

## Новий метод оцінювання активності антиоксидантів (спосіб і субстрат)

Л.І. Коваль, В.І. Дзюба, В.І. Пехньо

Інститут загальної та неорганічної хімії ім. В.І. Вернадського НАН України,  
Україна, 03680 Київ, просп. Палладіна, 32/34; тел.: (044) 424-34-61,  
E-mail: l\_koval@ionc.kiev.ua

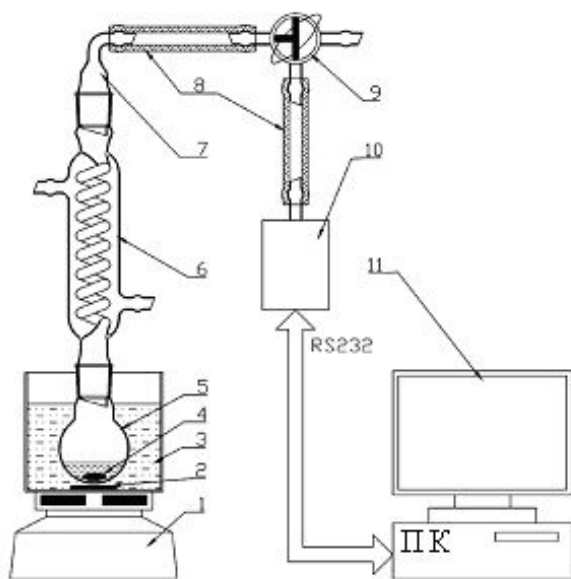
Розроблено новий малозатратний метод оцінювання антиоксидантної активності, що полягає у визначенні індукційного періоду окиснення органічного субстрату в герметичній системі в умовах пришвидшеного окиснення за підвищеної температури. Пристрій для реалізації методу складається зі стандартних виробів серійного виробництва, автоматизує процес вимірювань, забезпечує комп'ютеризоване оброблення отриманих даних за допомогою стандартного програмного забезпечення з високим ступенем збіжності результатів. Як недорогий і доступний субстрат запропоновано дворазово дистильовані метилові естери жирних кислот соняшникової олії, що не містять природних антиоксидантів. Надійна ізоляція від кисню та вологи повітря на стадії дистиляції, зберігання й відбирання доз субстрату гарантує його придатність, що показано на прикладі дії *трет*-бутилкатехолу і діетилдитіокарбамату цинку.

Однією з важливих проблем, пов'язаних з якістю продуктів і матеріалів на основі органічних речовин (палив, олив, мастил, технічних і харчових жирів, полімерів, продуктів хімічної, парфумерної промисловості, медикаментів тощо), є підвищення їхньої стійкості до аутоокиснення з метою забезпечення відповідних властивостей та експлуатаційних характеристик під час виготовлення, зберігання та застосування. На практиці для уповільнення окиснення застосовують інгібітори різної хімічної будови (антиоксиданти), які діють за різними механізмами, зокрема каталізують обрив ланцюгів у реакціях з алкільними ( $R\cdot$ ) і пероксидними ( $ROO\cdot$ ) радикалами або руйнують гідропероксиди без утворення вільних радикалів. Інгібітори, які мають у своєму складі кілька функціональних груп, можуть брати участь у різного типу реакціях гальмування окиснення, тобто виявляють комбіновану дію. Аналогічно можуть діяти і суміші інгібіторів [1]. Серед широкого кола антиоксидантів особливу увагу привертають координаційні сполуки перехідних металів, основними перевагами яких є можливість багаторазового обриву ланцюгів окиснення в одній молекулі інгібітора з відновленням останньої, висока ефективність за малих робочих концентрацій (мас. частка 0,01–0,5 %), низька витрата при інгібуванні окиснення, здатність розкласти гідропероксиди до молекулярних продуктів. Особливо доцільно зазначити, що координаційні сполуки одночасно з підвищенням протиокисної стабільності поліпшують низку важливих експлуатаційних властивостей органічних матеріалів, зокрема мастильних (наприклад, протизношувальні, мийно-диспергуючі, антифрикційні), тобто є їх поліфункційними компонентами (додатками) [2]. Науковці ведуть постійний по-

шук нових інгібіторів вільно-радикальних процесів окиснення, насамперед на основі координаційних сполук. При цьому актуальним завданням є оцінювання протиокиснювальної ефективності потенційних антиоксидантів, що потребує надійного, маловитратного та інформативного методу.

