединения  $V_4 \gg V_3$ , а для второго –  $V_3 \gg V_4$ . Величина  $f_{ABTS^{*+}}$  для пирокатехина и большинства ДФТ близка к 2 (таблица). По реакции (2) из этих соединений образуются соответствующие семихинонные радикалы. Значение  $pK_a$  для семихинонного радикала пирокатехина равно 5,0 [13]. Образующиеся из ДФТ **II-VIII** семихинонные радикалы, по-видимому, имеют близкие указанному выше значения  $pK_a$ . Это означает, что в условиях эксперимента такие радикалы практически полностью диссоциированы и должны легко отдавать электрон на восстановление второго радикала  $ABTS^{*+}$ . Преимущественным молекулярным продуктом, образующимся из пирокатехина и ДФТ, будет соответствующий *o*-хинон, а  $f_{ABTS^{*+}}$  будет стремиться к 2.

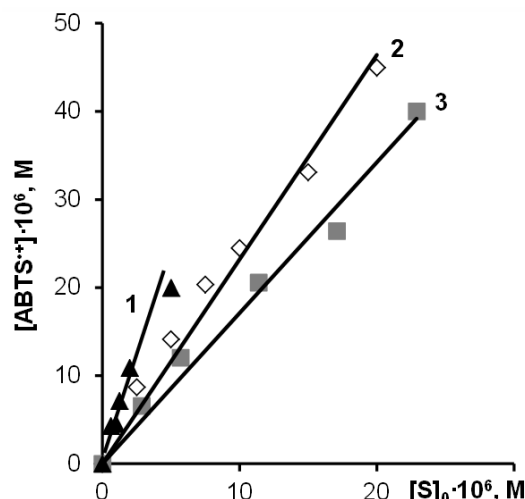


Рис. 3. Зависимость прореагировавшего  $ABTS^{*+}$  от начальной концентрации антиоксиданта. Фосфатный буфер, pH 7,4,  $[ABTS^{*+}]_0 = 4,7 \cdot 10^{-5}$  М. 1 – резорцин, 2 – пирокатехин, 3 – соединение **VII**

Таблица  
Стехиометрический коэффициент реакции антиоксидантов с  $ABTS^{*+}$

№ п/п	Субстрат	$f_{ABTS^{*+}}$
<b>I</b>	2-(4'-гидроксифенил)-4-(2'',4''-дигидроксифенил)тиазол	$3,5 \pm 0,5$
<b>II</b>	2-метил-4-(3',4'-дигидроксифенил)тиазол	$2,0 \pm 0,1$
<b>III</b>	2-(4'-гидроксифенил)-4-(3'',4''-дигидроксифенил)тиазол	$3,1 \pm 0,5$
<b>IV</b>	2-(3'-пиридил)-4-(3'',4''-дигидроксифенил)тиазол	$1,7 \pm 0,1$
<b>V</b>	2-(4'-пиридил)-4-(3'',4''-дигидроксифенил)тиазол	$2,3 \pm 0,5$
<b>VI</b>	2-(3',4'-диметоксифенил)-4-(3'',4''-дигидроксифенил)тиазол	$2,2 \pm 0,3$
<b>VII</b>	2-(3'-индолил)-4-(3'',4''-дигидроксифенил)тиазол	$1,8 \pm 0,6$
<b>VIII</b>	2-фенил-4-(3',4'-дигидроксифенил)тиазол	$1,4 \pm 0,2$
<b>IX</b>	Резорцин	$5,0 \pm 1,5$
<b>X</b>	Пирокатехин	$2,1 \pm 0,4$
<b>XI</b>	4-метилпирокатехин	$2,0 \pm 0,3$
<b>XII</b>	Тролокс	$2,0 \pm 0,2$
<b>XIII</b>	Ионол	$1,2 \pm 0,3$

В результате диспропорционирования семихинонных радикалов пирокатехина и ДФТ по реакции (3) может регенерироваться исходный антиоксидант, который в свою очередь будет опять восстанавливать катион-радикал. Однако, квазистационарные концентрации первых будут на несколько порядков ниже, чем  $ABTS^{*+}$ , и если значение  $k_3$  не сильно отличается от  $k_4$ , то вклад этого пути в суммарный процесс будет небольшим.

