

УДК 547.22:541.13:541.8:541.127

**О.В. Смирнова, А.И. Помещенко, И.В. Ефимова**, канд. хим. наук, ст. науч. сотр. (Институт физико-органической химии и углехимии им. Л.М. Литвиненко НАН Украины, г. Донецк)

### **ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОГО И АНТИРАДИКАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ АНИОН-РАДИКАЛА КИСЛОРОДА И АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ**

*Исследован процесс радикально-цепного окисления кумола в присутствии аскорбиновой кислоты и анион-радикала кислорода. Присутствием аскорбиновой кислоты обусловлено наличие индукционного эффекта в процессах иницированного окисления кумола, величина периода индукции растет с увеличением концентрации аскорбиновой кислоты в реакционной смеси. Установлено, что в процессе окисления кумола наблюдается синергизм ингибирующего действия аскорбиновой кислоты и анион-радикала кислорода. Исследование взаимодействия 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила с аскорбиновой кислотой и анион-радикалом кислорода показало, что присутствием супероксид-аниона обусловлено уменьшение антирадикального действия аскорбиновой кислоты.*

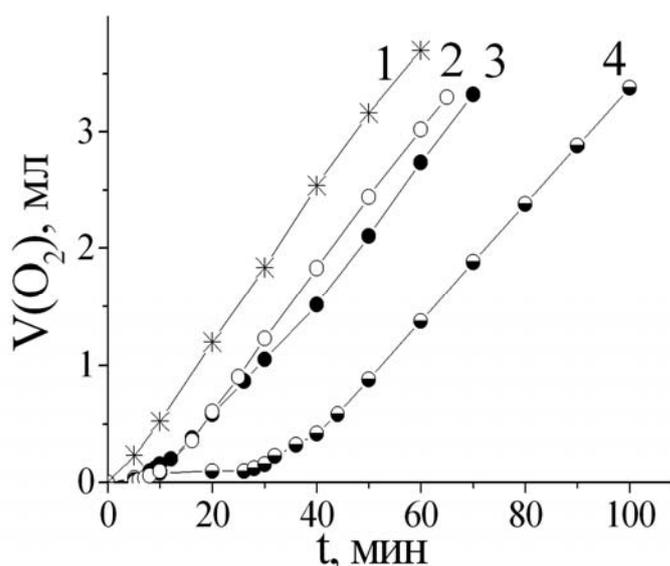
**Ключевые слова:** радикально-цепное окисление, антиоксиданты, аскорбиновая кислота, супероксид-анион.

Многие процессы жизнедеятельности биологических объектов являются свободнорадикальным окислением, параллельно с которым вырабатываются обладающие антиоксидантным действием вещества. Хотя сам процесс окисления в биосистемах развивается в виде цепных реакций в липидной фазе, некоторые его стадии могут протекать в водной фазе [1, 2]. Поэтому часть антиокислительных систем клетки локализуется в липидной фазе, а часть - в водной фазе. Среди водорастворимых антиоксидантов наиболее активным является аскорбиновая кислота, которая способна окисляться в дегидроаскорбиновую кислоту [3, 4]. Вместе они представляют эффективную окислительно-восстановительную систему, обладающую высокой витаминной активностью. Несомненно участие аскорбиновой кислоты во многих процессах, протекающих в биологических объектах [5, 6] (водный обмен, регуляция ферментативной активности, стимуляция реакций метаболизма). Аскорбиновая кислота обладает способностью обратимо окисляться и восстанавливаться, благодаря чему она принимает участие в важнейших энергетических процессах живой клетки [7], является признанным антиоксидантом [8] и активным антидотом свободнорадикальных механизмов, протекание которых усиливается при патологических состояниях. Особую значимость приобретает регулирование окислительных процессов, что обусловлено способностью ингибиторов инактивировать разрушительное действие промежуточных продуктов - перекисных соединений и радикалов [9]. Одним из источников радикалов в организме является супероксид-анион, который образуется в многочисленных биологических процессах. С этой точки зрения интересуют совместное действие супероксид-аниона и аскорбиновой кислоты в процессах радикально-цепного окисления.

