

Х І М І Ч Н І Н А У К И

УДК 541.127:542.943:535.379

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРИРОДНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ
ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

А.В.Белый, Н.И.Белая

Введение. Воздействие на человека неблагоприятных факторов окружающей среды, таких как УФ-излучение, радиация, загрязнение атмосферы и пищевых продуктов химическими соединениями, приводит к образованию избыточного количества свободных радикалов, которые ускоряют процесс окисления в организме и тем самым вызывают возникновение ряда патологических заболеваний [1]. Применение биоантиоксидантов в индивидуальном виде и в составе природных смесей является разумным решением данной проблемы.

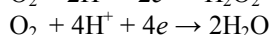
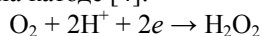
Источниками антиоксидантов для человека могут быть не только фрукты, овощи, пищевые продукты на растительной основе, но и биологически активные добавки (БАД) в виде растительных экстрактов, антиоксидантные свойства которых обусловлены содержанием в них биологически активных веществ фенольной природы – флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, кумаринов и т.д. [2]. Препараты лекарственных растений используются также для стабилизации окислительной порчи многих пищевых жиросодержащих продуктов. На основе экстрактов создаются различные пищевые добавки, лекарственные препараты, призванные не только повышать антиоксидантный статус в организме человека, но и стимулировать различные обменные процессы.

Такая востребованность растительных экстрактов привела к неконтролируемому росту ассортимента БАД на их основе. Поэтому в сложившейся ситуации на первый план выносятся проблемы разработки методов количественной оценки антиоксидантной активности (АОА) комплексных препаратов. Основным препятствием на пути таких исследований является ограниченный круг применяемых методов определения АОА, в большинстве своем дорогостоящих, неэффективных и зачастую трудоемких. Кроме того, результаты исследований часто несопоставимы, так как получены в разных модельных системах, не отражающих окислительные процессы организма человека и животного. Поэтому поиск других альтернативных методов определения антиокислительной эффективности лекарственных препаратов, пищевых продуктов и растительных объектов представляет актуальную задачу.

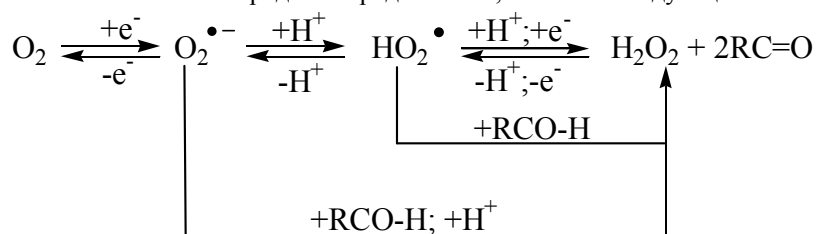
Вольтамперометрический метод определения АОА обладает рядом существенных преимуществ перед другими методами [3]. Во-первых, данный метод относится к экспрессным и позволяет провести определение в течение нескольких минут. Во-вторых, метод применим как в гомофазных, так и в гетерофазных системах. В-третьих, без изменения аппаратного оформления метод применим как в водных, так и в неводных растворах. Метод обладает селективностью и низким порогом определения, поскольку влияние на ход электрохимического процесса в условиях определения могут оказывать только вещества, способные окисляться-восстанавливаться. Одним из важнейших преимуществ метода является то, что измерения (при соответствующем аппаратном оформлении) могут быть выполнены *in vivo*.

Целью данной работы является оптимизация методики вольтамперометрического определения антиоксидантной активности веществ на примере аптечных экстрактов различных лекарственных трав.

