

УДК 543.062

ХРОНОАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЕМКОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА С 2,2'-БИПИРИДИНОМ

© 2024 г. Е. Р. Салимгареева^a, Е. Л. Герасимова^{a,*}, А. В. Карманова^a,
К. К. Саликова^a, С. Ю. Сараева^a, А. В. Иванова^a

^aУральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина,

Химико-технологический институт

ул. Мира, 19, Екатеринбург, 620002, Россия,

*E-mail: e.l.gerasimova@urfu.ru

Поступила в редакцию 31.10.2023 г.

После доработки 23.11.2023 г.

Принята к публикации 26.11.2023 г.

Предложенный подход к определению антиоксидантов с различной гидрофильностью основан на использовании комплекса железа(III) с бипиридином в качестве модели окислителя и хроноамперометрической регистрации аналитического сигнала. Выбор окислителя обусловлен его растворимостью в водной, органической и водно-органической средах. Выбраны условия регистрации хроноамперограмм: состав фона (ацетонитрил–ацетатный буферный раствор с pH 3.6 (9 : 1)), фоновый электролит (LiClO₄), потенциал ($E = 1.25$ В), время регистрации тока (80 с). Исследованы антиоксиданты, растворимые в органических и водно-органических средах: α -токоферол, кверцетин, катехин, кофейная кислота. Диапазоны определяемых концентраций составляют $(0.5\text{--}4) \times 10^{-4}$ М. Определена антиоксидантная емкость (АОЕ) этанольных экстрактов лекарственного растительного сырья. Наблюдается высокая корреляция значений АОЕ, полученных хроноамперометрическим и спектрофотометрическим методами, но только для объектов, собственная окраска которых не вносит вклад в величину поглощения Fe(II)–бипиридинового комплекса. Применение предложенного подхода и потенциометрического метода с использованием системы K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] показало, что значения, полученные потенциометрическим методом, значительно ниже для большинства исследованных настоев. Таким образом, при анализе многокомпонентных объектов, содержащих вещества с различной гидрофильностью, целесообразно применение окислителей с различной растворимостью, таких как Fe(III)–бипиридиновый комплекс.

Ключевые слова: антиоксидантная емкость, хроноамперометрия, экстракты лекарственного растительного сырья.

DOI: 10.31857/S0044450224060039, EDN: tutqbe

Исследование антиоксидантных свойств различных объектов продолжает оставаться актуальной задачей. В частности, речь идет об объектах фармации как одном из основных источников экзогенных антиоксидантов и биологических объектов и как источнике информации о возникновении и интенсивности окислительного стресса в организме [1]. Большинство растительных объектов, а также биологические жидкости содержат смеси гидрофильных и липофильных антиоксидантов, при этом водорастворимые антиоксиданты сконцентрированы в цитозоле клетки и плазме крови, в то время как липофильные антиоксиданты защищают клеточные мем-

браны от пероксидного окисления липидов. Оба этих типа антиоксидантов важны для функционирования антиоксидантной системы и совместно присутствуют во многих объектах [1, 2]. Для получения полной информации об антиоксидантных свойствах необходим подход, позволяющий определять гидрофильные и липофильные антиоксиданты при совместном присутствии.

Вследствие сложности поставленной аналитической задачи и наличия широкого круга объектов разработано большое количество способов исследования антиоксидантных свойств объектов [3–7]. Большинство подходов разработано только для водных сред и позволяет определять

водорастворимые или растворимые в органических растворителях антиоксиданты, но только в присутствии поверхностно-активных веществ [6, 7], что достаточно проблематично.

Наиболее распространенными методами исследования антиоксидантов, в том числе с различным типом растворимости, являются спектроскопические [3–5, 8]. К ним относятся походы, использующие в качестве модели окислителя специфические окрашенные свободные радикалы (катион-радикал 2,2'-азинобис-3-этилбензотиазолин-6-сульфонат (АБТС) и радикал 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФП)), либо комплексы железа с 1,10-фенантролином, 4,7-дифенил-1,10-фенантролином (бато-фенантролином), 2,4,6-трис(2-пиридил)-1,3,5-триазином с выраженной окраской. Как радикальные системы, так и комплексы железа с различными лигандами позволяют анализировать объекты как в водной, так и в водно-органической средах. Однако спектрофотометрический метод имеет ряд концентрационных ограничений, а также связанных с анализом окрашенных объектов.

Описанных недостатков лишены электрохимические методы исследования антиоксидантов [9–15]. К тому же в основе реакции антиоксиданта с окислителем как радикальной, так и нерадикальной лежит перенос электрона [1, 2], что позволяет рассматривать электрохимические методы как наиболее полно отвечающие донорно-акцепторной природе реакции антиоксидантов (АО) с окислителями. Среди электрохимических методов для исследования антиоксидантов широко применяют методы циклической вольтамперометрии и гальваностатической кулонометрии [9, 10], позволяющие проводить анализ в органической и водно-органической средах. Однако стоит отметить, что к недостаткам циклической вольтамперометрии относится зависимость аналитического сигнала от состояния поверхности электрода, т.е. природы материала, его дефектности и механической неоднородности, что особенно заметно в органических растворителях. Кроме того, при исследовании объектов сложного состава часто наблюдается перекрывание пиков окисления-восстановления, что затрудняет интерпретацию результатов. В методе гальваностатической кулонометрии с использованием электрогенерированных молекул галогенов возможно проведение анализа в органической среде за счет растворимости в ней молекулярного иода и брома, которые, однако, могут вступать не только в окислительно-восстановительные реакции с антиоксидантами, но и в реакции присоединения/замещения с рядом органических соединений, что также приведет к неверной интерпретации аналитического сигнала.

Достаточно перспективным является потенциометрический метод с использованием во-

дорастворимой системы гексацианоферратов [11–13]. Сдвиг потенциала происходит за счет взаимодействия антиоксиданта с окислителем и образованием/изменением состава потенциалоопределяющей окислительно-восстановительной пары гексацианоферратов. Данный метод прост в исполнении, доступен и экспрессен, апробирован на большом количестве индивидуальных природных и синтетических антиоксидантов и объектов сложного состава. Однако применение потенциометрии в исследовании АО различной гидрофильности ограничено выбором модельного окислителя, так как для получения стабильного и воспроизводимого сигнала необходима обратимая/квазиобратимая система, и в случае использования комплексных соединений окислитель и восстановитель системы должны обладать достаточными и близкими по величине константами устойчивости.

