

Заверуха О. М.,

к.х.н., доц., доцент кафедри природничих наук та захисту навколишнього середовища, Львівський торговельно-економічний університет, м. Львів

Скоробогатий Я. П.,

к.х.н., проф., завідувач кафедри природничих наук та захисту навколишнього середовища, Львівський торговельно-економічний університет, м. Львів

АНТИОКСИДАНТНЕ І ІНГІБІТОРНЕ РЕГУЛЮВАННЯ АСКОРБІНОВОЮ КИСЛОТОЮ УТВОРЕННЯ СУПЕРОКСИД ЙОН-РАДИКАЛУ

Анотація. У статті розглянуто питання, пов'язані з дослідженням впливу аскорбінової кислоти на хемілюмінесцентну реакцію люмінолу з пероксикаприновою кислотою в присутності йонів Ніколу (II). Встановлено антиоксидантну і інгібаторну активність аскорбінової кислоти, що проявляється в дезактивації активних проміжних форм кисню – супероксид йон-радикалів. Запропоновано методику хемілюмінесцентного визначення аскорбінової кислоти із використанням реакції люмінолу з пероксикаприновою кислотою. Подано результати дослідження із використанням запропонованої методики. Подальші дослідження повинні бути спрямовані на вдосконалення розробленої методики для розширення переліку досліджуваних харчових продуктів.

Ключові слова: аскорбінова кислота, супероксид йон-радикал, люмінол, Нікол, хемілюмінесценція, пероксикапринова кислота, харчові продукти.

Zaverukha O. M.,

Ph.D., Associate Professor, Associate Professor of the Department of Natural Sciences and Environmental Protection, Lviv University of Trade and Economics, Lviv

Skorobogatyi J. P.,

Ph.D., Professor, Head of the Department of Natural Sciences and Environmental Protection, Lviv University of Trade and Economics, Lviv

ANTIOXIDANT AND INHIBITORIAL REGULATION BY THE ASCORBIC ACID OF THE SUPERROXIDE ION-RADICAL DEVELOPMENT

Abstract. The article deals with the issues related to the study of the influence of ascorbic acid on the chemiluminescent reaction of luminol with peroxy capric acid in the presence of Nicol (II) ions. The antioxidant and inhibitory activity of ascorbic acid is determined, which is manifested in the decontamination of active intermediate forms of oxygen – superoxide ion-radicals. The method of chemiluminescent determination of ascorbic acid with the use of luminol reaction with peroxy capric acid is proposed. The research results are submitted using the proposed method. Further research should be focused at improving the developed method for expanding the list of investigated food products.

Keywords: ascorbic acid, superoxide ion-radical, luminol, Nicol, chemiluminescence, peroxy capric acid, foodstuffs.

Постановка проблеми. Протягом останніх десятиріч характерним є інтенсивний розвиток досліджень в області одержання і використання антиоксидантів. Інгібітори окиснення відіграють важливу роль у сучасних технологіях виробництва полімерів, мастильних матеріалів, а також продуктів

харчування [1, 2]. Антиоксиданти також виконують функцію захисту живих організмів від шкідливої дії кисню повітря, світла, радіоактивного випромінювання. Це обумовлено підвищенням інтересу до дослідження вільнорадикальних процесів із участю активних форм кисню, а також їх ролі в біохімічних

процесах [3, 4]. Одним із джерел радикалів кисню в організмі є супероксид аніон $O_2^{\bullet-}$, що утворюється в біологічних процесах [1, 2]. Ключовою активною формою кисню є супероксид аніон-радикал $O_2^{\bullet-}$, що утворюється при приєднанні одного електрона до молекули кисню в основному триплетному стані. Супероксид радикал сам по собі має малу реакційну здатність і у водному розчині спонтанно дисмутує. Час його життя в біологічних субстратах становить від 10^{-6} с до кількох десятих секунди. Супероксид аніон-радикал становить небезпеку тим, що здатний пошкоджувати залізо-сірковмісні білки. При кислих значеннях pH супероксид аніон-радикал може протонуватися з утворенням більш реакційно здатного пероксидного радикалу OH^{\bullet} . Приєднання двох електронів до молекули кисню або одного електрона до супероксид-аніону призводить до утворення пероксиду водню, що є окиснювачем помірної сили [5-7].