Основной раздел. В основу вольтамперометрического метода положены следующие реакции восстановления кислорода, протекающие на катоде [4]:



Антиоксиданты (RCO-H) влияют на кинетику процесса электровосстановления O_2 (ЭВ O_2) благодаря реакции взаимодействия с активными кислородными радикалами, согласно следующей схеме:



В присутствии таких веществ наблюдается уменьшение тока электровосстановления кислорода. Чем выше антиоксидантная активность вещества, тем сильнее относительное уменьшение тока $\left(\frac{I_i}{I_0}\right)$. По соотношению падения тока в исследуемой системе к падению в системе с веществом, принятым в качестве стандарта, можно вычислить так называемый критерий антиоксидантной активности:

$$K = \frac{I_i}{I_0} \cdot \frac{1}{C_{AO}},$$

где I_i – ток электровосстановления кислорода в присутствии антиоксиданта в растворе, мкА; I_0 – ток в отсутствие антиоксиданта в растворе, мкА; C_{AO} – концентрация антиоксиданта. В качестве стандартного вещества часто используются в водных системах – кверцетин, галловая кислота, в жирорастворимых – ионол.

В экспериментах использовалась электрохимическая ячейка, состоящая из пластинчатого платинового катода, проволочного платинового электрода сравнения с полупроницаемой мембраной и хлорсеребряного электрода сравнения. Электрохимическая ячейка предназначена для регистрации изменения тока ЭВ O_2 под влиянием исследуемых веществ.

Для оценки работоспособности изготовленных электродов необходимо было установить влияние скорости развертки потенциала на отклик электрода, зависимость тока от концентрации кислорода (или антиоксиданта) в растворе, стабильность показаний электродов.

Исследование влияния скорости развертки на отклик электрода в электрохимической ячейке показало (рис. 1.), что применение слишком высоких скоростей развертки в наших условиях нецелесообразно, поскольку определить потенциал полуволны и плато диффузионного тока невозможно (рис. 1, кривая 1). При снижении скорости появляются искажения вольтамперометрической кривой в виде пиков (рис. 1, кривая 2), высота которых, пропорциональна концентрации кислорода. При использовании скоростей развертки меньше 50 мВ/с (вплоть до снятия кривой по точкам с ручной установкой потенциала) кривая принимает форму, близкую к классической (рис. 1, кривая 3), которая соответствует восстановлению кислорода по приведенным реакциям. Поэтому во всех дальнейших исследованиях скорость развертки устанавливалась в 20 мВ/с.

