

## ОБЩАЯ И ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 544.431.7: 54.328

### ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ КВАДРАТНО-ВОЛНОВОЙ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ АНТИРАДИКАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ТЕТРАГИДРОФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ

Յ. Օ. ՄԱՆՈՒԿՅԱՆ, Լ. Ա. ԱՐՄԵՆՅԱՆ և Լ. Ա. ԿԱՎԱԴՅԱՆ

Институт химической физики им. А.Б. Налбандяна НАН Республики Армения  
Армения, 0014, Ереван, ул. Паруйра Севака, 5/2  
E-mail: tavadyan@ichph.sci.am

Поступило 17 VII 2018

Электроаналитическим методом квадратно-волновой (КВ) вольтамперометрии определены потенциалы анодного окисления коферментного производного фолиевой кислоты – тетрагидрофолиевой кислоты, и сопоставлены с антирадикальными количественными параметрами. Антирадикальная емкость исследуемого антиоксиданта также измерялась посредством стабильного радикала 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ).

Выявлены три пика анодного окисления – +404, +820, +1008 мВ тетрагидрофолиевой кислоты в вольтамперограммах КВ в интервале потенциалов -1200 ÷ +1600 мВ относительно  $Ag/Ag^+$  в среде ацетонитрила. Уменьшение во времени пиков анодного окисления +404 и +820 мВ в реакции с ДФПГ свидетельствует о наличии в молекуле тетрагидрофолиевой кислоты двух реакционных центров, ответственных за антирадикальную активность.

Рис. 4, табл. 1, библиографические ссылки 19.

Выявление химических механизмов и количественных характеристик антиоксидантных свойств фолиевой кислоты и ее коферментных структурных производных – фолатов, является актуальной задачей. Фолиевая кислота (ФА, N-[4-(2-амино-1,4-дигидро-4-оксо-6-птеридинил-метиламино)бензоил]-L-глутаминовая кислота) – это водорастворимый витамин группы В (витамин В9), а тетрагидрофолиевая кислота – (ТНФА, 5,6,7,8-тетрагидроптероил-L-глутаминовая кислота) – соответственно восстановленная форма фолиевой кислоты, т.е. фолат (рис.1).

Фолаты в организме проявляют различные биомедицинские свойства [1-8]. Среди механизмов биоактивностей важными являются антиоксидантные, антирадикальные свойства фолатов [9-13].

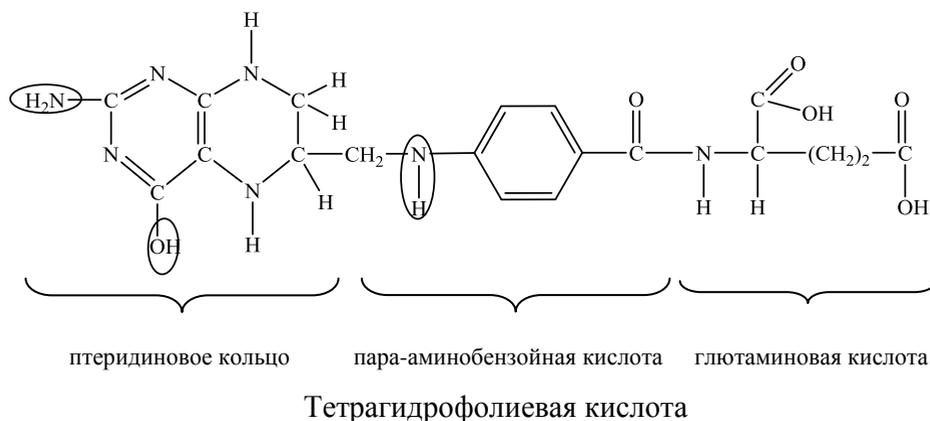


Рис. 1. Структурная формула тетрагидрофолиевой кислоты и ее антирадикальные реакционные центры (отмечены кружочками).

Антиоксидантная активность фолатов обусловлена разными химическими механизмами – начиная с антирадикальной активности до дезактивации ферментов, генерирующих свободные радикалы. Фолаты вступают в реакцию со стабильным радикалом 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ<sup>\*</sup>), с катионным радикалом 2,2-азино-бис-3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты (АБТС<sup>•+</sup>), а также с другими радикалами [9]. Надо отметить, что не исследованы реакции фолатов с пероксильными радикалами, которые в условиях их избыточной генерации вызывают многочисленные патологические состояния, так называемый «окислительный стресс».