С целью изучения совместного действия аскорбиновой кислоты (АК) и анион-радикала кислорода (АРК) в радикально-цепных процессах окисления нами в качестве модельной системы было выбрано иницированное азодиизобутиронитрилом (АИБН) жидкофазное окисление кумола (Ку), для которого механизм и все элементарные стадии хорошо изучены [10].

### Результаты и их обсуждение

При введении АРК в окисляемую систему Ку – АН - АИБН наблюдается ингибирующий эффект, величина которого составляет 9 мин при концентрации супрамолекулярного комплекса 0,0025 моль/л (рис. 1). При добавлении АК в окисляемую систему Ку – АН - АИБН величина периода индукции составляет 11 мин при концентрации АК 0,002 моль/л (рис. 1). При добавлении АК и АРК в окисляемую систему Ку - АН – АИБН также наблюдается ингибирующий эффект, величина периода индукции составляет 31 мин при концентрации супрамолекулярного комплекса 0,0025 моль/л и АК 0,002 моль/л (рис. 1). Величина скорости поглощения кислорода после выхода из периода индукции для данных систем сопоставима и ее значение изменяется в пределах  $(2,76-2,63) \cdot 10^{-6}$  моль/(л·с). Показано, что АК и АРК являются ингибиторами радикально-цепного окисления, одновременное введение АК и АРК в окисляемую систему вызывает синергетический эффект.



**Рис.1** Окисление кумола кислородом в присутствии разных ингибиторов  
 [АИБН] = 0,02 моль/л, [КО<sub>2</sub>\*18-краун-6] = 0,0025 моль/л, [АК] = 0,002 моль/л,  
 [Ку] = 3,59 моль/л, АН, 75 °С: 1 – без ингибиторов; 2 – в присутствии АРК; 3 – в присутствии АК; 4 – в присутствии АК и АРК

При введении АК в окисляемую систему Ку – растворитель - АИБН наблюдается ингибирующий эффект, величина периода индукции увеличивается с ростом концентрации АК в смеси (табл.1). Увеличение концентрации АК в системе АИБН – Ку – ДМСО – АК приводит к росту величины периода индукции, но не такому, как в случае системы АИБН – Ку – АН – АК. Причиной такой разницы в численных значениях величины периода индукции, наблюдаемого в данных системах, стали разные значения полярностей обоих растворителей. Как показано в таблице 1, увеличение величины периода индукции связано со снижением полярности среды, которое получено в результате замены более полярного растворителя ДМСО на менее полярный растворитель АН. Замена растворителя приводит к значительному изменению величины периода индукции, но практически не влияет на скорость поглощения кислорода после выхода из него.

**Таблица 1.** Значения диэлектрической постоянной среды ( $\xi$ ) для разных растворителей, величины периода индукции ( $\tau$ ) и скорости поглощения кислорода ( $W_{[O]}$ ) системами  $Ku$  – растворитель – АИБН

[АК], моль/л	АН ( $\xi = 38$ )		ДМСО ( $\xi = 45$ )	
	$\tau$ , мин	$W_{[O]} \cdot 10^6$ , моль/(л·с)	$\tau$ , мин	$W_{[O]} \cdot 10^6$ , моль/(л·с)
0	-	2,21	-	2,76
0,001	8	2,02	20	2,09
0,004	30	1,53	28	1,99
0,006	51	2,00	34	2,00
0,009	82	1,77	42	1,79

Примечание: [АИБН] = 0,02 моль/л, [Ку] = 3,59 моль/л, 75 °С.

