

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОЧАСТОТНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОДЫ И ЕЕ СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3. Гапочка Л.Д., Гапочка М.Д., Королев А.Ф. и др. Воздействие электромагнитного излучения КВЧ - и СВЧ - диапазонов на жидкую воду // Вестник МГУ. – Сер. - Физ. астрон. – 1994. – Т. 35, № 4. – С. 71 – 76.
4. Персидская А.Ю., Кузеев И.Р., Антипина В.А. О влиянии импульсного магнитного поля на механические свойства полимерных волокон // Ж. хим. физики. – 2002. – № 2. – С. 90.
5. Классен В.И. Омагничивание водных систем. – М.: Химия. – 1982. – 128 с.
6. Железцов А.В. Магнитные явления в растворах // Электронная обработка материалов. – 1976. - № 4. – С. 25 – 31.
7. Киргинцев А.Н., Соколов В.М., Ханаев В.И. К вопросу о влиянии магнитного поля на физико-химические свойства растворов // ЖФХ. – 1968. – Т. 48. – С. 301 – 303.
8. Миненко В.И., Петров В.И. О физико-химических основах магнитной обработки воды // Теплоэнергетика. – 1962. – Т. 9. – С. 63.
9. Бондаренко Н.Ф., Рохинсон Э.Е., Кудряшов В.А., Гак Е.З. Кристаллографический метод диагностики магнитогидродинамической активации водных растворов. // Докл. Рос. акад. с.-х. наук. – 1998. – № 5. – 47 – 48.
10. Караваева А.П., Маршаков И.К., Жидконожкина А.А. Некоторые свойства омагниченной глубокообессоленной воды // Теория и практика сорбционных процессов. – Воронеж. – 1976. – Вып. 11. – С. 78 – 83.
11. Карякин А.В., Кривецова Г.А., Соболева Н.В. Структурные исследования воды по инфракрасным спектрам поглощения // Докл. АН СССР. – 1975. – Т. 221, № 5. – С. 1096 – 1099.
12. Мартынюк В.С. К вопросу о синхронизирующем действии магнитных полей инфранизких частот на биологические объекты // Биофизика. – 1992. – Т. 37, вып. 4. – С. 669 – 673.
13. Вода - космическое явление / под ред. Ю.А. Рахманина, В.К. Кондратова – М.: РАЕН, 2002. – 427 с.
14. Юхневич Г.В. Инфракрасная спектроскопия воды. М.Наука. – 1973. – С. 140 – 145.
15. Зенин С.В., Тяглов Б.В. Гидрофобная модель структуры ассоциатов молекул воды // ЖФХ. – 1994. – Т. 68, № 4. – С. 636 – 641.

КИНЕТИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РАДИКАЛА ДФПГ С ЭКСТРАКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ РАСТЕНИЙ В РАЗЛИЧНЫХ СРЕДАХ

В.А. Волков, П.М. Пахомов

В настоящем исследовании разработан метод анализа кинетики взаимодействия суммы антирадикальных компонентов экстрактов растений со стабильным радикалом ДФПГ. Определены эквивалентные концентрации антирадикальных антиоксидантов и их эффективные кинетические параметры в различных реакционных средах для экстрактов зверобоя продырявленного, пижмы обыкновенной и тысячелистника обыкновенного. Эффективные константы скорости экстрактивных веществ в среде этанола всех изученных объектов по порядку величин соответствуют эквивалентным константам скорости реакций флавоноидов и оксикоричных кислот с ДФПГ. Проведение реакций в среде 0.1 мМ раствора HCl в этаноле, а также 1,4-диоксана позволяет изучать кинетику процесса, начиная с малых глубин превращения веществ и делает результаты более сопоставимыми с данными по взаимодействию антиоксидантов с радикалами при торможении цепного перекисного окисления в липидной фазе.

