

Н. И. Белая, А. В. Белый, К. В. Глушенко

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНЫХ КОНСТАНТ СКОРОСТЕЙ РЕАКЦИИ ПЕРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ ДИГИДРОХЛОРИДА 2,2'-АЗОБИС-(2-АМИДИНОПРОПАНА) С ДИОКСИБЕНЗОЛАМИ И ИХ ПРОИЗВОДНЫМИ

Донецкий национальный университет, Украина, Донецк.

Усовершенствована йодометрическая методика определения антирадикальной активности (АРА) диоксибензолов в реакции с пероксирадикалами 2,2'-азобис-(2-амидинопропана) (ААП) ( $\text{rOO}^\bullet$ ) в условиях, близких к биологическим системам. Предложен способ расчета относительных констант скоростей реакции фенолов с  $\text{rOO}^\bullet$  по кинетике распада ингибитора, введенного в малой концентрации. Установлено, что наибольшей АРА обладают резорцин, орцин и гидрохинон, которые способны диссоциировать с образованием высокореакционноспособных моно- и бианионных форм фенолят-ионов. Предложен метод расчета относительных констант скоростей изученной реакции, основанный на кинетической модели ААП — пероксирадикал ААП — фенол.

**Ключевые слова:** диоксибензолы; антиоксиданты; пероксильные радикалы гидрохлорида 2,2'-азобис-(2-амидинопропана); относительные константы скорости реакции.

Разработка принципов подбора антиоксидантов как веществ, предотвращающих зарождение и развитие стадий радикальных процессов окисления органических и неорганических субстратов, и планирование синтеза новых антиоксидантов являются одними из приоритетных задач химической кинетики, органической, фармацевтической и полимерной химии [1, 2]. Их решение проводится по 2 направлениям. С одной стороны, постоянно расширяется ассортимент антиоксидантов для конкретного применения, а с другой — проводится поиск модельных реакций для изучения антиокислительных свойств веществ и создания алгоритма подбора “идеального” антиоксиданта.

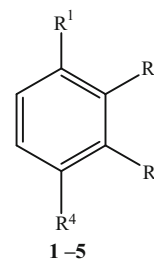
В условиях постоянного роста антиоксидантной продукции на рынке все более актуальным становится именно поиск модельных систем, которые позволили бы надежно и быстро оценить реакционную способность уже имеющихся антиоксидантов. Среди них востребованы реакции *in vitro*, в которых с постоянной скоростью генерируются кислородцентрированные радикалы, как наиболее близкие к активным формам кислорода.

Целью данной работы является усовершенствование методики оценки антирадикальной активности диоксибензолов и их производных (PhOH) в реакции с водорастворимыми пероксирадикалами дигидрохлорида 2,2'-азобис-(2-амидинопропана) (ААП) при  $\text{pH} = 7,0$  и  $T = (323 \pm 2) \text{ K}$ .

### Экспериментальная часть

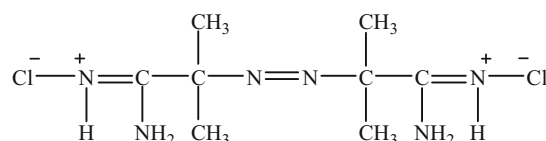
Незамещенные ди- и триоксибензолы относятся к группе простых природных фенолов, обладают выраженными антиоксидантными и антибактериальными свойствами, широко применяются для синтеза разных фармакологических групп лекарственных средств, обладающих широким спектром биологического действия. Резорцин проявляет выраженное противомикробное действие, коагулирует белки, вызывает гибель ве-

гетативных форм микроорганизмов. Гидрохинон повышает активность окислительно-восстановительных реакций, оказывает выраженное влияние на метаболизм, поглощение кислорода тканями, содержание в крови глюкозы, калия, глутатиона, уменьшает диабетический кетоацидоз. Пирокатехин используется при получении некоторых разновидностей катехоламина с нейротрансмиттерными и гормональными свойствами, таких как адреналин, эпинефрин, норэпинефрин, дофамин. В данной работе в качестве объектов исследования использовали диоксибензолы и их производные, очищенные согласно методике [3].