Описано [16, 17] использование комплексов железа с бипиридином для исследования антиоксидантных свойств спектрофотометрическим методом. Поскольку комплексы железа с 2,2'-бипиридином растворимы в водных, органических и водно-органических средах, достаточно перспективным является их применение при анализе объектов, содержащих антиоксиданты различной липофильности. Изменение окраски в данном случае происходит за счет электронного перехода и изменения степени окисления железа, поэтому комплекс железа с бипиридином может быть перспективным в качестве источника аналитического сигнала в электрохимических методах. Однако комплекс железа(III) с 2,2'-бипиридином характеризуется невысокой устойчивостью в сравнении с комплексом железа(II) с 2,2'-бипиридином, что ограничивает применение в потенциометрии этой потенциалоопределяющей окислительно-восстановительной пары. Комплекс железа(III) с 2,2'-бипиридином может быть успешно применен в других электрохимических методах, например в хроноамперометрии.

Описан [14, 15] хроноамперометрический подход, основанный на использовании в качестве источника информации тока электроокисления ферроцианида калия, образующегося при взаимодействии определяемых антиоксидантов с феррицианидом калия в водных средах. Преимуществом хроноамперометрического метода перед потенциометрическим является возможность использования одной формы окислительно-восстановительной пары.

Цель данной работы — разработка подхода для исследования липофильных антиоксидантов и объектов, содержащих гидрофильные и липофильные антиоксиданты при совместном присутствии, с использованием электрохимических методов.

В данной работе предлагается использовать железо-бипиридиновые комплексы и хроноамперометрическое детектирование аналитического сигнала. Использование комплекса железа с 2,2'-бипиридином позволит расширить возможности хроноамперометрического метода при исследовании антиоксидантов, а именно: проводить анализ объектов в водно-органической и органической средах и определять как гидрофильные, так и липофильные антиоксиданты, в том числе при совместном присутствии. Использование хроноамперометрической регистрации аналитического сигнала, в отличие от потенциометрической, позволит определять антиоксиданты с применением одной окисленной формы комплекса железа(III) с 2,2'-бипиридином, что создаст перспективы для использования для этой цели и других комплексов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Использовали следующие реактивы $K_4[Fe(CN)_6]$, $K_3[Fe(CN)_6]$, KH_2PO_4 , $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ х. ч. (Реахим, Россия); $FeCl_2$, $FeCl_3$, $LiClO_4$, глутатион, α -токоферол, кверцетин, катехин (Sigma-Aldrich, США); аскорбиновую кислоту, цистеин, галлову, кофейную кислоты (Fluka, Германия); 2,2'-бипиридин (PanReas AppliChem, Барселона, Испания); ацетонитрил, уксусную кислоту, $NaOH$ х. ч. (Гамма, Россия); спирт этиловый 95% (Росбио, Москва). Растворы антиоксидантов глутатиона, аскорбиновой кислоты, цистеина, галловой кислоты готовили в дистиллированной воде. Кверцетин, α -токоферол, катехин, кофейную кислоту растворяли в этиловом спирте. Антиоксидантную емкость хроноамперометрическим методом определяли в смеси ацетонитрил–ацетатный буферный раствор с pH 3.6 (9 : 1), потенциометрическим – в фосфатном буферном растворе с pH 7.4.

Объектом анализа служили этанольные настои лекарственного растительного сырья, приобретенные в аптечной сети: боярышника плоды (70% этанол), пустырника трава (70% этанол), валерианы корни (70% этанол) (Гиппократ, Россия), лимонника семена (95% этанол) (ООО “Тульская фармацевтическая фабрика”, Россия), ноготков цветки (70% этанол) (ОАО “Синтез”, Россия), полыни трава (70% этанол) (ЗАО “Ярославская фармацевтическая фабрика”, Россия), мяты перечной листья (95% этанол) (ОАО “Ивановская фармацевтическая фабрика”). Водно-этанольный экстракт цветков каркаде готовили следующим образом: 2 г цветков каркаде измельчали и заливали 20 мл водно-спиртового раствора (95% этанола). Настаивали в темном месте в течение суток при комнатной температуре, затем экстракт отфильтровывали и анализировали фильтрат.

Приборы и оборудование. Хроноамперограммы и циклические вольтамперограммы регистрировали с использованием потенциостат-гальваностата μ AUTOLAB Type III (Metrohm Autolab, Голландия). Для измерений применяли стеклоглеродный дисковый электрод, хлорид-серебряный электрод ($Ag/AgCl/3$ М KCl) и графитовый стержень в качестве вспомогательного электрода (Metrohm, Голландия).

Для потенциометрических измерений использовали рН-метр Эксперт-рН (Эконикс-Эксперт, Россия) с редокс-платиновым электродом ЭПВ-1 и хлоридсеребряным электродом ЭВЛ-1 ($Ag/AgCl/3$ М KCl) (Гомельский ЗИП, Беларусь).

Для фотометрических измерений использовали спектрофотометр Evolution 201 (Thermo scientific, США).

Методы. Потенциометрическое определение антиоксидантной емкости с использованием системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ заключается в регистрации изменения потенциала, измеренного до (E_1) и после (E_2) введения определяемого соединения в раствор, содержащий систему гексацианоферратов калия [11]. Сдвиг потенциала является следствием химического взаимодействия антиоксидантов с окислителем $K_3[Fe(CN)_6]$ по реакции (1), т.е. изменения соотношения концентраций окисленной и восстановленной форм компонентов системы:



где AO – антиоксидант; AO_{Ox} – продукт окисления антиоксиданта, f – стехиометрический коэффициент перед $K_3[Fe(CN)_6]$ в реакции с антиоксидантом.