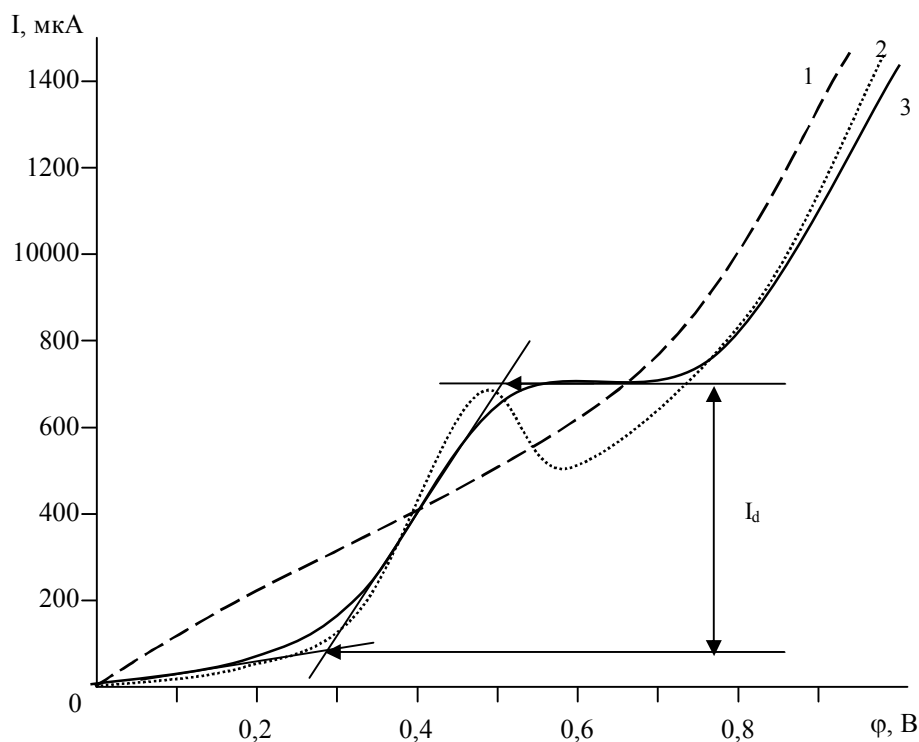


Рис. 1. Вольтамперограмма электровосстановления кислорода в 0,2 Н растворе серной кислоты при различных скоростях изменения потенциала рабочего электрода: 1 – 1 В/с; 2 – 0,5 В/с; 3 – 0,05 В/с

Поскольку основной задачей исследований является оценка АОА, предварительно были проведены исследования реакции электродной системы на добавку известного природного антиоксиданта – галловой кислоты. По точной навеске галловой кислоты был приготовлен рабочий раствор, который хранился в колбе с притертой пробкой для исключения реакции с кислородом воздуха. В электрохимическую ячейку добавлялась аликвота раствора, буферный электролит (0,2 Н серная кислота), объем раствора доводился дистиллированной водой до 75 мл, затем опускали электроды и выполняли измерения. Исследования показали линейную зависимость величины диффузионного тока от количества антиоксиданта (рис. 2.), что является основным условием применимости метода для оценки АОА. В дальнейшем относительную АОА можно будет оценивать по соотношению падения диффузионного тока при добавлении одинаковых количеств антиоксидантов.

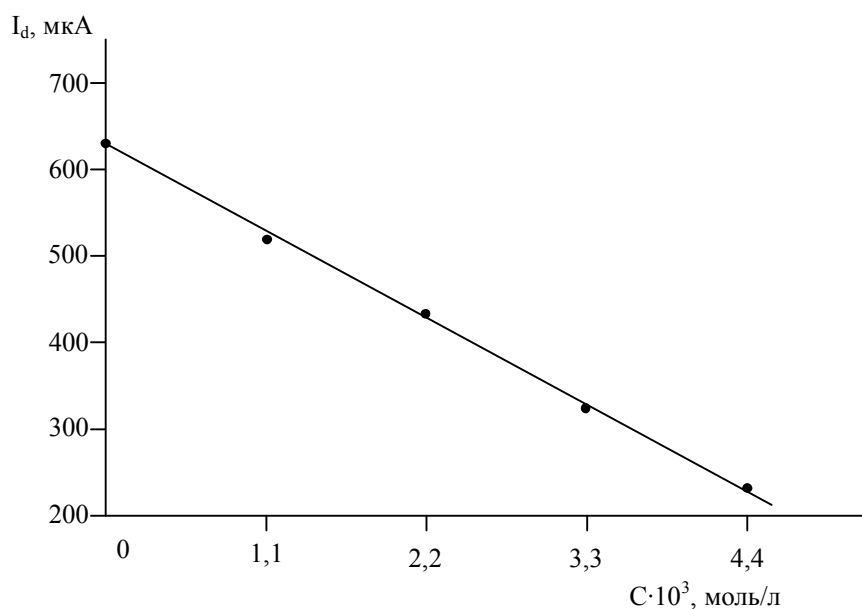


Рис. 2. Зависимость величины диффузионного тока от концентрации галловой кислоты

Для определения достоверности измерений АОА был проведен эксперимент по методу «введено-получено»: в ячейку вводилось точное количество галловой кислоты, которое затем определялось по показаниям диффузионного тока в ячейке с помощью градуировочного графика (рис. 2.) и сравнивалось с реально введенным. Была введена аликвота, содержащая $8,36 \cdot 10^{-4}$ моль галловой кислоты, определено $8,1 \cdot 10^{-4}$ моль. Таким образом, относительная погрешность измерений не превысила 3%.