Для оцінювання протиокиснювальних властивостей розроблено широкий спектр фізичних і хімічних методів випробувань [3], серед яких стандартизовані інструментальні методи визначення індукційного періоду окиснення [4] органічного субстрату, що виконані на сучасній приладній базі з високим ступенем автоматизації й комп'ютеризації процесу вимірювання, зокрема методи Rancimat [5] і Oxidograph [6]. Стандартизовані методи, що пройшли процедури валідації, завжди мають перевагу порівняно з іншими методами, проте для спорадичних вимірювань, зокрема в наукових лабораторіях, обладнання для них занадто дороге.

Ми розробили новий малозатратний метод визначення стійкості до окиснення органічних субстратів та антиоксидантних властивостей речовин, який не поступається стандартизованим методам за критерієм збіжності результатів [7]. Суть його полягає у визначенні індукційного періоду окиснення, що є інтервалом часу від моменту, коли проба досягає заданої температури (110 °C), до моменту, коли різко починає знижуватись тиск окисника ( $O_2$ ) в герметичній системі вимірювань. На рис. 1 наведено схему пристрою для реалізації розробленого методу; він забезпечує повністю автоматизований процес вимірювань та комп'ютеризоване оброблення отриманих даних за допомогою стандартного програмного забезпечення Excel Microsoft Office. Усі складові частини пристрою -



**Рис. 1.** Схема пристрою для визначення індукційного періоду окиснення: 1 - магнітна мішалка; 2 - циліндричний магнітний стрижень; 3 - ємність з термостатуючою рідиною; 4 - еліпсоїдний магнітний стрижень; 5 - скляний реактор; 6 - спіральний зворотний холодильник; 7 - керн із вигнутим відводом; 8 - гнучка вакуумна трубка; 9 - триходовий вакуумний кран; 10 - цифровий датчик тиску; 11 - персональний комп'ютер

стандартні взаємозамінні вироби серійного виробництва, які широко використовують в лабораторній практиці. Отже, цей відносно недорогий пристрій можна зібрати з підручних засобів практично в будь-якій хімічній лабораторії.

Магнітна мішалка з підігрівом і цифровим терморегулятором забезпечує надійне термостатування теплоносія бані, а ефективне перемішування забезпечує кінетичний режим поглинання кисню як гомогенним розчином, так і пробєю у вигляді гетерогенної суміші, що вигідно відрізняє розроблений пристрій від аналогів. Холодильник надійно ізолює легкі продукти окиснення субстрату й унеможливає використання незахищеного датчика тиску (побутового барометра), що істотно знижує загальну вартість пристрою.

Крім безпосередньо методу оцінювання протиокиснювальних властивостей потенційних антиоксидантів важливо також вибирати середовище для випробувань (субстрат). В аналітичній практиці як субстрат використовують метиловий естер лінолевої кислоти або саму кислоту. Ці речовини дуже дорогі, (близько 12 євро за 1 г, або 30 євро на одне вимірювання (2,5 г)). Отже, постало завдання підібрати оптимальний за собівартістю та доступністю субстрат. На підставі опублікованих даних, що будуть обговорені нижче, як субстрат було обрано дистильовані метилові естери жирних кислот соняшникової олії (МЕЖКС) [8].

МЕЖКС отримували з рафінованої соняшникової

олії марки "Д" ТМ "Олком" (виробник ВАТ "Київський маргариновий завод") та метанолу кваліфікації ч.д.а, осушеного молекулярними ситами (0,3 нм).

МЕЖКС синтезували за методикою [10], удосконаленою на стадії очищення з метою захисту цільового продукту від вологи та кисню повітря під час зберігання й відбирання проб для дослідження.