Антиоксидантная емкость эквивалентна эффективной концентрации $K_3[Fe(CN)_6]$, вступившего во взаимодействие с антиоксидантом, выражается в универсальных единицах М-экв (моль-экв/л) и рассчитывается по формулам (2), (3):

$$AOE = \frac{c_{Ox} - \alpha c_{Red}}{1 + \alpha} \cdot q, \quad (2)$$

$$\alpha = (c_{Ox} / c_{Red}) 10^{(E_2 - E_1)F/2.3RT}, \quad (3)$$

где c_{Ox} – концентрация $K_3[Fe(CN)_6]$, М; c_{Red} – концентрация $K_4[Fe(CN)_6]$, М; E_1 – потенциал, измеренный до введения исследуемого образца, В; E_2 – потенциал, измеренный после добавления исследуемого образца, В; q – коэффициент разбавления образца; R – универсальная газовая постоянная, $R = 8.31$ Дж/(К·моль); T – температура, К.

В процессе анализа фиксируется стационарное значение потенциала, изменение которого не превышает 1.0 мВ за минуту.

Спектрофотометрическое определение антиоксидантной емкости с использованием комплекса $[Fe(Py)_3]^{3+}$ основано на регистрации оптической плотности ярко окрашенного комплекса $[Fe(Py)_3]^{2+}$ ($\lambda_{\max} = 535$ нм) [16], образующегося в результате взаимодействия антиоксидантов образца с модельным окислителем. В качестве стандартного раствора использовали α -токоферол.

Для определения $AOE_{\text{опт}}$ готовили раствор, содержащий $FeCl_3$ и 2,2'-бипиридин в соотношении 1 : 3. Анализ проводили в среде ацетонитрил–ацетатный буферный раствор с pH 3.6. К 5 мл раствора комплекса железа с бипиридином добавляли аликвоту исследуемого образца объемом 0.05 мл, выдерживали 20 мин при постоянном перемешивании. Оптическую плотность раствора измеряли при длине волны 535 нм в стеклянных кюветах толщиной 10 мм.

Зависимость оптической плотности (A) от концентрации α -токоферола ($c_{\alpha\text{-ток}}$) описывается уравнением: $A = 12.17 \times 10^3 c_{\alpha\text{-ток}} + 0.04$.

$AOE_{\text{опт}}$ рассчитывали по уравнению (4):

$$AOE_{\text{опт}} = A \cdot n / b, \quad (4)$$

где A – значение оптической плотности раствора после добавления образца, содержащего антиоксиданты; b – тангенс угла наклона зависимости оптической плотности от концентрации аскорбиновой кислоты, $b = 12.17 \times 10^3$; n – степень разбавления пробы.

Хроноамперометрическое определение антиоксидантной емкости с использованием комплекса $[Fe(L)_3]^{3+}$ основано на регистрации хроноамперограмм (ХАГ) комплекса $[Fe(L)_3]^{2+}$, образующегося в результате протекания реакции (5) [14]:



Объекты анализа чаще всего имеют сложную многокомпонентную матрицу, поэтому для определения антиоксидантной емкости хроноамперометрическим способом ($AOE_{\text{ХАГ}}$) (4) применяют метод добавок, позволяющий учесть влияние матрицы образца и таким образом снизить погрешность анализа. $AOE_{\text{ХАГ}}$ выражается в М-экв (моль-экв/л) и рассчитывается по формуле (6):

$$AOE_{\text{ХАГ}} = \frac{c_{\text{доб}} \cdot I_{\text{АО}}}{I_{\text{АО+доб}} - I_{\text{АО}}}, \quad (6)$$

где $c_{\text{доб}}$ – концентрация добавки $[Fe(L)_3]^{2+}$, М; $I_{\text{АО}}$ – ток окисления $[Fe(L)_3]^{2+}$, измеренный после добавления исследуемого образца, А; $I_{\text{АО+доб}}$ – ток окисления $[Fe(L)_3]^{2+}$, измеренный после введения добавки комплекса железа $[Fe(L)_3]^{2+}$, А.

Хроноамперограмму регистрировали после совместного выдерживания комплекса железа с исследуемым объектом в течение 20 мин при постоянном перемешивании.

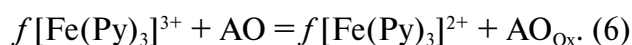
Циклическую вольтамперометрию использовали для исследования окислительно-восстановительных свойств комплекса $[Fe(Py)_3]^{2+}$ и определяемых антиоксидантов. Для этого регистрировали циклические вольтамперограммы (ЦВА) 1 мМ растворов $[Fe(Py)_3]^{2+}$ и антиоксидантов в среде ацетонитрил–ацетатный буферный раствор с pH 3.6 (9 : 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Образование устойчивого комплекса $[Fe(Py)_3]^{2+}$ зависит от концентрации реагирующих с ним антиоксидантов в образце, что позволяет оценивать антиоксидантную емкость по изменению электрохимических параметров комплекса $[Fe(Py)_3]^{2+}$, например силы тока (I , А).

На рис. 1 представлена ЦВА $[Fe(Py)_3]^{2+}$. Квазиобратимый характер ЦВА позволяет разделить процессы окисления и восстановления комплекса и зарегистрировать их отдельно методом хроноамперометрии.

В качестве аналитического сигнала использовали ток окисления комплекса $[Fe(Py)_3]^{2+}$ при потенциале $E = 1.25$ В, образующегося в результате реакции (7):



При выбранном значении потенциала регистрировали хроноамперограммы комплекса $[Fe(Py)_3]^{2+}$ при его разных концентрациях в среде ацетонитрил–ацетатный буферный раствор с pH 3.6 (9 : 1), 0.01 М $LiClO_4$ (рис. 2). Линейная зависимость приращения тока окисления комплекса $[Fe(Py)_3]^{2+}$ от его концентрации в диапазоне 2×10^{-6} – 9×10^{-4} М позволяет использовать выбранную систему для определения AOE . Уравнение регрессии имеет вид $I = (3.92 \pm 0.08) c - (0.031 \pm 0.001)$, $R^2 = 0.9998$. Предел обнаружения, минимальное содержание определяемого вещества в пробе, сигнал от которого можно надежно отличить от фона [18], составил $c_{\min} = 2 \times 10^{-6}$ М на примере α -токоферола.