При введении АК в окисляемую систему  $Ku$  - растворитель – АИБН - АРК наблюдается ингибирующий эффект, величина периода индукции увеличивается с ростом концентрации АК в смеси (табл.2). Показано, что одновременное введение АК и АРК в окисляемую систему вызывает синергетический эффект. Для характеристики синергетического эффекта действия АК и АРК в процессе окисления  $Ku$  введем параметр синергетической эффективности (СЭ) ингибирования, который рассчитывается по уравнению:

$$СЭ = \frac{\tau_{АК+АРК}}{\tau_{АК} + \tau_{АРК}}$$

где  $\tau_{АК}$  – значение величины периода индукции, обусловленного действием АК;  
 $\tau_{АРК}$  – значение величины периода индукции, обусловленного действием АРК;  
 $\tau_{АК+АРК}$  – значение величины периода индукции, обусловленного действием АК и АРК.

Если  $СЭ > 1$ , то наблюдается синергизм действия ингибиторов; если  $СЭ = 1$ , то наблюдается аддитивное действие ингибиторов; если  $СЭ < 1$ , то наблюдается антагонизм действия ингибиторов. Как показано в таблице 2, в среде ДМСО наблюдается синергизм действия АК и АРК во всем выбранном диапазоне концентраций АК. В среде АН с ростом концентрации АК величина СЭ уменьшается, и уже при концентрации  $8,50 \cdot 10^3$  моль/л наблюдается антагонизм ингибирующего действия АК и АРК.

**Таблица 2.** Значения величины периода индукции и синергетической эффективности ингибирования (СЭ) АК и АРК в процессе окисления  $Ku$  в зависимости от концентрации АК

[АК] · 10 <sup>3</sup> , моль/л	АН			ДМСО		
	$\tau$ , мин		СЭ	$\tau$ , мин		СЭ
	АК	АК+АРК		АК	АК+АРК	
2,00	11	31	1,07	24	36	1,09
3,50	26	43	1,23	27	43	1,19
4,00	30	46	1,18	28	44	1,19
5,50	45	59	1,09	33	46	1,10
7,00	61	72	1,01	37	48	1,04
8,50	75	83	0,95	40	51	1,02

Примечание: [АИБН] = 0,02 моль/л, [АРК] = 0,0025 моль/л,  
[Ку] = 3,59 моль/л, 75 °С.

Для определения антирадикального действия АК и АРК было исследовано взаимодействие ДФПГ с АК и АРК в среде ДМСО. Показано, что АК ( $[АК] = 0,26 \cdot 10^{-4}$  моль/л) взаимодействует с 26,83 % ДФПГ, в этом случае антирадикальная эффективность (АЭ) ингибитора составляет 100 %. При введении смеси АК и АРК в растворе восстанавливается 14,45 % ДФПГ и АЭ снижается до 53,86 %. В таблице 3 представлены характеристики антирадикальной активности АК и АРК. Исследование взаимодействия ДФПГ с АК и АРК в среде ДМСО показало, что одновременное введение АК и супероксид-аниона в исследуемую систему вызывает эффект антагонизма.

**Таблица 3.** Значения величины оптической плотности (D), прореагировавшего количества ДФПГ (ДФПГр) и антирадикальной эффективности (АЭ) систем АК и АРК

Система	D	ДФПГр, %	АЭ, %
АК	0,7209	26,83	100
АК+АРК	0,8429	14,45	53,86

Примечание:  $[АК] = 0,26 \cdot 10^{-4}$  моль/л,  $[АРК] = 0,1 \cdot 10^{-4}$  моль/л,  $[ДФПГ] = 0,79 \cdot 10^{-4}$  моль/л.

### Выводы

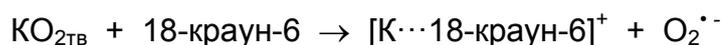
Таким образом, исследование радикально-цепного процесса окисления кумола в присутствии аскорбиновой кислоты и анион-радикала кислорода показало, что аскорбиновая кислота и супероксид-анион проявляют ингибирующее действие в изучаемом процессе.