ВВЕДЕНИЕ

Стабильный хромоген-радикал 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ) широко используется для исследования суммарной концентрации антирадикальных антиоксидантов (АО) в различных объектах [1-3], в частности, в экстрактах лекарственных растений. Ценную информацию могли бы также дать сравнительные исследования кинетики взаимодействия суммы антиоксидантов различ-

ных лекарственных растений с радикалом ДФПГ. Ранее такие попытки были предприняты в работах [4-6]. Однако кинетический параметр (отношение глубины превращения радикала за первые пять минут реакции к глубине превращения радикала по окончании реакции), предложенный в [4], является некорректным, поскольку быстрая фаза процесса в большинстве случаев длится менее пяти минут. В работе [5] в качестве кинетического параметра было выбрано время достижения

ДФПГ глубины превращения 50%; так как экстракты были стандартизированы по массе сухого остатка, для части из них это время было определено в медленной фазе реакции (см. ниже), в которой антиоксиданты проявляют остаточную активность, обусловленную, в частности, продуктами реакции фенольных АО с радикалом. В этих случаях наблюдалось необоснованно резкое увеличение времени полупревращения ДФПГ по сравнению с экстрактами, для которых параметр определяли в быстрой фазе реакции. В исследовании [6] проанализирована антирадикальная активность экстрактов красного винограда и содержащихся в нем антоцианов по скорости восстановления ДФПГ. Однако методика, предложенная в этой работе, дала значение скорости реакции кверцетина с ДФПГ, примерно в три раза превышающее таковое для ионола, в то время как, согласно исследованиям [7-9], проведенным в соответствии с правилами классической кинетики, константа для кверцетина примерно в тысячу раз превышает константу для ионола. В настоящем исследовании авторы поставили задачу провести детальный анализ кинетики взаимодействия радикала ДФПГ с суммой АО экстрактов некоторых растений с целью разработки кинетического метода анализа антирадикальной активности многокомпонентных систем растительного происхождения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы лекарственных растений были собраны в Максатихинском районе Тверской области в период цветения в 2006-2007 г.г. и высушены при $t=40^{\circ}\text{C}$ в условия принудительной вентиляции [10] (электросушилка «Суховей»). Экстракцию 50 мг измельченного в течение 30 с в шаровой мельнице материала производили 95% этанолом в течении 30 минут при непрерывном встряхивании с частотой 180 мин^{-1} . Соотношение навески и растворителя 1:120 (масса/объем). Кинетические кривые падения оптической плотности ДФПГ при взаимодействии с экстрактивными веществами растений записывали на спектрофотометре «Specord M40» (Carl Zeiss Jena, ГДР), оснащенном компьютером с ПО Soft Spectra 5.0, термостатом и термостатируемыми кюветодержателями. Реакцию проводили в кварцевых кюветах толщиной 10 мм при температуре $293 \pm 1 \text{ K}$ путем приливания 2,4 мл $8,7 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ раствора ДФПГ к 0,8 мл исследуемого экстракта стандартного разведе-

ния¹. Обработка кривых осуществлялась на ПЭВМ с использованием ПС Microcal Origin 7.0. Начальные скорости реакций определялись в соответствии с [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Реакция ДФПГ с антирадикальными АО экстрактов растений имеет быструю (обусловленную отрывом от молекул АО самых подвижных атомов водорода) и медленную стадии (рисунок 1). Если в случае взаимодействия радикала с тиолами, аминами, а также большинством одноатомных фенолов кинетику реакции удобно наблюдать в условиях псевдопервого порядка при 10-50-кратном избытке по антиоксидантам [9;13;14] (константа скорости реакции этих веществ с ДФПГ в большинстве растворителей $< 1 \text{ л/моль}\cdot\text{с}$), то в случае АО экстрактов растений начальные стадии процесса идут настолько быстро, что даже при условии недостатка антиоксидантов по отношению к концентрации радикала кинетические кривые удается записать без применения специального оборудования для исследования кинетики быстрых реакций только при значительных глубинах превращения по АО. По этим кривым, однако, возможно с помощью метода, продемонстрированного на рисунке 1, определить оптические плотности растворов $D_{\text{кон}}$ (ординаты точек 1 и 2), при которых заканчивается быстрая фаза реакции и, соответственно, иссякают наиболее активные антирадикальные компоненты. Зная $D_{\text{кон}}$ и D_0 (оптическая плотность реакционной системы в момент начала реакции), можно вычислить начальную эквивалентную концентрацию антиоксидантов $C_{\text{АО}}$ в реакционной системе:

$$(C_{\text{АО}})_0 = (D_0 - D_{\text{кон}}) \cdot \epsilon_{\text{ДФПГ}}^{-1} \quad (1)$$