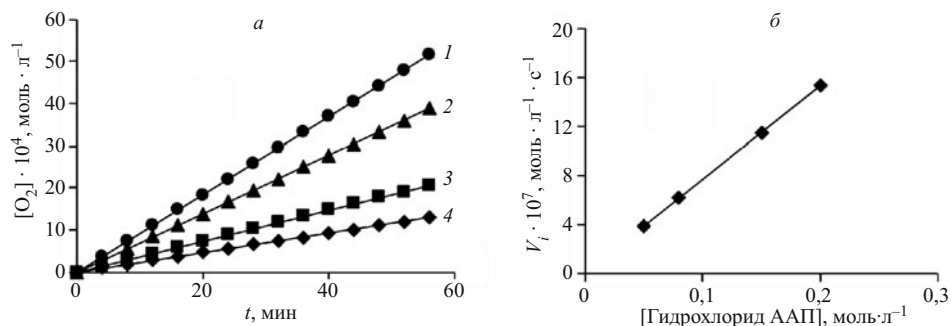


- 1:  $\text{R}^1 = \text{R}^4 = \text{H}$ ,  $\text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{OH}$  (пирокатехин),
- 2:  $\text{R}^1 = \text{R}^3 = \text{H}$ ,  $\text{R}^2 = \text{R}^4 = \text{OH}$  (резорцин),
- 3:  $\text{R}^1 = \text{CH}_3$ ,  $\text{R}^3 = \text{H}$ ,  $\text{R}^2 = \text{R}^4 = \text{OH}$  (орцин),
- 4:  $\text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{H}$ ,  $\text{R}^1 = \text{R}^4 = \text{OH}$  (гидрохинон),
- 5:  $\text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{H}$ ,  $\text{R}^1 = \text{OH}$ ,  $\text{R}^4 = \text{OCH}_3$  (мометилловый эфир гидрохинона).

Генератор свободных радикалов — дигидрохлорид АПП или по номенклатуре ИЮПАК дихлорид 2,2'-дiazен-1,2-диилбис(1-имино-2-метилпропан-1-аминиума) фирмы “Sigma-Aldrich” применяли без дополнительной очистки:



Константу скорости реакции генерирования ( $k_i$ ) пероксирадикалов ААП ( $\text{rOO}^\bullet$ ) измеряли в фосфатном

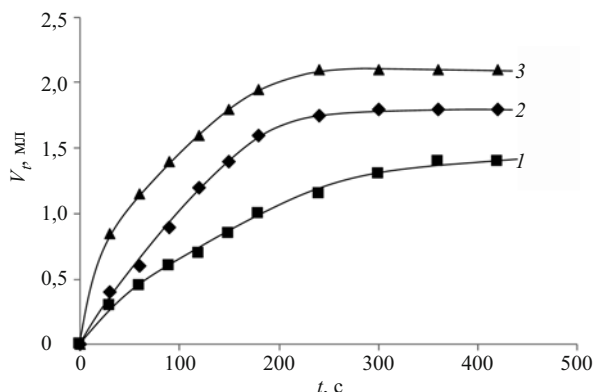
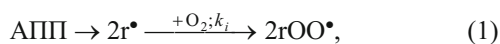


**Рис. 1.** а) Кинетика поглощения кислорода в реакции образования  $гOO^*$  в фосфатном буфере при  $pH = 7,0$ ,  $T = (323 \pm 2)$  К и концентрации [ААП] (моль  $\cdot$  л $^{-1}$ ): 1 – 0,2; 2 – 0,15; 3 – 0,08; 4 – 0,05. По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — концентрация кислорода (моль  $\cdot$  л $^{-1}$ ); б) зависимость скорости образования пероксирадикалов  $V_i$  от [ААП]. По оси абсцисс — концентрация [ААП] (моль  $\cdot$  л $^{-1}$ ); по оси ординат — скорость образования пероксирадикалов  $V_i$  (моль  $\cdot$  л $^{-1} \cdot$  с $^{-1}$ ).