Тиазольный фрагмент не оказывает значительного влияния на стехиометрию реакции ДФТ с  $ABTS^{*+}$  (таблица). Значение  $f_{ABTS^{*+}} \approx 3$  для соединения **III** может быть обусловлено дополнительным фенольным фрагментом в молекуле. Донорная метильная группа в 4-метилпирокатехине не влияет на значение  $f_{ABTS^{*+}}$ . То есть этот параметр в первую очередь определяется числом и расположением ОН-групп в гидроксирадикальном фрагменте.

Наибольшие значения  $f_{\text{ABTS}^{+\cdot}}$  имеют соединения **I** и его структурный аналог резорцин (1,3-дигидроксibenзол). При их добавлении в систему в концентрации большей, чем  $[\text{ABTS}^{+\cdot}]_0 / f_{\text{ABTS}^{+\cdot}}$  появляются продукты, окрашенные в розовый цвет. Согласно работе [11], розовое окрашивание наблюдается при взаимодействии катион-радикала  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  с резвератролом, катехином и морином. Молекулы всех этих соединений содержат фрагмент 1,3-дигидроксibenзола, т.е. образование окрашенных продуктов связано вероятнее всего с его превращениями. Действительно при взаимодействии резорцина и соединения **I** с  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  наблюдается образование продуктов, имеющих в обоих случаях полосу поглощения с максимумом 520 нм (рис. 4). Для резорцина установлено, что в дальнейшем эта полоса поглощения исчезает и появляется новая в области 470 нм.

Для семихинонных радикалов резорцина и соединения **I**, образующихся по реакции (2), гибель в результате диспропорционирования не возможна, т.к. они не образуют хиноидных структур. Семихинонные радикалы этих веществ могут погибать в ходе димеризации или взаимодействовать с катион-радикалом с образованием продуктов присоединения. Подобные продукты были идентифицированы для реакции флороглюцина с  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  [8]. Аддукты также могут обладать антирадикальной способностью, что приводит к большим значениям  $f_{\text{ABTS}^{+\cdot}}$ .

На основании приведенных данных видно, что механизм реакции ДФТ и их структурных аналогов с катион-радикалом  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  зависит от строения гидроксиарильного фрагмента молекулы. Очевидно, этот факт нужно принимать во внимание при интерпретации и сравнении результатов антирадикальной способности таких соединений.

**Выводы.** Антирадикальная способность дигидроксифенилтиазолов по отношению с катион-радикалу  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  и механизм реакции определяются структурой гидроксиарильного фрагмента молекулы. Очевидно, что с  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  взаимодействует как исходная молекула антиоксиданта, так и продукты его превращения. Максимальную антирадикальную способность в исследованном ряду соединений продемонстрировали резорцин и 2-(4'-гидроксифенил)-4-(2'',4''-дигидроксифенил)тиазол.

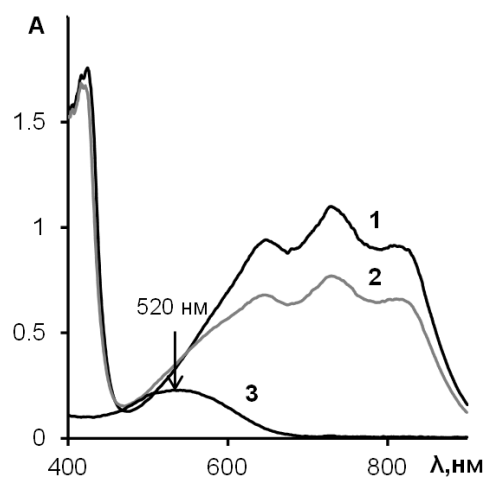


Рис. 4. Влияние добавок соединения **I** на электронный спектр поглощения катион-радикала  $\text{ABTS}^{+\cdot}$ . Фосфатный буфер, pH 7,4,  $[\text{ABTS}^{+\cdot}]_0 = 4,7 \cdot 10^{-5}$  М. **1** – спектр  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  в отсутствии антиоксиданта; **2** –  $C_0 = 5,0 \cdot 10^{-6}$  М; **3** –  $C_0 = 5,0 \cdot 10^{-5}$  М