Активні радикальні форми кисню постійно утворюються в живій клітині як продукти нормального метаболізму молекул кисню. Вони здатні генеруватися також під дією іонізуючого випромінювання. Однак підвищене продукування їх призводить до оксидативного стресу клітини. Наприклад, клітини крові на місці пошкодження починають продукувати РФК, що рекрутує тромбоцити, необхідні для початку процесу загоєння рани. РФК також запускають програмовану клітинну смерть (апоптоз).

Особливого значення набуває антиоксидантне регулювання цих процесів, що зумовлене здатністю інгібіторів дезактивувати руйнівну дію проміжних продуктів процесів окиснення пероксидними сполуками і радикалами. Захист клітини від дії радикальних форм кисню здійснюється антиоксидантними ферментами (супероксиддисмутаза, каталаза і пероксиредоксини) і низькомолекулярними антиоксидантами (вітамін С, глутатіон, сечова кислота). Крім цього, антиоксидантними властивостями володіють поліфеноли (наприклад, аналоги деяких компонентів червоного вина) [6].

Відомо, що аскорбінова кислота володіє здатністю зворотно окиснюватися і відновлюватися, завдяки чому вона бере участь у найважливіших енергетичних процесах живої клітки [3], є визнаним антиоксидантом і активним антидотом вільнорадикальних механізмів, перебіг яких посилюється при патологічних станах людини.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Аскорбінова кислота (вітамін С, H_2A) виконує роль активатора в багатьох окиснювально-відновних процесах, що протікають внаслідок життєдіяльності організмів [1]. Участь її в цих процесах обумовлена тим, що вона легко піддається як окисненню, так і відновленню. Окисненою формою аскорбінової кислоти є дегідроаскорбінова кислота. Процес окиснення оборотний $H_2A \leftrightarrow A + 2H^+ + 2e^-$ і

характеризується невисокими значеннями величини окиснювально-відновного потенціалу. При зміні кислотності середовища величина реального потенціалу змінюється від +0,326 В за pH 1,1 до -0,012 В за pH 8,7. Аскорбінова кислота і її йонізована форма аскорбат-йони залежно від pH середовища є доброю пасткою для супероксид йон-радикалів $O_2^{\bullet-}$. Константи швидкості взаємодії відповідно рівні $k_{O_2^{\bullet-}+аскорбіновикислота} = 2,7 \cdot 10^5 \text{ л}/(\text{моль} \cdot \text{с})$, $k_{O_2^{\bullet-}+аскорбат} = 1,5 \cdot 10^5 \text{ л}/(\text{моль} \cdot \text{с})$ [1].

Встановлено і детально обґрунтовано, що хемілюмінесценція (ХЛ) люмінолу виникає при взаємодії його з супероксид йон-радикалами $O_2^{\bullet-}$ [5]. Дослідженню хемілюмінесценції люмінолу з монопероксикарбонowymi кислотами ряду C_8-C_{13} присвячена велика кількість робіт [8-11]. На інтенсивність хемілюмінесценції в цих реакціях впливає ряд факторів:

- кислотність (проявляється в слабколужному і лужному середовищі);
- природа окиснювача (H_2O_2 , монопероксикарбонoві кислоти ряду C_8-C_{13} , кислота Каро);
- концентрації компонентів системи;
- наявність у системі йонів перехідних металів Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , що відіграють роль ефективних каталізаторів.

Постановка завдання. На основі цих досліджень були зроблені висновки про можливість застосування процесів ХЛ в практиці аналізу для визначення великої кількості ряду речовин у різних об'єктах. Були розроблені і запропоновані різні методики для кількісних визначень цих речовин.

Виклад основного матеріалу дослідження.

Експериментальна частина. Як окиснювач люмінолу нами була обрана пероксикапрінова кислота (C_{10}), оскільки у порівнянні з пероксидом водню вона володіє вищим значенням окиснювально-відновного потенціалу [9-11], що дозволяє підвищити чутливість хемілюмінесцентної реакції.