где $\epsilon_{\text{ДФПГ}}$ - молярный коэффициент экстинкции ДФПГ в этаноле, равный $(1,15 \pm 0,02) \cdot 10^4 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Путем умножения $C_{\text{АО}}$ на коэффициент разбавления исходного экстракта получается эквивалентная концентрация антиоксидантов в нем.

¹ Разведение, при котором в указанных условиях опыта без введения кислот в реакционную систему оптическая плотность радикала падает на 50% по сравнению с исходной за первые 30 минут реакции [11]. Этот параметр широко представлен в литературных источниках в качестве меры относительного содержания АО в изучаемом объекте. Так как в получаемые таким способом результаты вносят свой вклад продукты взаимодействия фенольных АО растительного происхождения с ДФПГ (медленная фаза реакции, см. ниже), у авторов возникла необходимость разработки более точного метода количественного анализа антирадикальных АО в экстрактах растений.

КИНЕТИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РАДИКАЛА ДФПГ С ЭКСТРАКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ РАСТЕНИЙ В РАЗЛИЧНЫХ СРЕДАХ

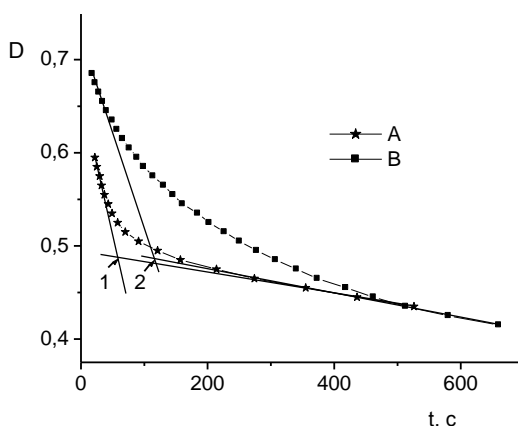


Рисунок 1. Кинетические кривые падения оптической плотности радикала ДФПГ при взаимодействии с экстрактивными веществами тысячелистника обыкновенного (А) и зверобоя продырявленного (В) в среде этанола и графическое определение концентрации антирадикальных АО в экстрактах (пояснения в тексте)

Кинетические кривые падения оптической плотности ДФПГ при взаимодействии с экстрактивными веществами растений спрямляются (рисунок 2) в координатах интегрального уравнения кинетической кривой реакции второго порядка [7;13]:

$$\ln(1-D_{\text{кон}}/D) - \ln((D_0 - D_{\text{кон}})/D_0) = k_{\text{эфф}} D_{\text{кон}} \epsilon_{\text{ДФПГ}}^{-1} t, \quad (2)$$

где $k_{\text{эфф}}$ – эффективная (кажущаяся) константа скорости реакции суммы АО с ДФПГ, л·экв⁻¹·с⁻¹, t - время, с.