буфере при  $pH = 7,0$  и  $T = (323 \pm 2)$  К по количеству поглощенного кислорода методом газовольмометрии [4]. Кинетику реакции контролировали методом отбора проб с последующим йодометрическим титрованием [5]. Генератор свободных радикалов вводили при концентрации  $10^{-2}$  моль  $\cdot$  л $^{-1}$ , диапазон рабочих концентраций фенолов составлял  $10^{-4} - 10^{-5}$  моль  $\cdot$  л $^{-1}$ . Значения  $pK_a$  диоксибензолов и распределение их ионизированных форм в зависимости от  $pH$  среды рассчитывали методом QSPR (Quantitative Structure — Property Relationship, количественная взаимосвязь структура — свойство) в программном пакете Marvin 5.11.3 (разработчик ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>)). Линейный однофакторный регрессионный анализ полученных данных проводили в программном пакете Statistica Demo 6.0 (разработчик StatSoft (<http://www.statsoft.ru>)).

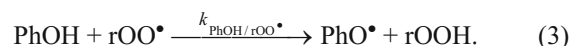
### Результаты и их обсуждение

Известно [6], что ААП в водном растворе распадается по реакции:



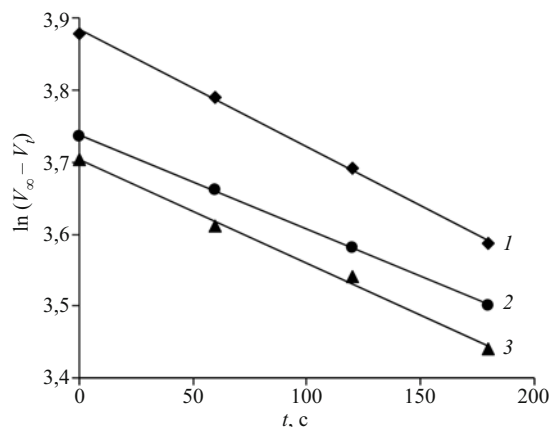
**Рис. 2.** Кинетика расходования  $Na_2S_2O_3$ , израсходованного на титрование  $гOOH$ , образующегося по реакции  $гOO^*$  с пирокатехином, взятым в концентрации (моль  $\cdot$  л $^{-1}$ ): 1 –  $8 \cdot 10^{-5}$ ; 2 –  $1,6 \cdot 10^{-4}$ ; 3 –  $3,2 \cdot 10^{-4}$ .  $T = (323 \pm 2)$  К,  $pH = 7,0$ , гидрохлорид ААП = 0,05 моль  $\cdot$  л $^{-1}$ . По оси абсцисс — время (с); по оси ординат — объем титранта (мл).

При добавлении в систему фенольных антиоксидантов как акцепторов свободных радикалов происходит дезактивация  $гOO^*$  с образованием перекисного соединения  $гOOH$ :



Определение антирадикальной активности (АРА) фенолов проводят, как правило, классическим методом йодометрии непосредственным титрованием всей реакционной смеси [5]. Такой способ имеет ряд недостатков: проведение реакции возможно только в кислой среде, на кинетику реакции могут оказывать влияние посторонние компоненты реакционной смеси, отсутствие четкого математического аппарата для расчета кинетических уравнений в многокомпонентной системе не позволяет определить количественные параметры реакции, такие как скорость и константа скорости.

В данной работе предложен модифицированный способ определения относительных констант скорости реакции пероксирадикалов ААП с фенольными соединениями. Усовершенствование заключается в следующем: а) реакция  $гOO^*$  с PhOH осуществляется в отдельном реакционном сосуде в фосфатном буфере



**Рис. 3.** Анаморфозы начальных участков кинетических кривых расходования  $Na_2S_2O_3$ , израсходованного на титрование  $гOOH$ , образующегося по реакции  $гOO^*$  с диоксибензолами, взятыми в концентрации  $1,6 \cdot 10^{-4}$  моль  $\cdot$  л $^{-1}$ : 1 — пирокатехин; 2 — резорцин; 3 — гидрохинон.  $T = (323 \pm 2)$  К,  $pH = 7,0$ , ААП = 0,05 моль  $\cdot$  л $^{-1}$ . По оси абсцисс — время, с; по оси ординат — разность объемов титранта (см. текст).

при  $\text{pH} = 7,0$ ,  $T = (323 \pm 2)$  К и постоянном барботировании кислорода, что устраняет влияние побочных реакций; б) кинетика процесса исследуется отбором проб с последующей остановкой реакции на ледяной бане и дальнейшим йодометрическим титрованием; в) относительные константы скорости реакции (3) ( $k_{\text{PhOH}/\text{rOO}\cdot} / \sqrt{k_{\text{rOO}\cdot}/\text{rOO}\cdot}$ ) рассчитываются по кинетике расходования ингибитора, введенного в малой концентрации, способом, представленным в работе [7].