В окремій колбі готували розчин  $\text{NaOCH}_3$ , додаючи шматочки металічного натрію (0,70 г, 0,03 моль) до сухого метанолу (81,0 мл, 2,0 моль) в атмосфері аргону. Одержаний розчин "передавлювали" аргonom крізь скляний сифон у тригорлий реактор, в який попередньо завантажували 300 мл (~ 0,3 моль) соняшникової олії. Реакційну масу в потоці аргону (для захисту від вологи повітря) інтенсивно перемішували впродовж 4 год за 60 °С. Після охолодження естерний шар відділяли, промивали підкисленою водою й кілька разів дистильованою, сушили над безводним сульфатом магнію. Осушені МЕЖКС переганяли у вакуумі при 5,3 Па із круглодонного двогорлого реактора, обладнаного термометром, насадкою Кляйзена з мікрокапіляром для подачі аргону в донну зону перегінного куба. Передгін ( $T_{\text{кип.}}$  125–133 °С), близько 1/10 загальної маси, відділяли від основної фракції дистилату ( $T_{\text{кип.}}$  134–137 °С), який повторно переганяли за 134–135 °С з відповідним відбиранням передгону й недобором кубового залишку (близько 1/10 загальної маси). Цільовий дистилат збирали у двогорлу круглодонну колбу, оснащену штуцером із вакуумним краном для зберігання й наступного відбирання доз МЕЖКС у середовищі аргону. Вихід продукту становив 150 г (56,6 %).

Жирнокислотний склад МЕЖКС визначали відповідно до EN14103 на хромато-маспектрометрі GC-МС Agilent 6890N/5973 inert із застосуванням капілярної колонки DB-FFAP (30 м / 0,25 мм / 0,25 мкм), газ-носії – гелій.

Експерименти з визначення індукційного періоду окиснення МЕЖКС проводили за температури 110 °С і різних концентрацій антиоксидантів (концентрації підбирали за даними публікацій). Зразки готували змішуванням розрахованих об'ємів МЕЖКС (доза для одного вимірювання становила 2,5 г, відбирали в потоці аргону) та метанольних розчинів антиоксидантів точної концентрації з подальшим видаленням органічного розчинника у вакуумі. Використовували окисник - кисень газоподібний ГОСТ 5583-78 (99,7 %  $\text{O}_2$ ), *трет*-бутилкатехол (вміст основної речовини не менше як 98 %) фірми "Fluka", діетилдитіокарбамат цинку (марка ч) від ТОВ "Хімлаборреактив" додатково кристалізували з толуолу. В однакових умовах виконували два послідовні вимірювання.

Як відомо, олії є тригліцеридами переважно ненасичених жирних кислот, містять природні антиоксиданти. Використання їх як субстрату пов'язано з проблемою впливу останніх на протиокиснювальні властивості досліджуваних сполук (особливо це стосується токо-