Тетрагидрофолиевая кислота – эффективный хелатор. Она хелатирует ионы переходных металлов (например, Fe<sup>2+</sup>) и вследствие этого ингибирует реакцию Фентона с образованием свободных радикалов и соответственно “окислительный стресс” в организме [14]. По исследованиям авторов [12,14], антирадикальная и антипероксинитритная способности фолатов обусловлены присутствием гидроксильной OH группы в птеридиновом кольце молекулы (рис. 1) [9,11,12].

В связи с многофункциональностью действия фолатов и наличием различных механизмов проявления их антиоксидантных свойств актуальной задачей является систематическое исследование антиоксидантных свойств фолатов. Имеется ограниченная информация об антирадикальных реакционных центрах и количественных характеристиках антиоксидантных свойств фолатов. Кроме OH группы, в качестве антирадикальных и антиоксидантных реакционных центров могут выступать также аминная группа птеридинового кольца, NH группа пара-

аминобензойной кислоты (рис. 1). Поэтому актуальной задачей является количественное исследование антирадикальной и антиоксидантной свойств фолатов, выявление реакционных центров на молекулярном уровне, исследование связи между антиоксидантной способностью и молекулярной структурой.

В настоящей работе поставлена цель в *in vitro* условиях выявить антирадикальную способность, а также соответствующие реакционные центры тетрагидрофолиевой кислоты. Одновременно планировалось провести поиск корреляций между строением исследуемого фолата и количественными характеристиками его антирадикальными и окислительно-восстановительными свойствами. Полученные результаты представляют собой полезную информацию для совершенствования фармакологических форм фолатов, а также для повышения эффективности процесса лечебной терапии с помощью фолатов.

### Экспериментальная часть

**Материалы и методы.** Реактивы: тетрагидрофолиевая кислота – 5,6,7,8-тетрагидроптероил-L-глутаминовая кислота (THFA); 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ); перхлорат тетрабутиламмония (ТВАР); нитрат серебра ( $\text{AgNO}_3$ ). Растворители – ацетонитрил (ACN), метанол ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) приобретены в химической компании Sigma-Aldrich (США). Растворители дополнительно очищались согласно методике, описанной в [15]. Была использована деионизированная вода с электрическим сопротивлением 16 *Мом·см* при 25<sup>0</sup>С.

**Электрохимические измерения.** Измерения квадратно-волновой (КВ, SWV) вольтамперометрии проводились посредством биоаналитической системы "Bioanalytical Systems" (BAS, США). Соответствующие КВ вольтамперограммы снимались с использованием трехэлектродной схемы, где в качестве рабочего электрода использовался стеклографитовый электрод сечением 0.09 *см*<sup>2</sup>. Электрод очищался пудрой из  $\text{Al}_2\text{O}_3$  с размером частиц 0.5 *мкм* перед каждым измерением в течение 3 *мин*. В качестве электрода сравнения использовался насыщенный хлорсеребряный  $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$  электрод, а в качестве вспомогательного – платиновый электрод. В измерениях КВ исследуемого фолата в качестве фонового электролита служил перхлорат тетрабутиламмония концентрации 0.1 *М* в ACN. Концентрированный раствор тетрагидрофолиевой кислоты ( $4 \times 10^{-4}$  *М*) готовился в деионизированной воде.

В экспериментах исследуемый раствор перед измерениями насыщался молекулярным азотом (99.99%) в течение 10 *мин*. Работа электрохимической аналитической системы проверялась с помощью эталонных растворов  $\text{Na}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ . При калибровке коэффициент линейной

корреляции составил 0.996. Объем электрохимической ячейки – 10 мл, температура –  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ , скорость развертки напряжения – 20 мВ/с, частота – 25 Гц, квадратно-волновая амплитуда – 25 мВ. КВ вольтамперограммы снимались в диапазоне потенциалов – 1200 ÷ +1600 мВ.

Реакция тетрагидрофолиевой кислоты с ДФПГ исследовалась методом КВ, где в качестве аналитического реагента служил ДФПГ. В исследуемой области концентраций ДФПГ наблюдалась линейная зависимость между соответствующим анодным током окисления ДФПГ и его концентрацией (коэффициент корреляции 0.9921).