Из ХАГ видно, что ток окисления достигает установившегося значения через 75 с после начала измерения, поэтому в дальнейшем ток регистрировали в течение 80 с.

В качестве модельных растворов антиоксидантов выбрали соединения с известными механизмами окисления, растворимые в водно-органических и органических средах: α -токоферол, кверцетин, катехин, кофейную кислоту. На рис. 3 приведены ЦВА выбранных антиок-

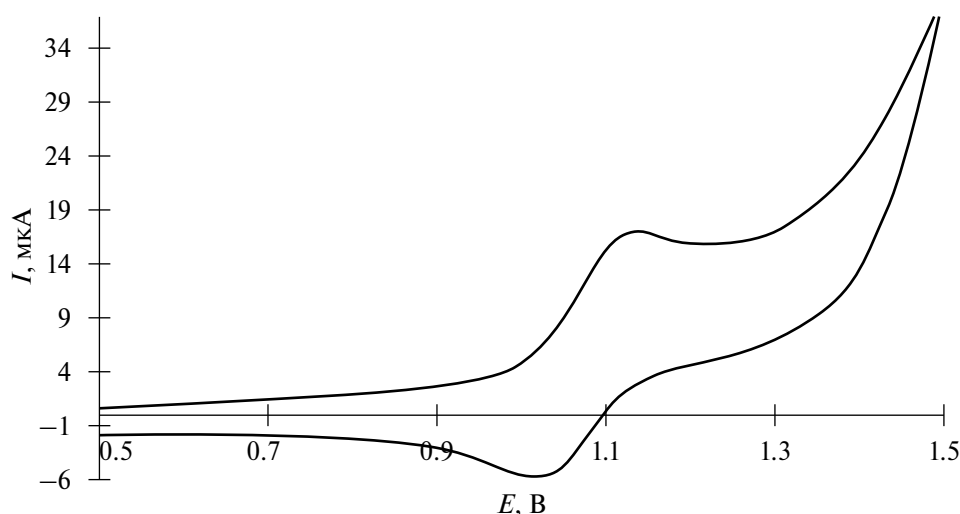


Рис. 1. Циклическая вольтамперограмма комплекса $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{2+}$ ($c = 1 \text{ мМ}$), зарегистрированная на стеклоуглеродном электроде в смеси ацетонитрил–ацетатный буферный раствор с pH 3.6 (9 : 1), содержащей с 0.01 моль/л LiClO_4 . Скорость сканирования 0.1 В/с.

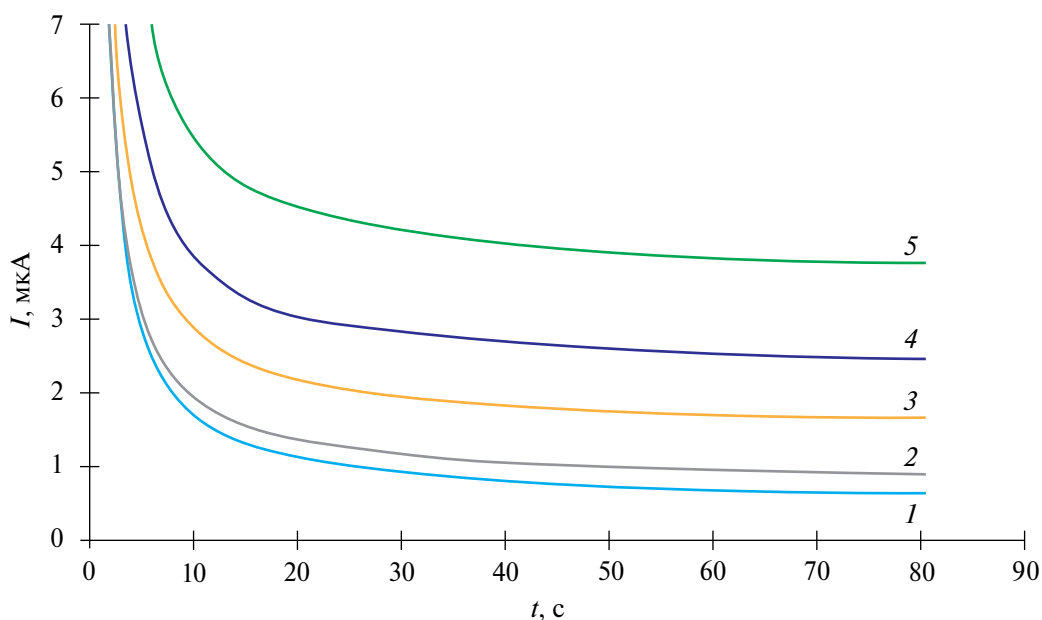


Рис. 2. Хроноамперограммы комплекса $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{2+}$ ($c = 1 \text{ мМ}$), зарегистрированные на стеклоуглеродном электроде в смеси ацетонитрил–ацетатный буферный раствор с pH 3.6 (9 : 1), содержащей 0.01 моль/л LiClO_4 , $E = 1.25 \text{ В}$. $c(\text{Fe}(\text{II}))$, мМ: 1 – 0.01, 2 – 0.07, 3 – 0.3, 4 – 0.5, 5 – 0.8.

сидантов, в табл. 1 представлены потенциалы окисления комплекса $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{2+}$ и выбранных антиоксидантов. Из рис. 3 и табл. 1 видно, что потенциалы окисления выбранных АО меньше потенциала окисления $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{2+}$, что обеспечивает термодинамическую возможность протекания реакции между АО образца и выбранным модельным окислителем. Реакция между окислителем, находящимся в растворе в избытке, и антиоксидантами протекает полностью,

за счет чего исключается вклад посторонних процессов окисления выбранных модельных АО.

Хроноамперометрическим способом зарегистрировали ХАГ $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{2+}$, образующегося при взаимодействии АО с $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{3+}$ при разных концентрациях АО (рис. 4). В табл. 2 представлены полученные уравнения регрессии и диапазоны определяемых концентраций модельных АО.