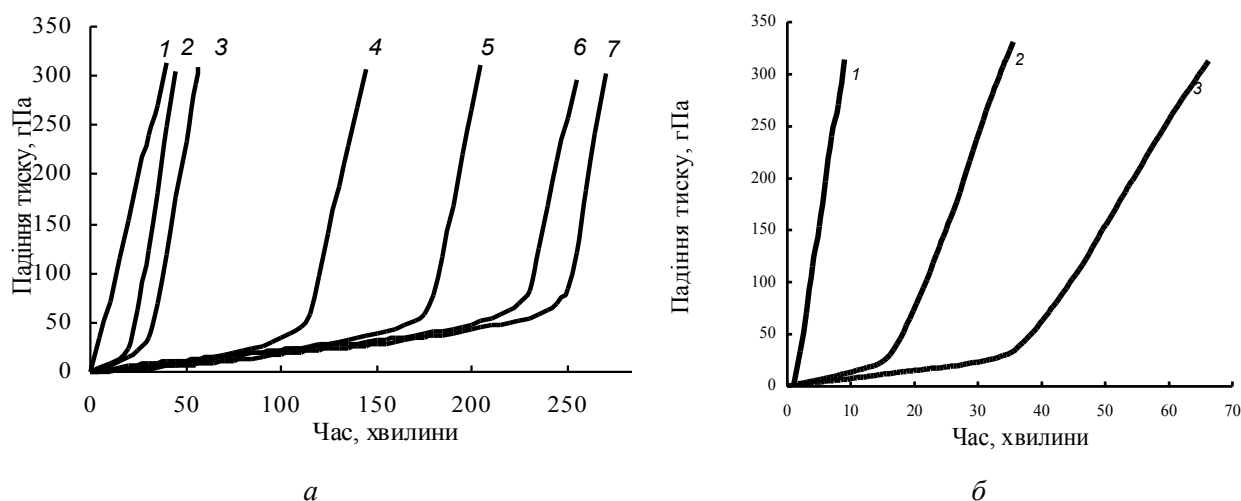


Рис. 2. Криві аутоокиснення метилових естерів жирних кислот соняшникової олії: а – в присутності *трет*-бутилкатехолу різної концентрації, моль/л (1 – 0; 2 –  $1,51 \times 10^{-4}$ ; 3 –  $3,02 \times 10^{-4}$ ; 4 –  $6,04 \times 10^{-4}$ ; 5 –  $9,06 \times 10^{-4}$ ; 6 –  $12,08 \times 10^{-4}$ ; 7 –  $15,01 \times 10^{-4}$ ); б – в присутності діетилдитіокарбамату цинку різної концентрації, моль/л (1 – 0; 2 – 0,001; 3 – 0,003)

феролу). Метанолізом олій в присутності метилату натрію як катализатора можна отримати суміш метилових естерів означених кислот – біодизель.

У праці [9] встановлено, що вакуумною дистиляцією метилових естерів пальмової олії можна повністю очистити їх від природних антиоксидантів.

За даними хроматографії, після дворазової вакуумної дистиляції основними складовими продукту метанолізу соняшникової олії є, %:  $C_{16:0}$  (метилпальмітат) – 5,92;  $C_{18:0}$  (метилстеарат) – 2,93;  $C_{18:1}$  (метилолеат) – 27,00;  $C_{18:2}$  (метиллінолеат) – 64,15, тобто він є сумішшю метилових естерів переважно олеїнової та лінолевої кислот. Природні антиоксиданти (токоферол та ін.) при дистилюванні повністю відділяються від дистиляту.

Наведено [11] результати дослідження протиокиснювальних властивостей суміші метиллінолеату та силіконової оливи як термічно- та хімічно стабільного модельного субстрату. Доведено, що розбавлення метиллінолеату силіконовою оливою до 50 % не впливає на тривалість індукційного періоду окиснення. Хроматографічні дослідження, неодноразово проведені нами для очищених МЕЖКС, підтвердили, що вміст метиллінолеату перевищує 50 %.

Отже, оскільки відносна швидкість окиснення естерів (метилового й етилового) лінолевої кислоти у 41 раз більша за швидкість окиснення естерів олеїнової кислоти [12], МЕЖКС можна використовувати для визначення активності антиоксидантів практично як чистий метиллінолеат [8]. Важливою умовою придатності МЕЖКС для аналітичних вимірювань індукційного періоду окиснення є надійна ізоляція їх від кисню та вологи повітря на стадії дистиляції, зберігання й відбирання доз. Незалежно від наших досліджень, одноразово дистильовані МЕЖКС були запропоновані в якості субстрату для оцінювання антиоксидантної ефективності фенолкарбонових кислот та їхніх естерів [13]. На відміну від даних зазначеної роботи ми засто-