Установлено, что в процессе окисления кумола в среде ДМСО наблюдается синергизм ингибирующего действия аскорбиновой кислоты и анион-радикала кислорода во всем выбранном диапазоне концентраций аскорбиновой кислоты. В процессе окисления кумола в среде АН синергизм ингибирующего действия аскорбиновой кислоты и анион-радикала кислорода наблюдается при концентрации аскорбиновой кислоты не более 0,07 моль/л, и уже при концентрации аскорбиновой кислоты 0,08 моль/л наблюдается антагонизм ингибирующего действия аскорбиновой кислоты и анион-радикала кислорода.

Исследование взаимодействия 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила с аскорбиновой кислотой и анион-радикалом кислорода показало, что присутствием супероксид-аниона обусловлено уменьшение антирадикального действия аскорбиновой кислоты.

### Экспериментальная часть

АРК получали по реакции комплексообразования супероксида калия ( $KO_2$ ) с краун-эфиром 18-краун-6, описанной в литературе [11]:



Для изучения антирадикального действия АК и АРК использовали реакцию со стабильным свободным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ) [12]. Исследования проведены на спектрофотометре Specord UV VIS в кюветах  $l=1$  см при  $T = 298$  К. Раствор ДФПГ, АК и АРК готовили в ДМСО, очищенном перегонкой. По 1,0 мл каждого из полученных растворов АК и АРК приливали к 2,0 мл раствора ДФПГ и через 5 мин после смешивания регистрировали значения оптической плотности при  $\lambda = 518$  нм.

За кинетикой процесса окисления следили газовольюмометрически, измеряя количество поглощенного кислорода при постоянной температуре 75 °С и постоянном парциальном давлении кислорода 760 мм. рт. ст. на установке описанной [13]. Для приготовления исследуемой системы в реактор брали навеску АИБН, навеску АК, добавляли 1 мл  $K_2O$  и 1 мл растворителя или раствора АРК. Иницированное АИБН окисление  $K_2O$  изучали при варьировании концентрации АК и фиксированной концентрации АРК. Изучение процесса в гомогенных условиях проводилось в кинетической области, где скорость реакции перестает зависеть от скорости перемешивания. Из полученных кинетических кривых величину периода индукции определяли графически, путем экстраполяции прямолинейных участков на кинетической кривой до их пересечения, затем из точки пересечения опускали перпендикуляр на ось абсцисс и определяли значение периода индукции как отрезок, отсекаемый на оси времени. В работе использовались  $K_2O$ , АН, ДМСО, очищенные согласно методике [14], 18-краун-6-полиэфир в виде комплекса с АН, который был очищен, как описано в [15], АК (ФС-42-2668-89),ДФПГ ("Aldrich",  $\omega = 97\%$ ). Определялись показатели качества АК: удельное вращение составило  $+ 20,9 \pm 0,4$ .