Результати та їх обговорення.

Йони Ni^{2+} належать до ефективних каталізаторів цієї реакції. Внесення в реакційне середовище аскорбінової кислоти вже в інтервалах концентрацій $10^{-5} - 10^{-4}$ М викликає повне гасіння хемілюмінесценції.

При цьому спостерігали специфічне явище, що не характерне для інших інгібіторів цієї реакції – на кінетичній кривій хемілюмінесценція – час появлявся індукційний період, величина якого була пропорційна концентрації аскорбінової кислоти. На основі отриманих даних про величину індукційного періоду оцінили швидкість витрачання аскорбінової кислоти (H_2A), що виявилась постійною і величина, якої не залежала від вихідної концентрації H_2A . Ці дані наведені в табл. 1.

Таблиця 1

Залежність періоду індукції $t_{ind.}$ і швидкості витрачання $W_{випр.}$ аскорбінової кислоти (H_2A) від її вихідної концентрації
($C_{H_2L} = 2 \cdot 10^{-5} M$; $C_{C_{10}} = 5 \cdot 10^{-4} M$; $C_{Ni^{2+}} = 1 \cdot 10^{-6} M$; $pH 12,2$; $n = 6$; $P = 0,95$)

$C_{H_2A} = \cdot 10^5 M$;	$t_{ind.}, c$	$W_{випр.} \cdot 10^7,$ моль \cdot л $^{-1} \cdot$ с $^{-1}$	Порядок реакції за аскорбіновою кислотою
1,0	21,0	4,76	0,0
2,0	45,7	4,38	
4,0	84,5	4,73	
6,0	121,8	4,93	
8,0	156,5	5,11	
10,0	210,0	4,76	
$W_{випр.} = (4,78 \pm 0,25) \cdot 10^{-7},$ моль \cdot л $^{-1} \cdot$ с $^{-1}$			

Таблиця 2

Залежність періоду індукції $t_{ind.}$ і швидкості витрачання $W_{випр.}$ аскорбінової кислоти (H_2A) від вихідної концентрації йонів Ni^{2+}
($C_{H_2L} = 2 \cdot 10^{-5} M$; $C_{C_{10}} = 5 \cdot 10^{-4} M$; $C_{H_2A} = 2 \cdot 10^{-5} M$; $pH 12,2$)

$C_{Ni^{2+}} = \cdot 10^7 M$;	$t_{ind.}, c$	$W_{випр.} \cdot 10^7,$ моль \cdot л $^{-1} \cdot$ с $^{-1}$	Порядок реакції за Ніколом
1,0	158,0	1,27	1,0
2,0	129,0	1,55	
4,0	96,0	2,08	
6,0	69,0	2,90	
8,0	56,0	3,50	
9,0	52,0	3,83	
10,0	45,7	4,38	

Отримані дані свідчать про частковий нульовий порядок реакції витрачання аскорбінової кислоти за інгібітором, тобто можна стверджувати, що окиснення H_2A відбувається активними радикальними формами окиснювача, що генеруються в реакційній системі в момент перебігу реакції каталітичного розкладу пероксикилоти.

Досліджували також вплив вихідної концентрації каталізатора цієї реакції йонів Ni^{2+} на величини індукційного періоду і швидкості витрачання інгібітора. Дані досліджень наведені в табл. 2.