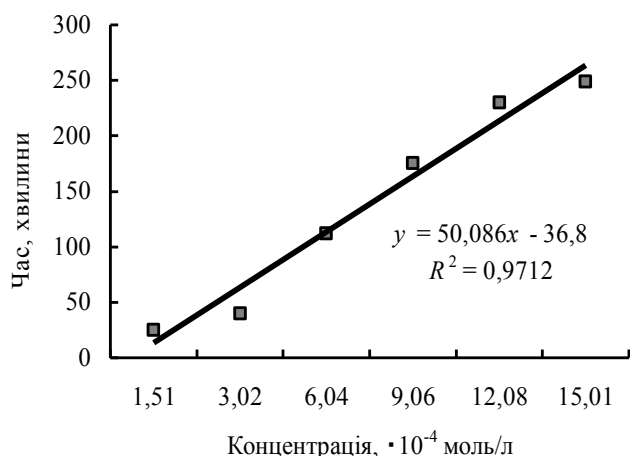
сували дворазово дистильовані МЕЖКС, а всі маніпуляції з ними проводили в атмосфері аргону так, як під час робіт із літійорганічними сполуками [14].

Можливість використання МЕЖКС як субстрату на розробленому нами пристрої продемонстровано на прикладі двох відомих антиоксидантів різної природи – *трет*-бутилкатехолу і діетилдитіокарбамату цинку. *Трет*-бутилкатехол обраний як один з ефективних антиоксидантів, його широко застосовують у науковій практиці для подібних досліджень [15]. З погляду координаційної хімії ця органічна сполука цікава як проліганд - для комплексів перехідних металів можна очікувати на синергізм антиоксидантної активності. Діетилдитіокарбамат цинку належить до відомих інгібіторів окиснення (діалкілдитіокарбамати), його широко застосовують у технічних оливах [16]. Крім антиоксидантної активності, діалкілдитіокарбамати виявляють також протизношувальну й антифрикційну дію [17].

Експериментально підтверджено, що і *трет*-бутилкатехол, і діетилдитіокарбамат цинку гальмують окиснення субстрату – МЕЖКС. При цьому на кінетичних кривих поглинання кисню (рис. 2) спостерігають чітко виражені періоди індукції. Субстрат без антиоксидантів (крива 1) окиснюється майже відразу. В присутності *трет*-бутилкатехолу індукційний період окиснення субстрату подовжується зі збільшенням концентрації антиоксиданту. Залежність індукційного періоду окиснення МЕЖКС від концентрації *трет*-бутилкатехолу (рис. 3) має лінійний характер із високим значенням коефіцієнта кореляції ( $R^2 = 0,97$ ).

В присутності діетилдитіокарбамату цинку індукційний період окиснення МЕЖКС спочатку подовжується зі збільшенням концентрації антиоксиданту від 0,001 до 0,003 моль/л, а при подальшому підвищенні до 0,01 моль/л - не змінюється.

Наведені результати свідчать, що дворазово дистильовані МЕЖКС придатні як субстрат для практичного



**Рис. 3.** Залежність індукційного періоду окиснення метилових естерів жирних кислот соняшникової олії від концентрації трет-бутилкатехолу

визначення антиоксидантної активності методом прискореного окиснення у герметичній системі вимірювань. Основною перевагою розробленого субстрату є його доступність і відносно низька собівартість.

Робота виконана за підтримки цільової комплексної програми фундаментальних досліджень НАН України “Фундаментальні проблеми створення нових речовин і матеріалів хімічного виробництва”.

1. Эммануэль Н.М., Денисов Е.Т., *Нефтехимия*, 1976, **16** (3), 366–382.
2. Ковтун Г.А., Моисеев И.И., *Координац. химия*, 1983, **9** (3), 1155–1181.
3. Shahidi F., Zhong Y., *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, 6th Edition, V. 6., Hoboken, N.J., John Wiley & Sons, Inc., 2005, 357–385.
4. Tiang K., Dasgupta P.K., *Anal. Chem.*, 1999, (71), 1692–1698.

5. Farooq R., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 2003, (84), 205–209.

6. Nogala-Kalucka M., Korczak J., Dratwia M. et al., *Food Chem.*, 2005, **93** (2), 227–235.

7. Пат. на винахід 105258 Україна. Герметичний пристрій для визначення протиокисної стабільності органічних субстратів методом прискореного окиснення, Дзюба В.І., Козачков С.Г., Коваль Л.І. та ін., Заявл. 04.07.2012. Опубл. 25.04.2014. Бюл. № 8.