Известно [3], что со временем поверхность твердых электродов пассивируется, вследствие чего изменяется отклик электродов. Для восстановления активности используются различные методы – механическая очистка, травление в растворах кислот, очистка электродов путем переполусовки в рабочем растворе или в иных растворах. В нашей работе использован последний приём. Для обеспечения стабильности электродов применяли очистку путем импульсного переключения полярности электродов в диапазоне -300 до +300 мВ в растворе азотной кислоты в воде (1:5), заканчивая процесс положительным потенциалом, противоположным рабочему. Использование такого варианта обеспечивает достаточную воспроизводимость результатов.

С помощью отработанной методики исследовали антиоксидантную активность наиболее востребованных аптечных экстрактов различных лекарственных растений. Аптечные водно-спиртовые экстракты валерианы, пустырника, пиона, боярышника, календулы, эхинацеи предварительно стандартизировались по сухому остатку методом гравиметрии, в них также определялось содержание фенольных соединений в пересчёте на таннин методом Левентала-Найбауэра [5]. Результаты исследований приведены в табл.

Для исследования электрохимического поведения экстрактов в электрохимическую ячейку вводился объем экстракта, который содержит 0,1 г сухого остатка, дозировка выполнялась микробюреткой. Ячейка заполнялась фоновым электролитом, в нее погружали электроды и снимали кривые зависимости тока от потенциала (рис.3, 4).

Таблица. Характеристики аптечных экстрактов некоторых лекарственных растений

Экстракт	Плотность, г/см ³	Сухой остаток (С.О.), масс.%	Объем экстракта, содержащийся в 0,1 г сухого остатка, мл	Содержание фенольных соединений (ФС) в сухом остатке, масс.%	Коэффициент АОА, К:100
Пион	0,959	2,26	4,61	44,5	1,68
Пустырник	0,904	2,97	3,72	10,6	0,99
Эхинацея	0,959	2,13	4,90	7,76	0,15
Календула	0,909	2,90	3,79	3,45	0,69
Валериана	0,900	4,65	2,39	5,82	0,76
Боярышник	0,906	2,90	3,80	3,04	1,30

Учитывая, что при разных потенциалах могут проходить разные электрохимические реакции, то для исследования экстрактов между собой вычисляли критерий антиоксидантной активности по сравнению с галловой кислотой [3]:

$$K = \frac{I_{AO}}{I_{ГК}} \cdot \frac{C_{ГК}}{C_{AO}}$$

где I_{AO} и $I_{ГК}$ – диффузионный ток в присутствии антиоксиданта (экстракта) и галловой кислоты соответственно, $C_{ГК}$ и C_{AO} – концентрация антиоксиданта (экстракта) и галловой кислоты.

На основании полученных результатов можно сказать, что в составе ряда экстрактов присутствуют по крайней мере две группы действующих веществ. Так, в экстракте пиона (рис. 3, кривая 1), вольтамперометрические кривые имеют три перегиба, первый из которых связан с влиянием фона (рис. 3, кривая 2), остальные – с потенциалом полуволны $\sim 0,75$ и $\sim 0,95$ В, вероятно, с влиянием разных групп фенолов. На кривых в экстрактах календулы, валерианы, пустырника и боярышника присутствует только перегиб с потенциалом полуволны $\sim 0,95$ В (рис. 4.). Связать перегибы с индивидуальными фенолами не представляется возможным, так как в состав лекарственных растений входит большое количество различных веществ, в том числе проявляющих антиоксидантную активность [2], поэтому антиоксидантная активность сравнивалась в реакциях, проходящих при потенциале 0,95 В.