### Список использованной литературы

1. Свободные радикалы в живых системах [Текст] / Ю.А. Владимиров, О.А. Азизова, И.А. Деев [и др.] // Итоги науки и техники. Серия «Биофизика». — 1992. — Т. 29. — С. 3–250.
2. Nenadis N. Use of reference compounds in antioxidant activity assessment [Text] / N. Nenadis, O. Lazaridou, M.Z. Tsimidou // J. Agric. Food Chem. — 2007. — Vol. 55, № 14. — P. 5452–5460.
3. Fotia M.C. Non-phenolic radical-trapping antioxidants [Text] / M.C. Fotia, R. Amorati // J. Pharm. Pharmacol. — 2009. — Vol. 61. — P. 1435–1448.
4. Suresh A.K. Engineering Aspects of Industrial Liquid-Phase Air Oxidation of Hydrocarbons [Text] / A.K. Suresh, M.M. Sharma, T. Sridhar // Ind. Eng. Chem. Res. — 2000. — Vol. 39. — P. 3958–3997.
5. Sen C.K. Handbook of oxidants and antioxidants in exercise [Text] / C.K. Sen, L. Packer, O.O.P. Hanninen – Elsevier Science B.V., 2000. — 1207 p.
6. Ascorbic acid enhances ironinduced ferritin translation in human leukemia and hepatoma cells [Text] / I. Toth, J.T. Roger, J.A. McPhee [et al] // J. Biol. Chem. — 1995. — Vol. 270. — P. 2846–2852.
7. Sawyer D.T. Oxidation by Superoxide Ion of Catechols, Ascorbic Acid, Dehydrophenazine, and Reduced Flavins to Their Respective Anion Radicals. A Common Mechanism via a Sequential Proton – Hydrogen Atom Transfer [Text] / D.T. Sawyer, T.S. Calderwood, C.L. Johlman // J. Org. Chem. — 1985. — Vol. 50. — P. 1409–1412.
8. Бурлакова Е.Т. Исследование синтетических и природных антиоксидантов [Текст] / Е.Т. Бурлакова. — М.: Химия, 1992. — 297 с.
9. Афанасьев И.Б. Анион-радикал кислорода  $O_2^{\cdot-}$  в химических и биохимических процессах [Текст] / И.Б. Афанасьев // Успехи химии. — 1979. — Т. 48. — С. 977–1014.
10. Кучер Р.В. Соокисление органических веществ в жидкой фазе [Текст] / Р.В.Кучер, И.А. Опейда. — Киев: Наукова думка, 1989. — 207 с.
11. Takeda Y. Conductance Study of 18-Crown-6 and Dibenzo-18-crown-6 Complexes with  $K^+$  in Various Solvents [Text] / Y. Takeda // Bull. Chem. Soc. Japan. — 1983. — Vol. 56, № 3. — P. 866–868.
12. Kirino Y. Electron spin resonance spectra of radicals related to the intermediates in the oxidation of ascorbic acid. Radical produced from .gamma.-methyl-.alpha.-hydroxytetronic acid [Text] / Y. Kirino, Robert H. Schuler // J. Am. Chem. Soc. — 1973. — Vol. 95, № 21. — P. 6926–6928.
13. Эмануэль Н.М. Роль среды в радикально-цепных реакциях окисления органических соединений [Текст] / Н.М. Эмануэль, Г.Е. Заиков, З.К. Майзус. — М.: Наука, 1973. — 379 с.
14. Armarego W.L.F. Purification Of Laboratory Chemicals [Text] / W.L.F. Armarego, C.L.L. Chai. — Elsevier Science, 2003. — 608 p.
15. Хираока М. Краун-соединения. Свойства и применение [Текст] / М. Хираока. — М.: Мир, 1986. — 363 с.

Надійшла до редколегії 15.01.2013.

**О.В. Смирнова, О.І. Помещенко, І.В. Єфімова ВИВЧЕННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ І АНТИРАДИКАЛЬНОЇ ДІЇ АНІОН-РАДИКАЛА КИСНЮ І АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ**

Особливе значення в життєзабезпеченні біологічних об'єктів має регулювання окислювальних процесів, що обумовлено здатністю інгібіторів запобігати руйнівній дії проміжних продуктів - радикалів і перекисних сполук. Серед водорозчинних антиоксидантів найбільш активним є аскорбінова кислота, що має здатність зворотно окислюватися до дегідроаскорбінової кислоти. Завдяки цьому вона бере участь у найважливіших енергетичних процесах живої клітини, є визнаним антиоксидантом і антидотом вільнорадикальних механізмів. Одним з джерел радикалів в організмі є супероксид-аніон, який утворюється в численних біологічних процесах. З цієї точки зору цікавить спільна дія супероксид-аніона та аскорбінової кислоти в процесах радикально-ланцюгового окиснення.