8. Пехньо В.І., Коваль Л.І., Дзюба В.І., Ільницька О.Л., *Фундаментальні проблеми створення нових речовин і матеріалів хімічного виробництва*, Тези доп. наук. звітної сесії цільової комплексної програми фундаментальних досліджень НАН України, Київ, 20 грудня 2012, 16–17.

9. Yung Chee Liang, Choo Yuen May, Cheng Sit Foon et al., *Yusof Basiron, Fuel*, 2006, (85), 867–870.

10. Uosukainen E., Linko Y., Lämsä M. et al., *J. of the Amer. Oil Chemists' Soc.*, 1998, **75** (11), 1557–1563.

11. Nakatani N., Tachibana Y., Kikuzaki H., *Ibid.*, 2001, (78), 19–23.

12. Knothe G., *Fuel Proc. Technol.*, 2005, (86), 1059–1070.

13. Hradkova I., Merkl R., Smidrkal J. et al., *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2013, (115), 747–755.

14. Уэйкфилд Б., *Методы синтеза с использованием литийорганических соединений*, пер. с англ., Москва, Мир, 1991.

15. Xi F., Barclay L.R.C., *Can. J. Chem.*, 1998, **76**, 171–182.

16. Gogoi P.K., Sonowal J., *Indian J. Chem. Technol.*, 2005, (12), 50–54.

17. Zhan W., Song Y., Ren T., Liu W., *Wear*, 2004, (256), 268–274.

Надійшла до редакції 06.03.2015 р.

## Новый метод оценки активности антиоксидантов (способ и субстрат)

*Л.И. Коваль, В.И. Дзюба, В.И. Пехньо*

*Институт общей и неорганической химии им. В.И. Вернадского НАН Украины,  
Украина, 03680 Київ, просп. Палладина, 32/34; тел.: (044) 424-34-61;  
E-mail: l\_koval@ionc.kiev.ua*

Разработан новый малозатратный метод оценки антиоксидантной активности, который заключается в определении индукционного периода окисления органического субстрата в герметичной системе в условиях ускоренного окисления при повышенной температуре. Устройство для реализации метода состоит из стандартных изделий серийного производства, автоматизирует процесс измерений, обеспечивает компьютерную обработку полученных данных с помощью стандартного программного обеспечения с высокой степенью схожести результатов. В качестве недорогого и доступного субстрата предложены двукратно дистиллированные метиловые эфиры жирных кислот подсолнечного масла, не содержащие природных антиоксидантов. Надежная изоляция от кислорода и влаги воздуха на стадии дистилляции, хранения и отбора доз субстрата гарантирует его пригодность, что показано на примере действия *tert*-бутилкатехола и диэтилдитиокарбамата цинка.

## Novel method for the evaluation of the activity of antioxidants (procedure and substrate)

*L.I. Koval, V.I. Dziuba, V.I. Pekhnyo*

*V.I. Vernadskii Institute of General and Inorganic Chemistry, NAS of Ukraine,  
32-34, Palladin Prosp., 03680 Kyiv, Ukraine; Tel.: (044) 424-34-61;  
E-mail: l\_koval@ionc.kiev.ua*

A novel cost-effective method for the assessment of antioxidant activity has been developed, which involves the determination of the oxidation induction period of organic substrate in a hermetic system under accelerated oxidation conditions at elevated temperature. The device for the method implementation consists of mass-produced standard items and ensures automated measurement process and computer data processing by means of common software with high degree of repeatability of results. Twice-distilled methyl esters of sunflower oil fatty acids containing no natural antioxidants are proposed as cheap and readily available substrates. Secure isolation from atmospheric oxygen and moisture at the stages of distillation, storage and sampling of substrate guarantees suitability of the substrate as exemplified by the action of *tert*-butylcatechol and zinc diethyl dithiocarbamate.