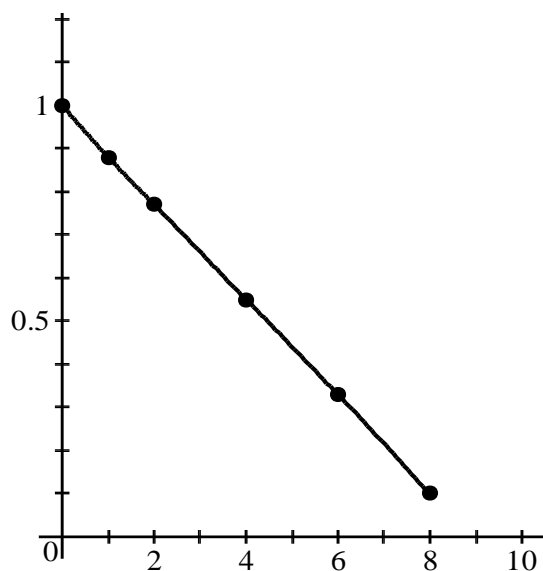
За результатами досліджень встановлено, що збільшення вихідної концентрації каталізатора призводить до зменшення часу індукції і зростання швидкості витрачання аскорбінової кислоти. Ці залежності мають лінійний характер. Порядок реакції окиснення аскорбінової кислоти за Ніколом рівний 1,0, що дає можливість стверджувати: процес окиснення аскорбінової кислоти відповідає кінетичному рівнянню першого порядку.

Встановлено, що ЕДТА (H_2Y^{2-}) зв'язує йони Ніколу (II) в каталітично неактивний. На рис. 1 показано інгібування ХЛ люмінолу при окисненні пероксикапріновою кислотою в присутності йонів Ni^{2+} добавками ЕДТА.

За даними рис. 2 встановлено, що стехіометрія зв'язування каталізатора в комплекс з ЕДТА рівна 1:1, адже тангенс кута нахилу прямої рівний 1,0.

Таким чином, змінюючи концентрацію вихідну ЕДТА при постійному вмісті люмінолу, ПК і Ніколу, можна впливати на кількість рівноважної проміжної форми окиснювача, що дає можливість підвищити чутливість визначення АК.

Лінійний характер залежності індукційного періоду від концентрації аскорбінової кислоти використано нами для розробки методики хронометричного визначення аскорбінової кислоти. Переваги застосування в якості каталізатора солей Ніколу порівняно з Fe (II), Fe (III), Co (II), Cu (II) обумовлено більш високою каталітичною активністю Ніколу (II) в даній реакції.



концентрація аскорбінової кислоти $C \times 10^7$ M

Рис. 1. Інгібіторна дія ЕДТА на хемілюмінесценцію люмінолу з пероксикапроиновою кислотою в присутності солей Ніколу (II): $C_{H_2L} = 2 \cdot 10^{-5} M$; $C_{C_{10}} = 5 \cdot 10^{-4} M$; $C_{Ni^{2+}} = 1 \cdot 10^{-6} M$, pH 12,12.

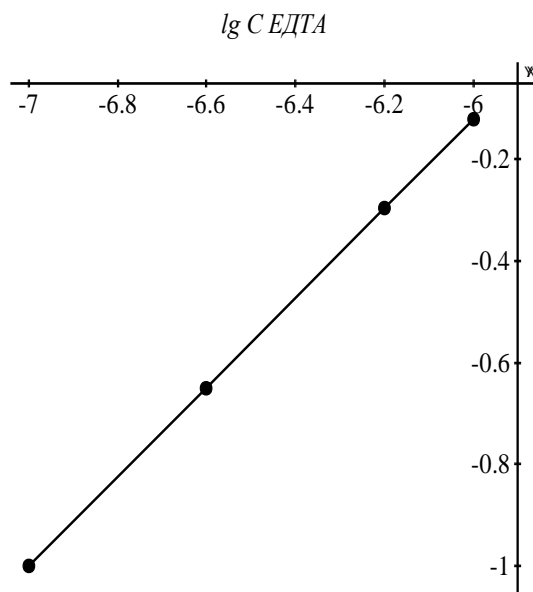


Рис. 2. Стехіометрія комплексоутворення ЕДТА з йонами Ніколу (II).