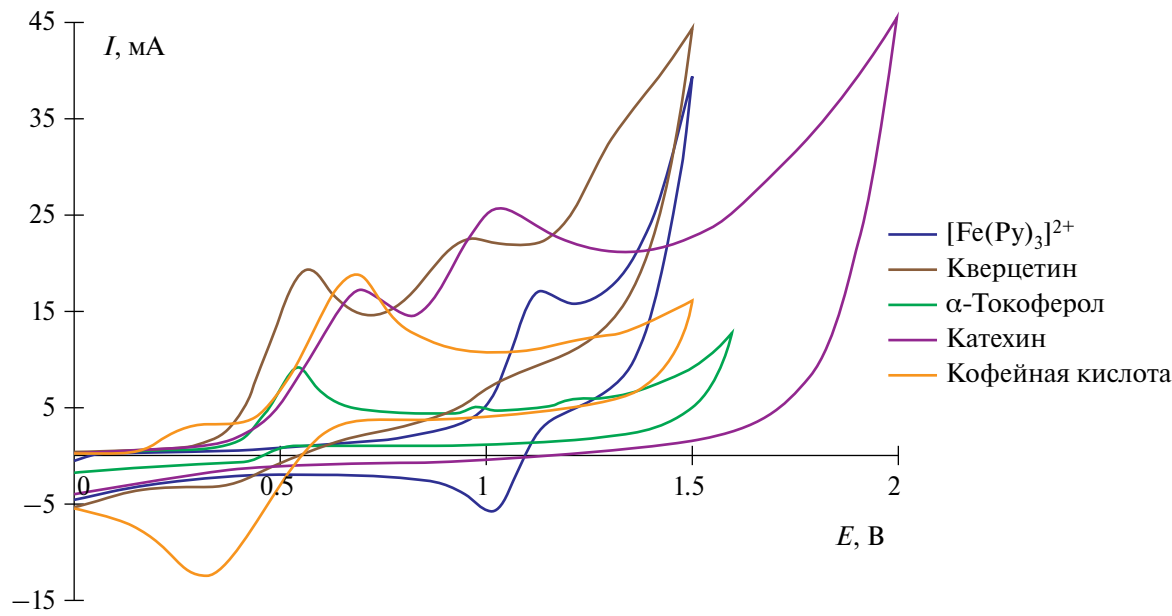


Рис. 3. Циклические вольтамперограммы комплекса $[Fe(Py)_3]^{2+}$, α -токоферола, кверцетина, катехина и кофейной кислоты ($c = 1$ мМ), зарегистрированные на стеклоуглеродном электроде в смеси ацетонитрил–ацетатный буферный раствор с pH 3.6 (9 : 1), содержащей 0.01 моль/л $LiClO_4$, скорость развертки потенциала 0.1 В/с.

Таблица 1. Потенциалы пиков окисления комплекса $[Fe(Py)_3]^{2+}$ и модельных антиоксидантов (ацетонитрил–ацетатный буферный раствор с pH 3.6 (9 : 1), 0.01 моль/л $LiClO_4$, $E = 1.25$ В)

Комплекс	Потенциал пика окисления, В	АО	Потенциал пика окисления, В	
			E_1 , В	E_2 , В
$[Fe(Py)_3]^{2+}$	1.25	α -Токоферол	0.55	0.95
		Кверцетин	0.57	
		Катехин	0.70	
		Кофейная кислота	0.70	

Таблица 2. Уравнения регрессии и диапазоны определяемых концентраций модельных антиоксидантов (1 мМ $[Fe(Py)_3]^{2+}$, ацетонитрил–ацетатный буферный раствор с pH 3.6 (9 : 1), 0.01 моль/л $LiClO_4$, $E = 1.25$ В)

Антиоксидант	Уравнение регрессии (I , мкА; c , мМ)	R^2	Диапазон определяемых концентраций, $c \times 10^4$, М
α -Токоферол	$I = (8.57 \pm 0.17)c + (0.092 \pm 0.003)$	0.9993	0.005–4
Кверцетин	$I = (2.88 \pm 0.09)c + (1.75 \pm 0.05)$	0.9334	0.005–2
Катехин	$I = (21.77 \pm 0.87)c + (0.42 \pm 0.01)$	0.9842	0.005–3
Кофейная кислота	$I = (11.07 \pm 0.22)c + (0.89 \pm 0.03)$	0.9636	0.005–4