Антирадикальная емкость антиоксиданта с использованием ДФПГ вычислялась по формуле:

$$f_{\text{ДРРН}} = \frac{[\text{ДРРН}]_0 - [\text{ДРРН}]_\infty}{[\text{АО}]_0}, \text{ при избытке ДФПГ,} \quad (1)$$

где  $[\text{ДРРН}]_0$ ,  $[\text{АО}]_0$  – исходные концентрации ДФПГ и исследуемого антиоксиданта, соответственно;  $[\text{ДРРН}]_\infty$  – концентрация остаточного ДФПГ после полного расходования антиоксиданта в результате реакции.

Расчеты  $f_{\text{ДРРН}}$  сделаны на основании кинетических кривых реакции ДФПГ с антиоксидантом.

## Результаты и их обсуждение

Вольтамперометрическим методом выявлены антирадикальная емкость и окислительно-восстановительные характеристики тетрагидрофолиевой кислоты. Использовался квадратно-волновой (КВ) метод вольтамперометрии. Электроаналитические исследования позволяют следить за расходом антиоксиданта в результате реакции с ДФПГ для исследуемых реакционных центров в отдельности.

На рис. 2 представлены вольтамперограммы, полученные с помощью вольтамперометрических измерений.

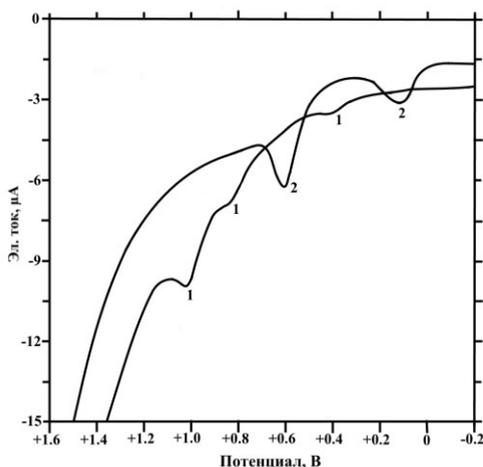


Рис. 2. Вольтамперограммы КВ тетрагидрофолиевой кислоты (1) и ДФПГ (2) при  $37^\circ\text{C}$ ,  $[\text{ДФПГ}]_0 = 11.25 \times 10^{-5} \text{ M}$ , концентрация тетрагидрофолиевой кислоты –  $7.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ , фоновый электролит – перхлорат тетрабутиламмония в растворе ацетонитрила.

Как видно из рис. 2, для тетрагидрофолиевой кислоты в среде ацетонитрила отчетливо наблюдаются три пика окисления: первый – при  $E = +404$ , второй – при  $E = +820$  и третий – при  $E = +1008$  мВ относительно  $Ag/Ag^+$ . Согласно полученным данным, в молекуле исследуемого фолата присутствуют три антирадикальных реакционных центра. Это обусловлено слабыми О-Н или N-Н химическими связями в молекуле фолата. Предполагается, что наиболее слабой и, следовательно, наиболее реакционноспособной является О-Н связь. К такому выводу пришли и авторы работ [16,17].

Кинетические исследования тетрагидрофолиевой кислоты со стабильным радикалом ДФПГ позволили определить антирадикальную способность фолата по отношению к ДФПГ, химическая структура которого представлена на рис. 3.

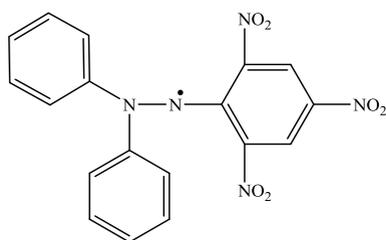


Рис. 3. Химическая структура 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразида (ДФПГ).

В реакции с ДФПГ представляется возможным проследить за изменениями всех трех КВ сигналов, зарегистрированных для тетрагидрофолиевой кислоты при  $+404$ ,  $+820$  и  $+1008$  мВ. Из кинетических кривых реакции с ДФПГ (рис. 4) следует, что в процессе реакции уменьшаются  $+404$  и  $+820$  мВ сигналы тетрагидрофолиевой кислоты, а сигнал окисления при  $+1008$  мВ остается неизменным благодаря высокому значению потенциала окисления. То есть можно утверждать, что в реакцию вступают два реакционных центра. Между тем, для пиков окисления с низкими значениями потенциалов быстрее уменьшается сигнал со значением  $+820$  мВ.

Антирадикальные емкости по отношению к стабильному радикалу ДФПГ ( $f_{ДРРН}$ ) для тетрагидрофолиевой кислоты и в качестве сравнения стандартного антиоксиданта тролокса (водорастворимый аналог  $\alpha$ -токоферола) вычислялись согласно уравнению (1), соответствующие значения приведены в таблице.