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Liu Z-Q. Chemical methods to evaluate antioxidant ability / Z-Q. Liu // Chem. Rev. – 2010. – Vol. 110, No 10. – P. 5675–5691.
- Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical report) / R. Apak, Sh. Gorinstein, V. Bohm et al. // Pure Appl. Chem. – 2013. – Vol. 85, No 5. – P. 957–998.
- Антирадикальная активность 2-замещенных 4-(1,3-тиазол-4-ил)-1,2-дигидроксibenзола / В. В. Одарюк, Н. М. Хлестов, Н. И. Бураков и др. // Журнал общей химии. – 2014. – Т. 84, № 2. – С. 275–279.
- Синтез и изучение антиоксидантной активности 3',4'-дигидроксифенилтиазолов / А. Н. Шендрик, Н. И. Бураков, А. Л. Каниболоцкий и др. // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2011. – Т. 9, № 4. – С. 61–64.
- Re R. Antioxidant activity applying an improved  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  radical cation decolorization assay / R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente et al. // Free Rad. Biol. Med. – 1999. – Vol. 26, No 9/10. – P. 1231–1237.
- Venkatasubramanian L. Kinetics and mechanism of formation and decay of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazole-6-sulphonate) radical cation in aqueous solution by inorganic peroxides / L. Venkatasubramanian, P. Maruthamuthu // Int. J. Chem. Kin. – 1989. – Vol. 21. – P. 399–421.
- Nitrogen dioxide and related free radicals: electron transfer reactions with organic compounds in solutions containing nitrite or nitrate / L. G. Forni, V. O. Mora-Arello, J. E. Packer, R E Willson // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2 – 1986. – P. 1–6.
- Walker R. B. Comparative reaction rates of various antioxidants with  $\text{ABTS}$  radical cation / R. B. Walker, J. D. Everette // J. Agric. Food Chem. – 2009. – Vol. 57, No 4 – P. 1156–1161.
- Osman A. M.  $\text{ABTS}$  radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts / A. M. Osman, K. K. Y. Wong, A. Fernyhough / Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2006. – Vol. 346, No 1. – P. 321–329.
- Campos A. M. Kinetics of the reaction between 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid ( $\text{ABTS}$ ) derived radical cations and phenols / A. M. Campos, E. A. Lissi // Int. J. Chem. Kin. – 1997. – Vol. 29, No 3. – P. 219–224.
- Определение суммарной концентрации и активности антиоксидантов в пищевых продуктах / Ю. В. Гелетий, Ж. Ж. Балавуэн, О. Н. Ефимов, В. С. Куликова // Биоорганическая химия. – 2002. – Т. 28, № 6. – С. 551–556.

12. Wolfenden D. G. Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of mono-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) / D. G. Wolfenden, R. L. Willson // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2. – 1982. – P. 805–812.
13. Steenken S. Oxidative demethoxylation of methoxylated phenols and hydroxybenzoic acids by the hydroxyl radical. An in situ electron spin resonance, conductometric pulse radiolysis and product analysis study / S. Steenken, P. O'Neill // J. Phys. Chem. – 1977. – Vol. 81, No 6. – P. 505–508.

*Поступила в редакцію 26.05.2014 г.*

#### **РЕЗЮМЕ**

Досліджено процес взаємодії двохатомних фенолів і восьми різних дигідроксифенілтіазолів з катіон-радикалом 2,2'-азино-біс(3-етилбензтіазолін-6-сульфоновой кислоти). Визначена антирадикальна здатність сполук. Антиоксидантна функція дигідроксифенілтіазолів в реакції з катіон-радикалом обумовлена гідроксиарильним фрагментом молекул. Максимальну антирадикальну здатність проявляють резорцин і 2-(4'-гідроксифеніл)-4-(2'',4''-дигідроксифеніл)тіазол. Їх взаємодія з катіон-радикалом супроводжується появою в ході реакції нових смуг поглинання, що не характерні для інших досліджених сполук.

*Ключові слова:* тіазоли, феноли, антирадикальна здатність, катіон-радикал ABTS<sup>•+</sup>.

#### **SUMMARY**

Interaction between two dihydroxy benzenes, eight different dihydroxyphenylthiazoles and 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) radical cation was studied. Antioxidant function of dihydroxyphenylthiazoles in the reaction with radical cation is caused by hydroxyaryl part of molecules. Resorcinol and 2-(4'-hydroxyphenyl)-4-(2'',4''-dihydroxyphenyl)thiazole show maximal antiradical ability. Their reaction with radical cation accompanies by emergence of the new distinctive absorbance band.

*Keywords:* thiazoles, penols, antiradical ability, ABTS<sup>•+</sup> radical cation.