Методика визначення. До аналізованого розчину аскорбінової кислоти приливають аліквотну кількість титрованого розчину ЕДТА для зв'язування слідових кількостей металів змінної валентності. Концентрація ЕДТА повинна бути співмірна з концентрацією Ніколу (II). 1,0 см³ досліджуваного розчину АК переносять у кювету, встановлену в кюветне відділення хемілюмінометра, в яку вже попередньо поміщено 8,0 см³ ($1 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-4}$ M) лужного розчину люмінолу з pH 12,0 – 13,0, приливають 1,0 см³ $5 \cdot 10^{-5}$ M розчину C_{10} і 1,0 см³ $1 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-4}$ M розчину солі Ni^{2+} . Співвідношення Ni^{2+} : H_2Y^{2-} підбирають таким чином, щоб величина індукційного періоду коливалася в межах

30-120 с. Одночасно з внесенням каталізатора включають секундомір. Поява сигналу інтенсивності $XLI = 2I_{фон}$ свідчить про закінчення індукційного періоду. За калібрувальним графіком час індукції – концентрація аскорбінової кислоти знаходять вміст АК.

Вивчено можливість визначення аскорбінової кислоти в присутності органічних відновників – деяких вуглеводів і багатоатомних спиртів. Встановлено, що визначенню аскорбінової кислоти за запропонованою методикою не заважають 10-100 кратний надлишок фруктози, глюкози, манніту, сорбіту, арабіту, що, очевидно, пояснюється високою реакційною здатністю аскорбат-йонів при взаємодії з

$O_2^{\cdot -}$ Запропонована методика характеризується достатньо високою чутливістю, селективністю і проста у виконанні. Може бути запропонована для визначення аскорбінової кислоти в деяких харчових продуктах рослинного походження і в фармацевтичних препаратах.

Висновки і перспективи подальших досліджень у даному напрямі. Вивчено умови каталітичної реакції люмінолу з пероксикапріновою кислотою в присутності солей Ніколу (II) і аскорбінової кислоти. Встановлено специфічний ефект інгібування аскорбіновою кислотою хемілюмінесценції люмінолу з пероксикислотою в присутності катализатора простих солей Ni^{2+} з появою індукційного періоду. Встановлено кінетичні порядки компонентів реакції. Розроблено і запропоновано хемілюмінесцентний метод хронометричного визначення малих кількостей аскорбінової кислоти з межею визначення $5 \cdot 10^{-7}$ М в присутності 10-100 кратних надлишків деяких вуглеводів і багатоатомних спиртів. Подальше вдосконалення наведених у дослідженні методик визначення дозволить кількісно визначати більш широке коло речовин інгредієнтів харчових продуктів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Афанасьев И. Б. Анион-радикал кислорода $O_2^{\cdot -}$ в химических и биохимических процессах / И. Б. Афанасьев // Успехи химии. – 1986. – Т. 48, № 6. – С. 977.
2. Подорожний П. Г. Клиническая витаминология / П. Г. Подорожний, Я. И. Томашевский. – К.: Здоровье, 1977. – 142 с.
3. Cabeill D. E., Bielski B.H.J. Kinetics and mechanism for the oxidation of ascorbic / ascorbate by $HO_2/O_2^{\cdot -}$ radicals // J.Phys. Chem. – 1983. – V. 87, N 10. – P. 1809-1812.
4. Defining the Ascorbic Acid Crossover from Anti-Oxidant to Pro-Oxidant in A Model Wine Matrix Containing (+)-Catechin / M. P. Bradshaw, V. Cheyner, G. R. Scollary, P. D. Prenzler // J. Agric. Food Chem. – 2003. – Vol. 51. – P. 4126-4132.
5. Pignatelli, P. Pulcinelli, F.M., Lenti, L., Gazzaniga, P.P., Violi, F. Hydrogen Peroxide Is Involved in Collagen-Induced Platelet Activation // Blood. – 1998. – V. 91, N 2. – P. 484-490.
6. Sen C. K. The general case for redox control of wound repair // Wound Repair and Regeneration. – 2003. – N 11. – P. 431-438.
7. Krötz, F., Sohn, H.Y., Gloe, T., Zahler, S., Riexinger, T., Schiele, T.M., Becker, B.F., Theisen, K., Klauss, V., Pohl, U. NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment // Blood – 2002. – N 100. – P. 917-924.
8. Заверуха О. М. Про роль активних форм кисню в хемілюмінесцентній реакції люмінолу з пероксикислотами / Заверуха О. М., Скоробогатий Я. П., Зінчук В. К. // Вісн. Львів. ун-ту, сер. хім. – 1991, вип. 31. – С. 53-56.
9. Заверуха О. М. Про роль супероксид іон-радикала $O_2^{\cdot -}$ в хемілюмінесцентній реакції люмінолу з пероксикислотами / Заверуха О. М.,

Скоробогатий Я. П., Зінчук В. К. // Доп. АН України. – 1991. – № 12. – С. 92-95.