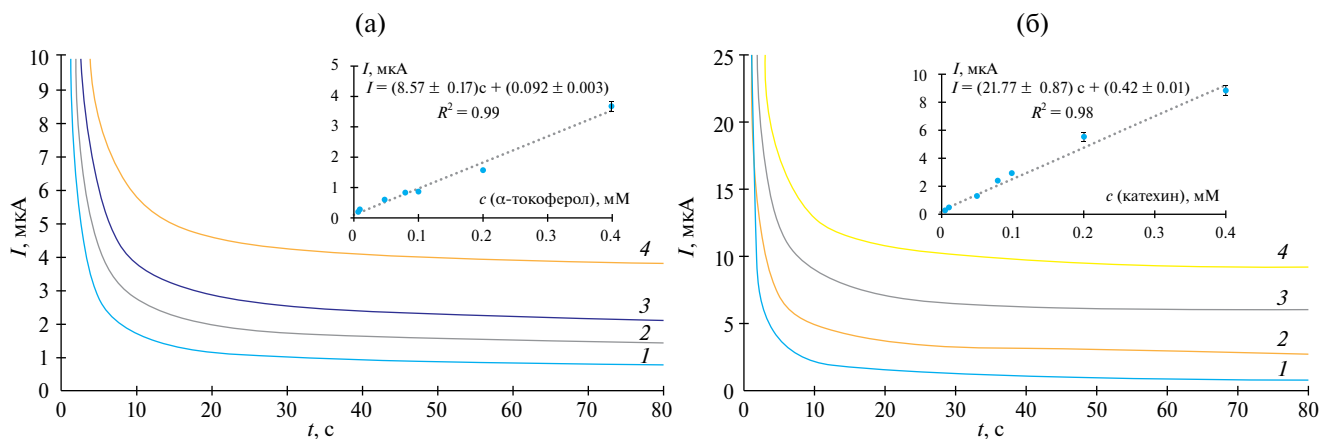


Рис. 4. Хроноамперограммы комплекса $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{2+}$ ($c = 1 \text{ mM}$), образующегося при взаимодействии $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{3+}$ с (а) α -токоферолом и (б) катехином в разных концентрациях, зарегистрированные на стеклоуглеродном электроде в смеси ацетонитрил–ацетатный буферный раствор с pH 3.6 (9 : 1), содержащей 0.01 моль/л LiClO_4 , $E = 1.25 \text{ V}$. $c(\alpha\text{-токоферол})$, mM: 1 – 0.005, 2 – 0.1, 3 – 0.2, 4 – 0.4. $c(\text{катехин})$, mM: 1 – 0.008, 2 – 0.08, 3 – 0.2, 4 – 0.4.

Методом введено–найдено определили АОЕ модельных растворов АО, расчет проводили по уравнению (6) (табл. 3). Полученные значения АОЕ с учетом стехиометрических коэффициентов согласуются с приведенными в литературе с учетом механизмов окисления АО [13].

В качестве объектов сложного состава, содержащих антиоксиданты с различной растворимостью в водных и органических растворителях, выбрали настойки лекарственного растительного сырья, приобретенные в аптечной сети, и экстракт цветков каркаде, приготовленный по методике, описанной в “Экспериментальной части”. В качестве метода сравнения выбрали известный спектрофотометрический метод определения АОЕ с использованием комплекса $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{3+}$. Антиоксидантную емкость определяли оптическим и хроноамперометрическим методами в одинаковых условиях: 0.01 М раствор LiClO_4 , ацетонитрил–ацетатный буферный раствор с pH 3.6 (9 : 1). Кроме того, АОЕ этих же образцов определяли потенциометрическим методом с использованием системы

$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ в фосфатном буферном растворе с pH 7.4. Полученные значения АОЕ представлены в табл. 4. Высокая степень корреляции результатов, полученных разными методами, ($r = 0.9901$, $n = 7$, $r_{\text{крит}} = 0.7545$) подтверждает возможность определения АОЕ многокомпонентных объектов, содержащих вещества с различной гидрофильностью хроноамперометрическим способом с использованием комплекса $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{3+}$ в качестве модели окислителя. Значения критериев Фишера и Стьюдента для хроноамперометрического и спектрофотометрического детектирования не превышают критических значений.

Стоит отметить, что выбранные настойки лекарственного растительного сырья имеют окраску от желтого до коричневого цвета. Для таких объектов собственная окраска не влияет на величину оптической плотности $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{2+}$ при 535 нм. В случае объектов, окрашенных в красный цвет, к которым относятся большое количество растительных экстрактов, про-

Таблица 3. Значения антиоксидантной емкости модельных растворов антиоксидантов, полученные хроноамперометрическим методом с использованием комплекса $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{3+}$ в качестве модели окислителя в среде ацетонитрил–ацетатный буферный раствор с pH 3.6 (9 : 1), содержащей 0.01 моль/л LiClO_4 ($n = 5$, $P = 0.95$)

Антиоксидант	$c_{\text{АО}} \times 10^4, \text{ M}$	$\text{АОЕ}_{\text{теор. ожид.}} \times 10^4, \text{ M}$	$\text{АОЕ}_{\text{бипир}} \times 10^{-4}, \text{ M}$	s_t
α -Токоферол	2.00	4.00	3.94 ± 0.08	0.02
Кверцетин	1.00	5.00	4.51 ± 0.41	0.09
Катехин	2.00	2.00–6.00	6.18 ± 0.43	0.07
Кофейная кислота	1.00	2.00	1.89 ± 0.08	0.04

Таблица 4. Результаты определения антиоксидантной емкости этанольных настоев лекарственного растительного сырья хроноамперометрическим, спектрофотометрическим и потенциометрическим методами анализа ($n = 5$, $P = 0,95$, $F_{\text{крит}} = 6.39$, $t_{\text{крит}} = 2.78$)

Настойка/ экстракт		Хроноамперометрия ([Fe(Py) ₃] ³⁺ , 0.01 моль/л LiClO ₄ , ацетонитрил- ацетатный буферный раствор с pH 3.6 (9 : 1))		Спектрофотометрия ([Fe(Py) ₃] ³⁺ , 0.01 моль/л LiClO ₄ , ацетонитрил- ацетатный буферный раствор с pH 3.6 (9 : 1))		F	t	Потенциометрия (K ₃ [Fe(CN) ₆], фосфатный буферный раствор с pH 7.4)	
объект	содержание этанолa, %	АОЕ _{хал} × 10 ² , М-экв	S _r	АОЕ _{опт} × 10 ² , М-экв	S _r			АОЕ _{потенц} × 10 ² , М-экв	S _r
Боярышника плоды	70	0.37 ± 0.01	0.01	0.30 ± 0.01	0.02	1.36	0.03	0.23 ± 0.01	0.01
Пустырника травa	70	2.53 ± 0.03	0.01	2.67 ± 0.09	0.04	2.12	0.96	1.65 ± 0.02	0.01
Ноготков цветки	70	2.39 ± 0.14	0.06	2.28 ± 0.06	0.03	3.13	0.05	1.08 ± 0.03	0.03
Лимонника семена	95	1.04 ± 0.07	0.07	1.23 ± 0.01	0.01	2.04	0.17	1.72 ± 0.02	0.01
Полыни травa	70	5.19 ± 0.16	0.03	4.64 ± 0.09	0.02	2.20	0.35	4.80 ± 0.09	0.02
Валерьяны корни	70	1.64 ± 0.16	0.10	1.69 ± 0.07	0.04	1.45	0.04	1.16 ± 0.08	0.07
Мяты перечной листья	95	2.67 ± 0.13	0.05	2.46 ± 0.06	0.03	2.52	0.05	2.27 ± 0.02	0.01
Каркаде цветки	95	6.27 ± 0.06	0.01	-	-	-	-	3.58 ± 0.25	0.07

мышленные напитки, биологические объекты и др., собственная окраска может внести существенный вклад в величину оптической плотности при 535 нм.