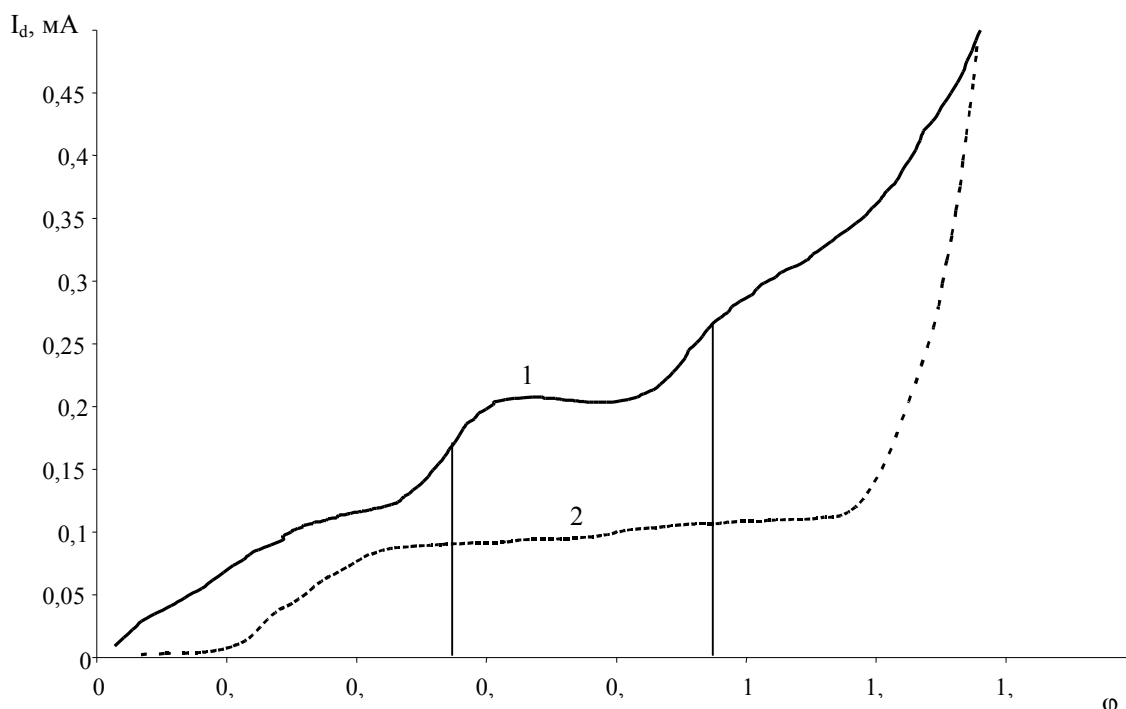


Рис. 3. Вольтамперометрические кривые для экстракта пиона (1) и фона (2)