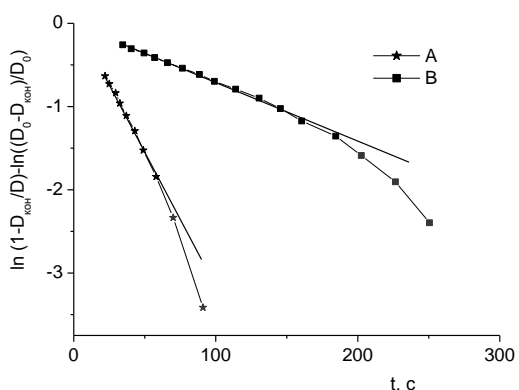


Рисунок 2. Анаморфозы кинетических кривых, изображенных на рисунке 1, в координатах $\ln(1-D_{\text{кон}}/D) - \ln((D_0 - D_{\text{кон}})/D_0)$, t (см. пояснения в тексте). Отклонения от прямолинейности на конечных участках являются артефактами, обусловленными резким уходом логарифмической функции к $-\infty$ при приближении ее аргумента к нулю

По тангенсу угла наклона прямой вычисляется значение кажущейся константы скорости:

$$k_{\text{эфф}} = \text{tg} \alpha \cdot \epsilon_{\text{ДФПГ}} / D_{\text{кон}} \quad (3)$$

Поскольку стехиометрия преобладающих в каждом конкретном экстракте АО неизвестна, получаемая таким образом величина $k_{\text{эфф}}$ относится к молю реакционноспособных групп (эквиваленту). Чтобы сравнивать ее с константами скорости, установленными для индивидуальных веществ, эти константы необходимо делить на соответствующие стехиометрические коэффициенты для получения эквивалентных констант.

Реакция фенольных АО с ДФПГ [15] протекает по двум параллельным механизмам, один из которых (SPLET) проходит через стадию ионизации фенольного соединения путем протонирования молекул растворителя, а второй (HAT) основан на непосредственной передаче атома водорода от антиоксиданта к радикалу. Органические кислоты, содержащиеся в экстрактах растений в различных концентрациях и имеющие разные pK_a , могут подавлять ионизацию фенольных АО, снижая скорость реакции на непредсказуемую величину. Так как в протонфильных растворителях (метанол, этанол) скорость реакции фенольных АО с ДФПГ определяется механизмом SPLET, его подавление с помощью вводимых извне кислот может существенно замедлить процесс и позволить проводить его изучение при малых глубинах превращения исходных компонентов. Кроме того, антиокислительная активность фенольных АО в липофильных системах основана исключительно на механизме HAT [15].

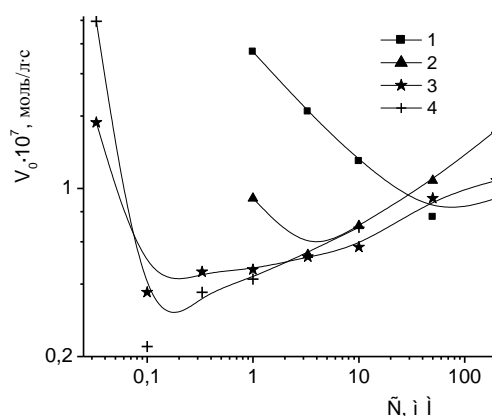


Рисунок 3. Изменения начальной скорости реакции ДФПГ с АО экстракта пижмы обыкновенной (в логарифмическом масштабе) при введении в реакционную систему кислот в различной концентрации: уксусной (1), монохлоруксусной (2), трихлоруксусной (3), соляной (4)

На рисунке 3 представлены графики зависимости начальной скорости реакции ДФПГ с экстрактивными веществами листьев пиж-

мы обыкновенной при выбранных нами стандартных условиях от концентрации в реакционной системе четырех кислот: уксусной, монохлоруксусной, трихлоруксусной, соляной. Из рисунка следует, что положение минимума начальной скорости и его глубина зависят от силы кислоты. Наиболее полное подавление механизма SPLET наблюдается в среде 0,1 мМ НСl. Кинетические кривые падения оптической плотностиДФПГ при взаимодействии с экстрактами пижмы в оптимумах концентраций кислот, а также без их добавления приведены на рисунке 4.

Из значений начальных скоростей реакций вычисляются эффективные константы скорости:

$$K_{\text{эфф}} = V_0 \cdot (C_{\text{АО}})_0^{-1} \cdot (C_{\text{ДФПГ}})_0^{-1} \quad (4)$$

где V_0 – начальная скорость реакции, экв/л·с, $(C_{\text{ДФПГ}})_0$ – концентрация радикала в начальный момент времени, экв/л. Погрешность определения V_0 составляет около 10%.