У даній роботі досліджено процес радикально-ланцюгового окиснення кумолу в присутності аскорбінової кислоти і аніон-радикала кисню. Показано, що присутністю аскорбінової кислоти обумовлено наявність індукційного ефекту в процесах ініційованого окиснення кумолу, величина періоду індукції зростає із збільшенням концентрації аскорбінової кислоти в реакційній суміші. Показано, що супероксид-аніон також проявляє інгібуючу дію в досліджуваному процесі. Встановлено, що в процесі окиснення кумолу в середовищі диметилсульфоксиду спостерігається синергізм інгібуючої дії аскорбінової кислоти і аніон-радикала кисню у всьому обраному діапазоні концентрацій аскорбінової кислоти. В процесі окиснення кумолу в середовищі ацетонітрилу синергізм інгібуючої дії аскорбінової кислоти і аніон-радикала кисню спостерігається при концентрації аскорбінової кислоти не більше 0,07 моль/л. При концентрації аскорбінової кислоти 0,08 моль/л спостерігається антагонізм інгібуючої дії аскорбінової кислоти і аніон-радикала кисню. Дослідження взаємодії 2,2-дифеніл-1-пікрілгідразіла з аскорбіновою кислотою і аніон-радикалом кисню показало, що присутністю супероксид-аніона обумовлено зменшення антирадикального дії аскорбінової кислоти.

**Ключові слова:** радикально-ланцюгове окиснення, антиоксиданти, аскорбінова кислота, супероксид-аніон.

**O.V.Smirnova, A.I.Pomeshchenko, I.V. Efimova INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT AND ANTIRADICAL ACTION OF SUPEROXIDE ANION AND ASCORBIC ACID**

Of particular importance in the livelihood of biological objects is control of oxidative processes, which is due to the ability of inhibitors inactivate the ravages of intermediate products - peroxide compounds and radicals. Among the most active water-soluble antioxidant is ascorbic acid, which has the ability to reversibly oxidized to dehydroascorbic acid. Because of this it is involved in important energy processes of living cells, is a recognized antioxidant and free-radical antidote. One source of radicals in the living cells is the superoxide anion, which is formed in numerous biological processes. From this point of view the combined effect of the superoxide-anion and ascorbic acid in the radical chain oxidation processes.

In this paper we investigate the process of radical chain oxidation of cumene in the presence of ascorbic acid and oxygen radical anion. It is shown that the presence of ascorbic acid due to the induction effect in the processes initiated oxidation of cumene, the value of the induction period increases with increasing concentration of ascorbic acid in the reaction mixture. It is shown that superoxide anion also exhibits inhibitory activity in the studied process. Found that the oxidation of cumene in the environment of DMSO observed synergistic inhibitory effect of ascorbic acid and oxygen radical anion around a selected range of ascorbic acid concentrations. In the oxidation of cumene in acetonitrile synergism inhibitory effect of ascorbic acid and oxygen radical anion is observed at concentrations of ascorbic acid is not more than 0.07 mol/L. At a concentration of ascorbic acid 0.08 mol/L observed antagonism of the inhibitory effect of ascorbic acid and oxygen radical anion. Investigation of the interaction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl with ascorbic acid and oxygen radical anion showed that the presence of superoxide anion due to a decrease of antiradical activity of ascorbic acid.

**Keywords:** radical-chain oxidation, antioxidants, superoxide anion, ascorbic acid.

**Смирнова Ольга Владимировна** – мл.науч.сотр., Институт физико-органической химии и углехимии им. Л.М.Литвиненко НАН Украины, Донецк, Украина; e-mail: osmi79@mail.ru

**Помещенко Александр Иванович** – мл. научн. сотр. отдела исследований радикальных реакций, Институт физико-органической химии и углехимии им. Л.М.Литвиненко НАН Украины, Донецк, Украина; e-mail: rrid.ipocc@gmail.com

**Єфімова Ирина Владиславовна** – канд. хим. наук, ст. науч. сотр. отдела исследований радикальных реакций, Институт физико-органической химии и углехимии им. Л.М. Литвиненко НАН Украины, г. Донецк, Украина; e-mail: irusja.efimova@yandex.ua.