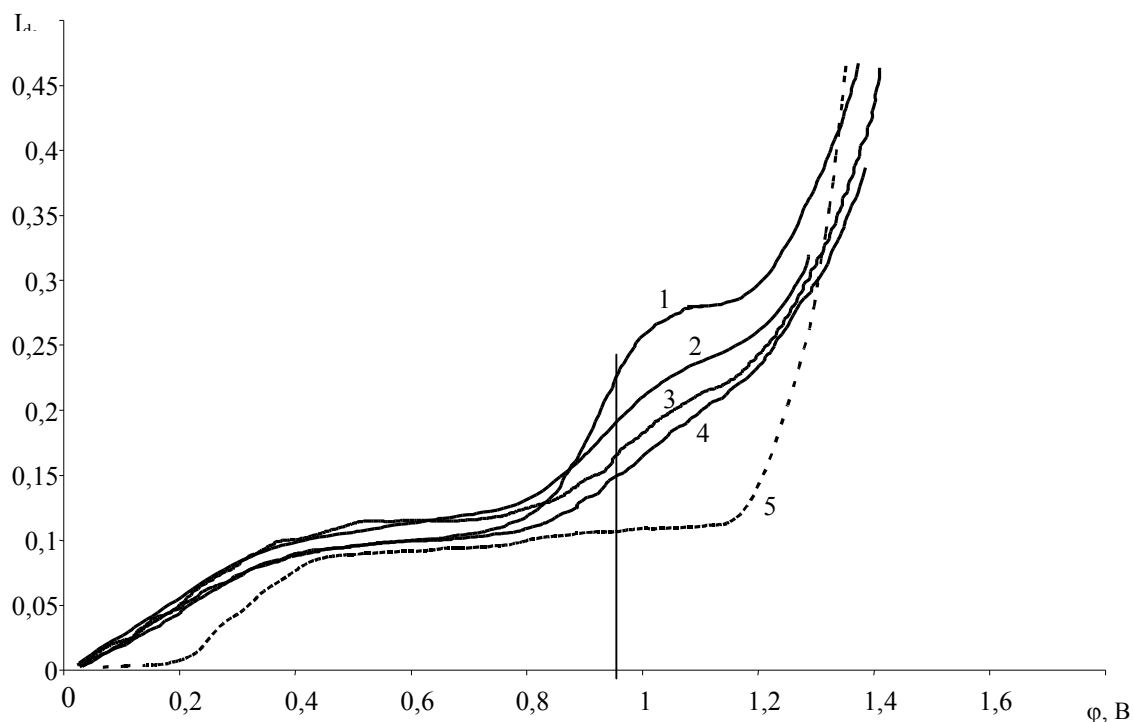


Рис. 4. Вольтамперометрические кривые для экстрактов боярышника (1), пустырника (2), валерианы (3), календулы (4) и фона (5)

Оказалось (табл.1.), что наиболее высокой антиоксидантной активностью обладает настойка пиона, наименьшей – экстракт эхинацеи. Установлено, что АОА экстрактов в основном определяется количеством фенольных соединений, а не общим содержанием сухого остатка. Из последовательности (рис. 5.) несколько выпадает экстракт календулы, в котором количество фенольных соединений выше, чем у