Если фенол введен в реакцию в настолько малой концентрации, что  $k_{\text{PhOH}/\text{rOO}\cdot} [\text{PhOH}] \ll k_{\text{rOO}\cdot}/\text{rOO}\cdot [\text{rOO}\cdot]^2$ , то количество пероксирадикалов  $\text{rOO}\cdot$  в системе уменьшается незначительно по сравнению с состоянием в присутствии фенола. Тогда концентрацию  $\text{rOO}\cdot$  можно найти из условия стационарности, когда скорость образования радикалов равна скорости их расходования [7]:

$$v_i = k_{\text{rOO}\cdot}/\text{rOO}\cdot [\text{rOO}\cdot]^2, \quad (4)$$

$$[\text{rOO}\cdot] = \sqrt{\frac{v_i}{k_{\text{rOO}\cdot}/\text{rOO}\cdot}}. \quad (5)$$

Скорость расходования фенольного соединения с учетом (5) равна:

$$-\frac{d[\text{PhOH}]}{dt} = k_{\text{PhOH}/\text{rOO}\cdot} [\text{PhOH}] [\text{rOO}\cdot], \quad (6)$$

$$-\frac{d[\text{PhOH}]}{dt} = \frac{k_{\text{PhOH}/\text{rOO}\cdot}}{\sqrt{k_{\text{rOO}\cdot}/\text{rOO}\cdot}} \sqrt{v_i} [\text{PhOH}], \quad (7)$$

$$[\text{PhOH}] = [\text{PhOH}]_0 e^{-kt}, \quad (8)$$

$$\ln \frac{[\text{PhOH}]_0}{[\text{PhOH}]} = kt, \quad (9)$$

где  $[\text{PhOH}]_0$  — исходная концентрация фенола;  $[\text{PhOH}] = [\text{PhOH}]_0 - [\text{PhOH}]_t$  — концентрация фенола, оставшегося к моменту времени  $t$ ;  $[\text{PhOH}]_t$  — концентрация фенола, прореагировавшего к моменту времени  $t$ .

В этом случае антиоксидант будет расходоваться по реакции псевдопервого порядка, что значительно упрощает кинетику исследуемой реакции. Величина  $k$  является эффективной константой скорости реакции:

$$k = \frac{k_{\text{PhOH}/\text{rOO}\cdot}}{\sqrt{k_{\text{rOO}\cdot}/\text{rOO}\cdot}} \sqrt{v_i}. \quad (10)$$

Измерив экспериментально константу  $k$  и скорость образования пероксирадикалов  $V_i$ , можно рассчитать относительную константу скорости  $k_{\text{PhOH}/\text{rOO}\cdot} / \sqrt{k_{\text{rOO}\cdot}/\text{rOO}\cdot}$  реакции (3):

$$\frac{k_{\text{PhOH}/\text{rOO}\cdot}}{\sqrt{k_{\text{rOO}\cdot}/\text{rOO}\cdot}} = \frac{k}{\sqrt{V_i}} \quad (11)$$

Величины  $V_i$  и  $k_i$  реакции (1) определяли методом газовойolumетрии по количеству поглощенного кислорода:

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{O}_2]}{dt} &= V_i = 2ek_d [\text{гидрохлорид ААП}] = \\ &= k_i [\text{гидрохлорид ААП}], \end{aligned} \quad (12)$$

где  $e$  — выход радикала из клетки;  $k_d$  — константа скорости распада генератора свободных радикалов гидрохлорида ААП;  $k_i$  — константа скорости реакции образования (иницирования) пероксирадикалов гидрохлорида ААП.

По тангенсу угла наклона кинетических кривых поглощения кислорода (рис. 1, а) определяли скорость образования  $\text{rOO}\cdot$  в фосфатном буфере при  $\text{pH} = 7,0$  и  $T = (323 \pm 2)$  К, а по зависимости  $V_i$  — [гидрохлорид ААП] (рис. 1, б) согласно уравнению (12) рассчитывали  $k_i = 7,67 \cdot 10^{-6}$  л · моль<sup>-1</sup> · с<sup>-1</sup>.