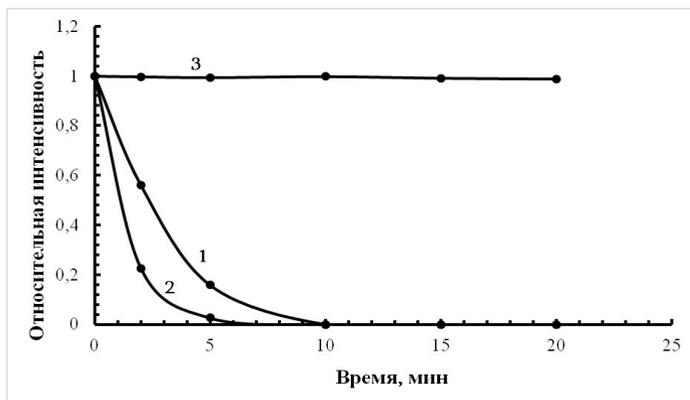


Рис. 4. Кинетические кривые относительной интенсивности КВ сигналов тетрагидрофолиевой кислоты в результате реакции с ДФПГ для трех пиков окисления фолата: +404 (1); +820 (2); +1008 мВ (3) при 37°С. [ДФПГ]<sub>0</sub> = 11.25×10<sup>-5</sup> М, концентрация тетрагидрофолиевой кислоты – 7.5×10<sup>-5</sup> М, фоновый электролит – перхлорат тетрабутиламмония в растворе ацетонитрила.

Таблица

**Антирадикальные емкости антиоксидантов**

Антиоксидант	$f_{\text{DPPH}}$	$f_{\text{DPPH}}$ (по тролоксу)
тетрагидрофолиевая кислота	1.01	1.27
тролокс	0.79	1.00

Как видно из таблицы, антирадикальная емкость тетрагидрофолиевой кислоты превышает эту величину для тролокса [18,19]. Можно с уверенностью утверждать, что тетрагидрофолиевая кислота, являясь многофункциональным биоактивным веществом, обладает антирадикальной способностью.

Таким образом, методом квадратно-волновой вольтамперометрии установлено, что тетрагидрофолиевая кислота – эффективный захватчик свободных радикалов и в полярной апротонной среде имеет два антирадикальных реакционных центра по отношению к ДФПГ.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного комитета по науке Министерства образования и науки Республики Армения (грант 15Т-1D351, 2015).*

**ՏԵՏՐԱԿՆԻՐՈՖՈՒԱԹՎԻ ՆԱԿԱՌԱԳԻԿԱԼԱՅԻՆ ՆԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ՔԱՌԱԿՈՒՍԱՎԱԽՔԱՅԻՆ ՎՈՒՏԱՄՊԵՐՈՄԵՏՐԻԱՅԻ ԵՂԱՆԱԿՈՎ**

**Չ. Ն. ՄԱՆՈՒԿՅԱՆ, Լ. Ն. ՆԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ և Լ. Ա. ԹԱՎԱԳՅԱՆ**

*Քառակուսապիքային վոլտամպերոմետրիայի եղանակով որոշվել են ֆոլաթթվի կոֆերմենտային ածանցյալ տետրահիդրոֆոլաթթվի անոդային օքսիդացման պոտենցիալ-*

ները և համադրվել հակառադիկալային քանակական պարամետրերի հետ: Հետազոտվող հակաօքսիդիչի հակառադիկալային ունակությունը չափվել է նաև օգտագործելով կայուն ռադիկալ 2,2'-դիֆենիլ-1-պիկրիլհիդրազիլը (ԴՖՊՀ):

Տետրահիդրոֆոլաթթվի համար  $-1200$  մՎ  $\div$   $+1600$  մՎ միջակայքում (ըստ  $Ag/Ag^+$ -ի աջետոնիտրիլի միջավայրում) բացահայտվել է անոդային օքսիդացման երեք պիկ  $+404$ ,  $+820$ ,  $+1008$  մՎ: ԴՖՊՀ-ի հետ ռեակցիայում ժամանակի ընթացքում անոդային օքսիդացման  $+404$  և  $+820$  մՎ պիկերի նվազումը վկայում է տետրահիդրոֆոլաթթվի մոլեկուլում հակառադիկալային ակտիվության համար պատասխանատու երկու ռեակցիոն կենտրոնների առկայության մասին:

## INVESTIGATION OF ANTIRADICAL PROPERTIES OF TETRAHYDROFOLIC ACID BY SQUARE-WAVE VOLTAMMETRY METHOD

Z. H. MANUKYAN, L. H. HARUTYUNYAN and L. A. TAVADYAN

A.B. Nalbandyan Institute of Chemical Physics NAS RA

5/2, P. Sevak Str., Yerevan, 0014, Armenia

E-mail: tavadyan@ichph.sci.am

Square-wave voltammetry (SWV) method was used to determine potentials of anodic peaks of the oxidation of tetrahydrofolic acid: the coenzyme structural derivative of the folic acid and to compare the data with antiradical quantitative parameters. The antiradical activity of the studied compound was also measured by using 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) stable radical.