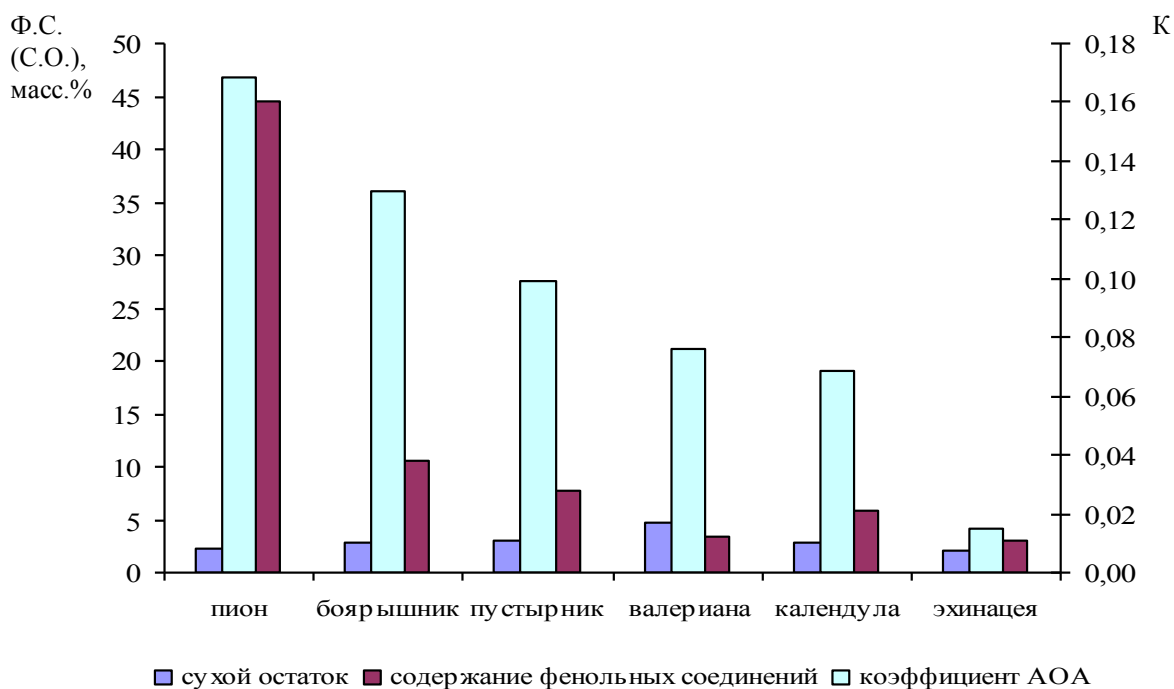


Рис. 5. Характеристики исследованных экстрактов

валерианы, но коэффициент АОА ниже, и настойка пиона, которая характеризуется существенно более высоким содержанием фенолов и коэффициентом АОА. Такое явление, скорее всего связано с особенностями состава индивидуальных фенолов в экстрактах, тем более, что в экстракте пиона содержится несколько различных групп веществ, проявляющих антиоксидантную активность по отношению к кислороду (рис. 3.). Вероятно, АОА экстрактов определяется не столько количеством фенолов, сколько соотношением содержания разных групп фенолов в каждом конкретном случае.

Выводы

1. Оработана методика вольтамперометрического определения антиоксидантной активности соединений, установлена применимость изготовленной электродной системы, вычислена погрешность определения коэффициента антиоксидантной активности по данной методике.
2. С применением методики вольтамперометрического определения антиоксидантной активности соединений исследована АОА аптечных экстрактов лекарственных растений. Среди исследуемых экстрактов валерианы, пустырника, пиона, боярышника, календулы и эхинацеи наибольшей АОА обладает настойка пиона, наименьшей – экстракт эхинацеи.
3. Показано, что АОА в основном определяется количеством фенольных соединений в экстрактах, однако существенную роль при этом играет соотношение содержания разных групп фенолов в каждом конкретном случае.

РЕЗЮМЕ

Відпрацьовано методику вольтамперометричного визначення антиоксидантної активності (АОА) сполук, встановлено придатність виготовлених електродної системи, розраховано похибку вимірювань. За допомогою даної методики досліджено коефіцієнт АОА аптечних екстрактів різних лікарських рослин. Встановлено, що найбільші антиоксидантні властивості виявила настойка півонії, найменші – екстракт ехінацеї. Показано взаємозв'язок між АОА та кількістю фенольних сполук в досліджених екстрактах.

SUMMARY

The technique of voltammetric determination of antioxydant activity (AOA) of compounds was adopted, the applicability of choosen electrodes was established, the measurement error of AOA coefficient on the given technique was calculated. With application of this technique the AOA of pharmaceutical extracts of plants was studied, the highest AOA has Tinctura Paeoniae Anomalaе, smallest – Tinctura Echinaceae Purpureae. The correlation between AOA and amount of phenolic compounds in extracts is shown.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Петрова А.П. Химический состав пырея ползучего и изучение его антиоксидантной активности при аллергическом контактном дерматите / А.П.Петрова, Е.А.Краснов, Э.В.Сапрыкина и др. // Хим. – фарм. – 2009. – Т.43, №1. – С.30-32.
2. Грибова Н.Ю. Влияние ультразвука при экстракции антиоксидантов из листьев толокнянки / Н.Ю.Грибова, Т.А.Филиппенко, А.Н.Николаевский и др. // Хим. – фарм. – 2008. – Т. 42, №10. – С. 43-45.
3. Дамаскин Б.Б. Электрохимия / Б.Б.Дамаскин, О.А.Петрий, Г.А.Цирлина. – М.: Химия, 2006. – 669 с.
4. Korotkova E. I. Study of antioxidant properties by voltammetry / E. I. Korotkova, Yu. A. Karbainov, A. V. Shevchuk // J. Electroanal. Chem. – 2002. – Vol. 58, № 1. – P.56-60.
5. Федосеева Л.М. Изучение дубильных веществ подземных и наземных вегетативных органов бадана толстолистного (*Bergenia Crassifolia* (L.) Fitch), произрастающем на Алтае / Л.М.Федосеева // Хим. раст. сырья. – 2005. – №3. – С. 45-50.

Поступила в редакцию 29.04.2010 г.