Кинетику реакции (3) контролировали по количеству накопившейся перекиси  $\text{rOON}$  йодометрическим методом, считая, что:

$$[\text{PhOH}]_t = \text{const } V_t, \quad (13)$$

$$[\text{PhOH}]_0 = \text{const } V_\infty, \quad (14)$$

$$[\text{PhOH}] = \text{const}(V_\infty - V_t), \quad (15)$$

где  $V_t$ ,  $V_\infty$  — объем  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , израсходованный на титрование йода, образующегося в реакции с  $\text{rOON}$  в момент времени  $t$  и в конце реакции, когда объем  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  становится постоянным.

Подставляя уравнения (13)–(15) в уравнение (9) получаем:

$$\ln \frac{[V_\infty]}{[V_\infty - V_t]} = kt. \quad (16)$$

Тогда эффективную константу  $k$  находим графически как тангенс угла наклона линейной зависимости (16).

Показано (рис. 2), что в присутствии  $\text{PhOH}$  наблюдается резкое увеличение объема тиосульфата натрия  $V_t$ , израсходованного на титрование йода, образующегося в реакции с  $\text{rOON}$ .

Причем, чем больше концентрация антиоксиданта, тем больше  $V_t$ . Полное расходование  $\text{PhOH}$  в реакции с  $\text{rOO}\cdot$  соответствует предельному значению объема тиосульфата натрия  $V_\infty$ . Полученные в начальный момент времени данные спрямились (рис. 3) в координатах кинетического уравнения первого порядка (15) и по тангенсу угла наклона определяли значение эффективной константы  $k$ . Зная  $v_i$ , по уравнению (11) рассчитывали величину относительной константы как параметра АРА представленных фенольных соединений.

Таблица 1  
Значения эффективной и относительной констант скорости реакции диоксибензолов и их производных с  $\text{rOO}\cdot$  в водном растворе при  $\text{pH} = 7,0$  и  $T = (323 \pm 2)$  К

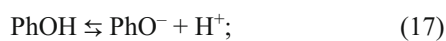
Соединение	Эффективная константа $k$ , с <sup>-1</sup>	Относительная константа $\frac{k_{\text{PhOH}/\text{rOO}\cdot}}{\sqrt{k_{\text{rOO}\cdot}/\text{rOO}\cdot}}$
Пирокатехин	$(5,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$	$9,05 \pm 0,32$
Резорцин	$(1,49 \pm 0,05) \cdot 10^{-2}$	$24,07 \pm 0,85$
Орцин	$(9,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-3}$	$14,7 \pm 0,5$
Гидрохинон	$(1,02 \pm 0,05) \cdot 10^{-2}$	$16,5 \pm 0,5$
Монометилловый эфир гидрохинона	$(1,6 \pm 0,05) \cdot 10^{-3}$	$2,58 \pm 0,08$

Таблица 2  
**Распределение ионных форм диоксибензолов и их производных в водной среде при pH = 7,0 и T = (323 ± 2) К, рассчитанное методом QSPR в программном пакете Marvin 5.11.3\***

Соединение	pK <sub>a(1)</sub>	pK <sub>a(2)</sub>	W <sub>PhOH</sub> , %	W <sub>PhO<sup>-</sup></sub> , %	W <sub>PhO<sup>2-</sup></sub> · 10 <sup>-5</sup> , %
Пирокатехин	8,95	12,14	99,91	0,09	–
Резорцин	8,56	10,46	98,80	1,20	12,73
Орцин	8,88	10,69	99,46	0,30	3,24
Гидрохинон	9,26	10,99	99,79	0,21	0,59
Монометилловый эфир					
гидрохинона	9,50	–	99,89	0,11	–

\* W<sub>PhOH</sub>, W<sub>PhO<sup>-</sup></sub>, W<sub>PhO<sup>2-</sup></sub> — процентное содержание молекулярной, моноионной и бионной форм изученных PhOH.

Из полученных данных видно (табл. 1), что наибольшую АРА имеют резорцин, орцин и гидрохинон, которые способны к большей диссоциации в водной среде по сравнению с другими изученными диоксибензолами. Рассчитанное методом QSPR распределение ионных форм PhOH при pH = 7,0 и T = (323 ± 2) К показало (табл. 2), что, действительно, представленные фенолы диссоциируют при заданных условиях, как по первой (17), так и по второй ступени (18) с образованием реакционноспособных бианионных форм PhO<sup>2-</sup>, активность которых по отношению к rOO• много выше, как моноаниона PhO<sup>-</sup>, так и молекулярной формы PhOH.