В качестве примера выбрали этанольный экстракт цветков каркаде (*Hibiscus sabdariffa*) ярко-розового цвета, близкий по окраске к раствору [Fe(Py)₃]²⁺ (рис. 5). На рис. 6 приведены спектры поглощения указанных растворов. Определение АОЕ настоя каркаде оптическим методом невозможно, поскольку в данном случае области поглощения анализируемого раствора и [Fe(Py)₃]²⁺ практически совпадают. Антиоксидантная емкость настоя каркаде, полученная хроноамперометрическим способом, составила АОЕ_{хал} = (6.27 ± 0.06) × 10⁻² М-экв, что согласуется с данными [19] о достаточно высоком содержании антиоксидантов в данном образце.

Определили АОЕ выбранных настоек и экстракта потенциометрическим методом с использованием системы K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] (табл. 4). Несмотря на достаточно высокую корреляцию результатов электрохимических методов анализа ($r = 0.8412$, $n = 8$, $r_{\text{крит}} = 0.7067$), значения, полученные потен-

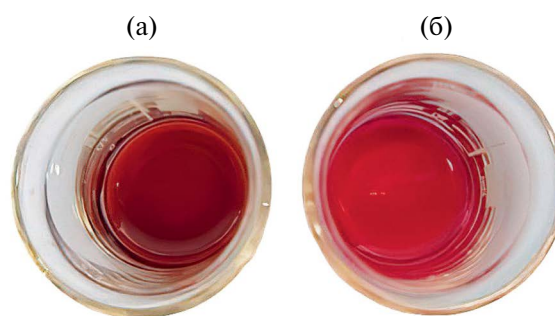


Рис. 5. Окраска (а) 0.1 мМ раствора [Fe(Py)₃]²⁺ и (б) этанольного настоя каркаде (*Hibiscus sabdariffa*).

циометрическим методом, значительно ниже для большинства исследованных настоев, что может быть связано с ограниченной растворимостью полифенольных соединений, содержащихся в выбранных объектах в высоких концентрациях, в водной среде. В этом случае анализ многокомпонентных объектов, содержащих вещества различной гидрофильности, в водных средах дает неполную информацию об их антиоксидантных свойствах.

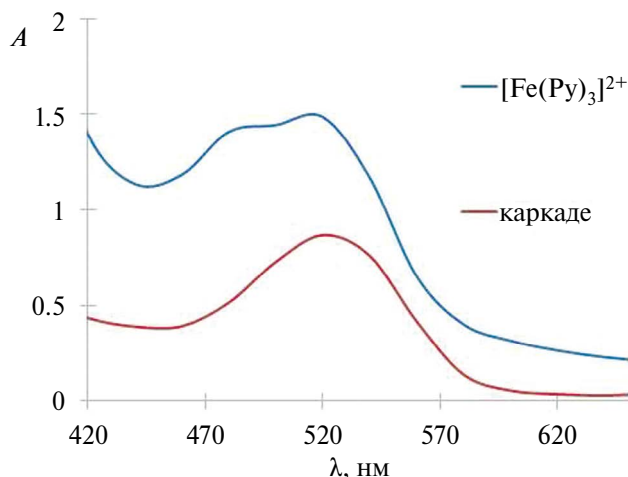


Рис. 6. Спектры поглощения 0.1 мМ раствора комплекса $[\text{Fe}(\text{Py})_3]^{2+}$ и этанольного настоя каркаде (*Hibiscus sabdariffa*).

* * *

Таким образом, предложен подход к определению антиоксидантов с использованием комплекса железа(III) с бипиридином в качестве модели окислителя и хроноамперометрической регистрацией тока окисления комплекса железа(II) с бипиридином, образующегося при взаимодействии с антиоксидантами. Существенным преимуществом предложенного подхода является использование комплексов железа с бипиридином как универсальной модели окислителя, растворимого как в воде, так и в ряде органических растворителей, что позволяет исследовать липофильные антиоксиданты и объекты, содержащие гидрофильные и липофильные антиоксиданты при совместном присутствии, что актуально при анализе объектов сложного состава. На примере экстрактов растительного сырья как одного из основных экзогенных источников АО различной гидрофильности (α -токоферола, аскорбиновой кислоты и полифенольных соединений) показана возможность определения суммарной антиоксидантной емкости с использованием комплекса железа(III) с бипиридином. При этом хроноамперометрический метод, в отличие от метода спектрофотометрии, не обладает ограничениями при анализе объектов с собственной окраской. Предложенный подход является информативным, простым и доступным, позволяет избежать использования поверхностно-активных веществ при анализе объектов, содержащих соединения с различной растворимостью, и может быть реализован в портативном варианте, в том числе для экспресс-контроля ценности растительного сырья с позиции содержания антиоксидантов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 20-13-00142 (<https://rscf.ru/project/20-13-00142/>).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. 5th Ed. Oxford, UK: Oxford University Press, 2015. P. 961.
- Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2017. С. 284.
- Apak R., Ozyurek M., Guklu K., Capanoglu E. Antioxidant activity/capacity measurement. I. Classification, physico-chemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays // J. Agric. Food. Chem. 2016. V. 64. P. 997.
- Apak R., Ozyurek M., Guklu K., Capanoglu E. Antioxidant activity/capacity measurement. 2. Hydrogen atom transfer (HAT)-Based, mixed-mode (electron transfer (ET)/HAT), and lipid peroxidation assay // J. Agric. Food Chem. 2016. V. 64. P. 1028.
- Ilyasov I.R., Beloborodov V.L., Selivanova I.A., Terekhov R.P. ABTS/PP Decolorization assay of antioxidant capacity reaction pathways // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 1131.
- Зиятдинова Г.К., Зиганшина Э.Р., Будников Г.К. Использование поверхностно-активных веществ в вольтамперометрическом анализе // Журн. аналит. химии. 2012. Т. 67. С. 968. (Ziyatdinova G.K., Ziganshina E.R., Budnikov H.C. Application of surfactants in voltammetric analysis // J. Anal. Chem. 2012. V. 67. P. 869.)
- Sharma Sh., Kori Sh., Parmar A. Surfactant mediated extraction of total phenolic contents (TPC) and antioxidants from fruits juices // Food Chem. 2015. V. 185. P. 284.
- La J.W., Kim M.J., Lee J.H. Evaluation of solvent effects on the DPPH reactivity for determining the antioxidant activity in oil matrix // Food Sci. Biotechnol. 2021. V. 30. P. 367.
- Зиятдинова Г.К., Жупанова А.С., Будников Г.К. Электрохимические сенсоры для одновременного определения фенольных антиоксидантов // Журн. аналит. химии. 2022. Т. 77. С. 129. (Ziyatdinova G.K., Zhupanova A.S., Budnikov H.C. Electrochemical sensors for the simultaneous detection of phenolic antioxidants // J. Anal. Chem. 2022. V. 77. P. 155.)
- Ziyatdinova G., Kalmykova A., Kupriyanova O. Constant-current coulometry with electrogenerated