Также была проведена серия опытов в среде 1,4-диоксана². По данным [7], одноатомные фенолы в среде этого растворителя имеют наименьшие значения констант скорости реакции с ДФПГ. В таблице 1 представлены результаты анализа кинетики взаимодействия АО экстрактов пижмы обыкновенной, зверобоя продырявленного и тысячелистника обыкновенного с ДФПГ в различных средах. Значения $K_{\text{эфф}}$ в среде этанола для АО всех рассматриваемых экстрактов по порядку величин соответствуют эквивалентным константам (см. выше) флавоноидов и оксикоричных кислот [7], что служит косвенным подтверждением определяющей роли этих веществ в активности экстрактов растений в отношении радикала ДФПГ. Из таблицы также следует, что реакционная способность антиоксидантов тысячелистника и пижмы в среде 0,1 мМ НСl в этаноле практически не отличаются от таковых в среде диоксана. Что же касается экстракта зверобоя, в среде диоксана скорость взаимодействия его АО с радикалом примерно на порядок ниже таковой в этаноле, подкисленном соляной кислотой. В совокупности с кинетическими кривыми, приведенными на рисунке 1, это указывает на отличия в химическом строении молекул его АО от таковых экстрактов пижмы и тысячелистника. При этом концентрация АО в

высушенном материале листьев зверобоя существенно выше, чем в листьях пижмы и тысячелистника.

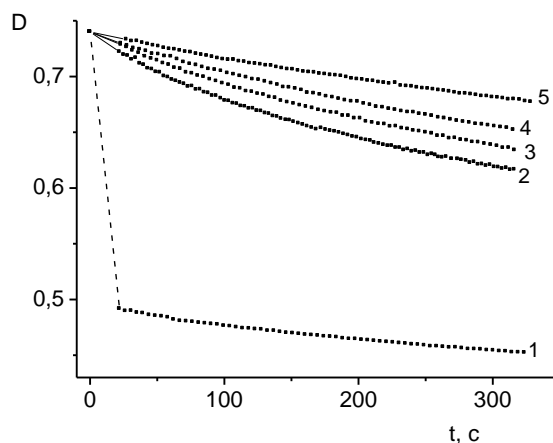


Рисунок 4. Кинетические кривые падения оптической плотностиДФПГ при $\lambda=517$ нм в ходе взаимодействия с АО спиртового экстракта пижмы обыкновенной: без подкисления среды (1); в присутствии 50 мМ уксусной кислоты (2); 3,3 мМ монохлоруксусной кислоты (3); 0,1 мМ трихлоруксусной кислоты (4); 0,1 мМ соляной кислоты (5). Пунктиром на кривой 1 обозначено резкое падение оптической плотности в самом начале процесса

Реакция радикала ДФПГ с антирадикальными АО экстрактов лекарственных растений, таким образом, может служить в качестве кинетической модели взаимодействия этих АО с нестабильными радикалами, ведущими цепи перекисного окисления липидов и углеводов, поскольку все эти реакции заключаются в отрыве наиболее подвижного атома водорода от молекулы АО и его переносе на радикал. Однако, для того чтобы на основании полученных таким образом результатов делать предположения об антиокислительной активности выделяемых из растений АО, необходимо исследовать способность образующихся из них после отрыва атома водорода радикалов к продолжению цепей окисления.