Видно (табл. 2), что резорцин, орцин и пирокатехин при заданной pH = 7,0 диссоциируют по второй ступени и, как следствие, проявляют наиболее выраженную АРА в реакции с пероксирадикалами гидрохлорида ААП.

По-видимому, присутствие в системе даже незначительного количества активных бианионов PhO<sup>2-</sup> сильно влияет на кинетику исследуемой реакции, что подтверждается рядом литературных данных [8, 9].

## DETERMINING RELATIVE RATE CONSTANTS FOR REACTIONS OF 2,2'-AZOBIS-(2-AMIDINOPROPANE) DIHYDROCHLORIDE PEROXYL RADICALS WITH DIHYDROXYBENZENES AND THEIR DERIVATIVES

N. Belaya, A. Belyi, and K. Glushchenko

Donetsk National University, 83001 Donetsk, Ukraine

We have developed an improved iodometric method for determining the radical scavenging activity of the dihydroxybenzenes in the reaction with 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) peroxy (AAP) radicals (rOO•) under conditions similar to those in biological systems. A method for calculating of the relative rate constants for the reaction of the phenols with rOO• is proposed according to the kinetics of the low concentration inhibitor spending. It is established that the highest antiradical activity is inherent in resorcinol, orcin, and hydroquinone that can dissociate with the formation of highly reactive mono- and biion forms of phenoxide ions. A method for calculation of the relative rate constants of the reaction studied is based on the model of "AAP – peroxy radical – phenol" kinetics.

**Keywords:** dihydroxybenzenes; antioxidants; 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride; peroxy radicals; relative rate constants of reaction.

Установлено, что наибольшей АРА обладают резорцин, орцин и гидрохинон, которые способны диссоциировать с образованием высокореакционноспособных моно- и бианионных форм фенолят-ионов.

Полученные представленным методом величины АРА изученных диоксибензолов сравнивали с их активностью в реакции со стабильным гидразильным радикалом в растворе диметилсульфоксид — вода, которая уменьшается в ряду [10] пирокатехин > гидрохинон > резорцин. Видно, что резорцин проявил слабые антирадикальные свойства в смешанном растворителе, в то время как, по нашим данным, он быстро дезактивирует радикалы ААП, поскольку реакция протекает в водной среде и резорцин, имея самое низкое значение pK<sub>a</sub> среди изученных веществ (табл. 2), способен быстро диссоциировать с образованием активных ионных форм. Таким образом, полученные в работе результаты позволяют более логично объяснить взаимосвязь структура — реакционная способность соединения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Е. Б. Меньщикова, В. З. Лакшин, Н. К. Зенков, *Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты*, Слово, Москва (2006).
2. W. Vermeris, R. Nicholson, *Phenolic compound biochemistry*, Springer, (2006).
3. А. Гордон, Р. Форд, *Спутник химика*, Мир, Москва (1976).
4. Н. М. Эмануэль, Г. Е. Заиков, З. К. Майзус, *Роль среды в радикально-цепных реакциях окисления органических соединений*, Наука, Москва (1973).
5. M. Sano, R. Yoshida, M. Degawa, et al., *J. Agric. Food Chem*, **51**, 2912 – 2916 (2003).
6. В. А. Шкурупий, В. Ю. Куликов, Е. Б. Меньщикова и др., *Бюл. СО РАМН*, **120**(2), 159 – 165 (2006).
7. Н. М. Эмануэль, Е. Т. Денисов, З. К. Майзус, *Ценные реакции окисления углеводородов в жидкой фазе*, Наука, Москва (1965).
8. R. Amorati, G. Franco Pedulli, L. Cabrini, et al., *J. Agric. Food Chem*, **54**, 2932 – 2937 (2006).
9. W. -L. Chen, W.-S. Li, P.-J. Fu, A. Yeh, *Int. J. Chem. Kinet.*, **43**, 147 – 153 (2011).
10. Н. И. Белая, А. В. Белый, А. И. Пашенко, *Ж. общей химии*, **82**(5), 772 – 781 (2012).

Поступила 06.07.15