- titrants as a novel tool for the essential oils screening using total antioxidant parameters // *Antioxidants*. 2022. V. 11. Article 1749.
11. Ivanova A.V., Gerasimova E.L., Brainina Kh.Z. Potentiometric study of antioxidant activity: Development and prospects // *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2015. V. 45. P. 311.
 12. Иванова А.В., Герасимова Е.Л., Кравец И.А., Матерн А.И. Потенциометрическое определение водорастворимых антиоксидантов с использованием комплексов металлов // *Журн. аналит. химии*. 2015. Т. 70. № 2. С. 156. (Ivanova A.V., Gerasimova E.L., Kravets I.A., Matern A.I. Potentiometric determination of water-soluble antioxidants using metal complexes // *J. Anal. Chem.* 2015. V. 70. P. 173.)
 13. Ivanova A.V., Gerasimova E.L., Gazizullina E.R. An integrated approach to the investigation of antioxidant properties by potentiometry // *Anal. Chim. Acta*. 2020. V. 1111. P. 83.
 14. Брайнина Х.З., Варзакова Д.П., Герасимова Е.Л. Хроноамперометрический метод определения интегральной антиоксидантной активности // *Журн. аналит. химии*. 2012. Т. 67. С. 409. (Brainina Kh.Z., Varzakova D.P., Gerasimova E.L. A chronoamperometric method for determining total antioxidant activity // *J. Anal. Chem.* 2012. V. 67. P. 364.)
 15. Varzakova D.P., Brainina Kh.Z., Kazakov Y.E., Vidrevich M.B. Noninvasive electrochemical antioxidant activity estimation: Saliva analysis // *Biointerface Res. Appl. Chem.* 2018. V. 8. P. 3383.
 16. Naji K.M., Thamer F.H., Numan A.A., Dauqan E.M., Alshaibi Ya.M., D'souza M.R. Ferric-bipyridine assay: A novel spectrophotometric method for measurement of antioxidant capacity // *Heliyon*. 2020. V. 6. Article e03162.
 17. Santana W.E.L., Nunez C.V., Moya H.D. Antioxidant activity and polyphenol content of some Brazilian medicinal plants exploiting the formation of the Fe(II)/2,2'-bipyridine complexes // *Nat. Prod. Commun.* 2015. V. 10. P. 1821.
 18. Экспериандова Л.П., Беликов К.Н., Химченко С.В., Бланк Т.А. Еще раз о пределах обнаружения и определения // *Журн. аналит. химии*. 2010. Т. 65. С. 229 (Eksperiandova L.P., Belikov K.N., Khimchenko S.V., Blank T.A. Once again about determination and detection limits // *J. Anal. Chem.* 2010. V. 65. P. 223.)
 19. Subhaswaraj P., Sowmya M., Bhavana V., Dyavaiah M., Siddhardha B. Determination of antioxidant activity of Hibiscus sabdariffa and Croton caudatus in Saccharomyces cerevisiae model system // *J. Food Sci. Technol.* 2017. V. 54. P. 2728.

ORIGINAL ARTICLES

CHRONOAMPEROMETRIC DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY USING IRON COMPLEX WITH 2,2'-BIPYRIDINE

E. R. Salimgareeva^a, E. L. Gerasimova^{a, *}, A. V. Karmanova^a, K. K. Salikova^a,
S. Y. Saraeva^a, A. V. Ivanova^a

^aUral Federal University named after the First President of Russia B.N. Yeltsin,
Chemical Technology Institute, 620002 Ekaterinburg, Russia
*e-mail: e.l.gerasimova@urfu.ru

Received on October 31, 2023. Revised November 23, 2023. Accepted November 26, 2023

Abstract. The proposed approach to the determination of antioxidants with different hydrophilicity is based on the use of iron(III) complex with bipyridine as an oxidant model and chronoamperometric registration of the analytical signal. The oxidant was chosen due to its solubility in aqueous, organic and aqueous-organic media. The following conditions for registration of chronoamperograms were chosen: background composition (acetonitrile-acetate buffer solution with pH 3.6 (9 : 1)), background electrolyte (LiClO₄), potential ($E = 1.25$ V), current registration time (80 s). Antioxidants soluble in organic and aqueous-organic media were studied: α -tocopherol, quercetin, catechin, caffeic acid. The ranges of determined concentrations are $(0.5-4) \times 10^{-4}$ M. The antioxidant capacity (AOE) of ethanolic extracts of medicinal plant raw materials was determined. A high correlation of AOE values obtained by chronoamperometric and spectrophotometric methods is observed, but only for the objects whose intrinsic coloration does not contribute to the absorption value of Fe(II)-bipyridine complex. Application of the proposed approach and the potentiometric method using the system K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] showed that the values obtained by the potentiometric method are significantly lower for most of the investigated infusions. Thus, when analyzing multicomponent objects containing substances with different hydrophilicity, it is advisable to use oxidizing agents with different solubility, such as Fe(III)-bipyridine complex.

Keywords: antioxidant capacity, chronoamperometry, extracts of medicinal plant raw materials.