Three anodic peaks of the oxidation (at  $+404$ ,  $+820$ ,  $+1008$  mV) of tetrahydrofolic acid were detected in SW voltammograms in the potential interval of  $-1200 \div +1600$  mV in relation to  $Ag/Ag^+$  electrode in the acetonitrile medium, testifying that three antiradical reaction centers are present in the molecule of the studied compound. According to the data obtained, during the reaction with DPPH, the signals of tetrahydrofolic acid at  $+404$  and  $+820$  mV decrease, while the oxidation signal at  $+1008$  mV remains unchanged due to the high value of the oxidation potential. Meanwhile, for peaks of oxidation with low values of potentials, the signal with a value of  $+820$  mV decreases faster. The decrease of the peaks of anodic oxidation at  $+404$  and  $+820$  mV with time indicates the presence of two reaction centers in the molecule of tetrahydrofolic acid responsible for antiradical activity.

It is illustrated that tetrahydrofolic acid exhibits antiradical ability and represents an effective scavenger of free radicals.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] Tamura T., Frances M. // Am. J. Clin. Nutr., 2006, v.83, p.993.
- [2] Duthie S.J., Narayanan S., Brand G.M., Pirie L., Grant G. // J. Nutr., 2002, v.132, p.2444.
- [3] Ulrich C.M. // J. Nutr., 2005, v.135, p.2698.
- [4] Raykov Z.Z., Ivanov V.A., Raikova E.T., Galabov A.S. // Biotechnol. Biotechnol. Equip., 2004, v.18, p.125.
- [5] Stanger O. // Curr. Drug Metab., 2002, v.3, p.211.
- [6] Miller A.L. // Altern. Med. Rev., 2008, v.13, p.216.
- [7] Choi S.W., Mason J.B. // J. Nutr., 2000, v.130, p.129.
- [8] Bjelakovic L., Kocic G., Stojanovic I., Jevtovic-Stoimenov T., Najman S., Sokolovic D., Stojanovic S., Bjelakovic G. // Pteridines, 2012, v.23, p.33.

- [9] *Gliszczyn 'ska-S'wigło A.* // Food Chem., 2007, v.101, p.1480.
- [10] *Joshi R., Adhikari S., Patro B.S., Chattopadhyay S., Mukherjee T.* // Free Radic. Biol. Med., 2001, v.30, p.1390.
- [11] *Nakano E., Higgins J.A., Powers H.J.* // Br. J. Nutr., 2001, v.86, p.637.
- [12] *Rezk B.M., Haenen G.R., van der Vijgh W.J., Bast A.* // FEBS Letters, 2003, v.555, p.601.
- [13] *Kumar C.K.A., Tejasri M., Santheesh K.D., Ramya M., Revathi K., Kumar R.G.A.* // Int. J. Innov. Drug Discov., 2012, v.2, p.98.
- [14] *Patro B.S., Adhikari S., Mukherjee T., Chattopadhyay S.* // J. Med. Chem., 2006, v.2, p.407.
- [15] *Гордон А., Форд Р.* / Спутник химика. М., Мир, 1976, с.514.
- [16] *Verhaar M.C., Stroes E., Rabelink T.J.* // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2002, v.22, p.6.
- [17] *Moens A.L., Champion H.C., Claeys M.J., Tavazzi B., Kaminski P.M., Wolin M.S.* // Circulation, 2008, v.117, p.1810.
- [18] *Манукян З.О., Арутюнян Л.А., Мусаелян М.В., Мкрян Г.Г., Тавадян Л.А.* // Хим. ж. Армении, 2015, т.68, с.183.
- [19] *Tavadyan L.A., Manukyan Z.H., Harutyunyan L.H., Musayelyan M.V., Sahakyan A.D., Tonikyan H.G.* // Antioxidants, 2017, v.6, p.22.