10. Заверуха О. М. Окислительно-восстановительные потенциалы растворов алифатических монопероксикарбоновых кислот / Заверуха О. М., Скоробогатий Я. П., Зінчук В. К. // Журн. физ. химии. – 1995. – Т. 65, № 9. – С. 1716-1717.

11. Скоробогатий Я. П. Кореляційний зв'язок між величинами редокspotенціалу алифатичних монопероксикислот та їх нестійкістю у водних розчинах : матеріали V Міжнародної конференції «Сучасні проблеми фізичної хімії» / Скоробогатий Я. П., Заверуха О. М. – Донецьк, 2011. – С. 241.

REFERENCES

1. Afanasjev, I. B. (1986), Anion-radical kislороda $O_2^{\cdot -}$ v himicheskikh i biologicheskikh procesah, Uspehi himiji. T. 5. № 6. P. 977.
2. Podorozhnyj, P. H. and Tomashevskij, Ja. I. (1977), Klinicheskaja vitaminologija, Zdorovje, Kyev, 142 p.
3. Cabeill, D. E. and Bielski, B.H.J. (1983), Kinetics and mechanism for the oxidation of ascorbic / ascorbate by $HO_2/O_2^{\cdot -}$ radicals, J.Phys. Chem. V. 87, N 10, pp. 1809-1812.
4. Bradshaw, M. P. Cheyner V., Scollary, G. R. and Prenzler, P. D. (2003), Defining the Ascorbic Acid Crossover from Anti-Oxidant to Pro-Oxidant in A Model Wine Matrix Containing (+)-Catechin, J. Agric. Food Chem. Vol. 51. Pp. 4126-4132.
5. Pignatelli, P. Pulcinelli, F. M., Lenti, L., Gazzaniga, P. P. and Violi, F. Hydrogen (1998), Peroxide Is Involved in Collagen-Induced Platelet Activation, Blood. V. 91, N 2. Pp. 484-490.
6. Sen, C. K. (2003), The general case for redox control of wound repair, Wound Repair and Regeneration. N 11. Pp. 431-438.
7. Krötz, F., Sohn, H.Y., Gloe, T., Zahler, S., Riexinger, T., Schiele, T. M., Becker, B. F., Theisen, K., Klauss, V. and Pohl U. (2002), NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment, Blood. N 100. Pp. 917-924.
8. Zaverukha, O. M. Skorobogatyj, Ja. P. and Zinchuk, V. K. (1991), Pro rol' aktivnyh form kysnnyu v hemiljuminescentnij reakciji luminolu z peroksykyslotamy, Visnyk Lvivskogo universytetu. Ser.him. vyp. 31. Pp. 53-56.
9. Zaverukha, O. M. Skorobogatyj, Ja. P. and Zinchuk, V. K. (1991), Pro rol' superoksyd ion-radikala $O_2^{\cdot -}$ v hemiljuminescentnij reakciji luminolu z peroksykyslotamy, Dopovidi AN Ukrainy. № 12. Pp. 92-95.
10. Zaverukha, O. M. Skorobogatyj, Ja. P. and Zinchuk, V. K. (1995), Okislitelno-vosstanovitel'nyje potentsialy rastvorov alifaticeskikh monoperoksykarboonyh kislот, Zhurnal fizicheskoy himiji. T. 65, № 9. Pp.1716-1717.
11. Skorobogatyj, Ja. P. and Zaverukha, O. M. (2011), Koreljacynyj зв'язок mizh velychynamy redokspotencialu alifatychnyh monoperoksykyslot ta jih nestijkistju u vodnyh tozchynah, Tezisy dokladov na V Mezhdunarodnoj konferenciji «Suchasni problem fizychnoji himiji», Donetsk. P. 241.