² $\epsilon_{\text{ДФПГ}}$ в диоксане, по нашим данным, равен $1,05 \cdot 10^4$ моль⁻¹ см⁻¹

**КИНЕТИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РАДИКАЛА ДФПГ С ЭКСТРАКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ
РАСТЕНИЙ В РАЗЛИЧНЫХ СРЕДАХ**

Таблица 1

Концентрации и эффективные кинетические параметры антирадикальных АО в экстрактах исследуемых растений

Экстракт	Концентрация антирадикальных АО в исходном экстракте, мэкв/л	Значения кинетических параметров АО в среде				
		этанолола	этанолола + 0.1 мМ HCl		диоксана	
		$k_{эфф}$, л/экв·с	$V_0 \cdot 10^9$, экв/л·с	$k_{эфф}$, л/экв·с	$V_0 \cdot 10^9$, экв/л·с	$k_{эфф}$, л/экв·с
Зверобой продырявленный	4.4...7.6	150...250	26	20	2.5	1.9
Тысячелистник обыкновенный	0.61...1.83	700...1600	37	26	41	29
Пижма обыкновенная	0.87...2.44	950...1300	20...30	16...23	14...22	11...17

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arnao M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case // Trends in Food Science & Technology. 2000. Vol. 11. P. 419-421.
2. Aruoma O.I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods // Mutation Research. 2003. Vol. 523-524. P. 9-20.
3. Бурлакова Е. Б., Алексенко Ф. В., Молочкина Е. М. и др. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. - М.: Наука. 1975. – 214 с.
4. Silva B.A., Ferreres F., Malva J.O., Dias A.C.P. Phytochemical and antioxidant characterization of Hypericum perforatum alcoholic extracts. // Food Chemistry. 2005. V. 90, N.1-2. P.157–167.
5. Филиппенко Т. А., Белая Н. И., Николаевский Ф. Н. Фенольные соединения растительных экстрактов и их активность в реакции с дифенилпикрилгидразилом // Хим.- фарм. журн. 2004. Т. 38. № 8. С. 34-36.
6. Птицын А. В. Технология выделения флавоноидов винограда *Vitis vinifera* сорта "Изабелла" для косметики и изучение их свойств. Автореф. дисс... канд. хим. наук. М. 2007. – 26 с.
7. Goupy P., Dufour C., Loonis M., Dangles O. Quantitative Kinetic Analysis of Hydrogen Transfer Reactions from Dietary Polyphenols to the DPPH Radical // J. Agric. Food Chem. 2003. Vol. 51. P. 615–622.
8. Musialik M., Litwinienko G. Scavenging of dpph Radicals by Vitamin E is Accelerated by Its Partial Ionization: the Role of Sequential Proton Loss Electron Transfer // Organic Letters. 2005. Vol. 7, N. 22. P. 4951-4954.
9. Litwinienko G., Ingold K. U. Abnormal Solvent Effects on Hydrogen Atom Abstractions. 1. The Reactions of Phenols with 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph) in Alcohols // J. Org. Chem. 2003. Vol. 68. P. 3433-3438.
10. Государственная фармакопея СССР, 11-е изд., Вып. 2. - М.: Медицина. 1990. - 398 с.
11. Ollanketo M., Peltoketo A., Hartonen K. et al. Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by pressurized hot water and conventional methods: antioxidant activity of the extracts // Eur. Foot Res. Technol. 2002. Vol. 215. P. 158-163.
12. Волков В.А., Дорофеева Н.А., Хижняк С.Д., Пахомов П.М. Изучение кинетики взаимодействия антиоксидантов экстрактов лекарственных растений со стабильным радикалом ДФПГ // Тез. докл. VII Международной конференции «Биоантиоксидант». М.: Изд-во РУДН. 2006. - С. 87-89.
13. Эмануэль Н. М., Кнорре Д. Г. Курс химической кинетики. Изд. 2-е. - М.: Высшая школа. 1969. - 422 с.
14. Landolt-Börnstein, New Series, Group II, Radical Reaction Rates in Liquids; Fischer, H., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, Germany, 1983; Vol. 13, subvolume c. P. 123-148.
15. Litwinienko G., Ingold K. U. Abnormal Solvent Effects on Hydrogen Atom Abstraction. 2. Resolution of the Curcumin Antioxidant Controversy. The Role of Sequential Proton Loss Electron Transfer // J. Org. Chem. 2004. Vol. 69. P. 5888 – 5896.