

# ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АНТИОКСИДАНТОВ НА ЭЛЕКТРОДЕ ИЗ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК

И.Г. Сидоренко

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины  
ул. Генерала Наумова 17, 03164 Киев-164, sydorenko\_inna@isc.gov.ua*

*Исследовано электроокисление аскорбиновой кислоты на электроде из углеродных нанотрубок в фосфатном буферном растворе. Вследствие наличия на портах нанотрубок кислородсодержащих функциональных групп они обладают каталитической активностью в реакции электроокисления аскорбиновой кислоты. Линейность зависимости величины предельного тока окисления аскорбиновой кислоты от содержания ее в растворе соблюдается в интервале концентраций  $1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-2}$  моль·дм<sup>-3</sup>. Определению содержания аскорбиновой кислоты не мешает наличие в растворе лимонной кислоты, что дает возможность применять данную методику для исследования антиоксидантной активности соков, в частности плодов цитрусовых.*

## Введение

Биохимические исследования, выполненные в последние десятилетия, показали, что одной из основных причин патологических изменений в человеческом организме, приводящих к преждевременному старению и развитию многих болезней, в том числе самых опасных, таких как сердечно-сосудистые и онкологические заболевания, является повышенное содержание в меж- и внутриклеточных биологических жидкостях свободных кислородсодержащих радикалов (супероксид-анион, гидроксильный радикал, пергидроксильный радикал и др.). Они способствуют развитию оксидантного стресса, выражающегося с биохимической точки зрения в том, что свободные радикалы окисляют молекулы стенок сосудов, белки, ДНК, липиды. Радикалы особенно активно взаимодействуют с мембранными липидами, содержащими ненасыщенные связи, и изменяют свойства плазматических мембран [1].

При нормальном протекании процесса дыхания в живых организмах происходит восстановление кислорода по двухэлектронной схеме с образованием молекул воды. Промежуточным продуктом реакции восстановления кислорода является перекись водорода, которая нейтрализуется пероксидисмутазой. Однако под воздействием радиоактивного и ультрафиолетового излучения, вследствие ухудшения экологической обстановки, употребления некачественных продуктов питания, приема лекарственных препаратов активные пероксидные частицы могут образовываться в заметных количествах, превышающих защитные возможности организма.

Вредное воздействие свободных радикалов можно уменьшить за счет регулярного употребления определенных пищевых продуктов и лекарственных препаратов, содержащих антиоксиданты. Содержание антиоксидантов в пищевых продуктах, напитках, БАДах, как правило, неизвестно. Поэтому измерение и контроль содержания антиоксидантов – актуальная задача, имеющая социально-здравоохранительное значение.

В основе известных в настоящее время методов определения антиоксидантной активности лежит ингибирование антиоксидантом модельных окислительных реакций с регистрацией изменения концентрации реагентов или продуктов реакции хемилюминесценцией, хроматографией и другими методами. В этих методах антиоксидантная

активность есть функция многих параметров, в частности, природы исследуемого вещества, концентрации антиоксиданта и других соединений, времени, температуры и т.д. Поэтому данные одних методов обычно не коррелируют с результатами других методов. Поскольку противокислительная активность антиоксидантов определяется их способностью к электроокислению [2, 3] для количественного определения содержания антиоксидантов наиболее надежным представляется метод вольтамперометрии [4, 5].

Среди наиболее активных антиоксидантов важное место занимает аскорбиновая кислота (АК), что стимулировало широкие исследования по разработке вольтамперометрического метода определения содержания этого соединения в биологических системах. Тем не менее, через большое перенапряжение реакции окисления аскорбиновой кислоты на электродах, обычно используемых при электрохимических измерениях, наблюдается низкая селективность и плохая воспроизводимость результатов. Поэтому интерес исследователей был сфокусирован на использовании модифицированных электродов, поверхность которых обладает каталитической активностью в реакции электроокисления АК. В качестве модификаторов поверхности электродов широко используются пленки проводящих полимеров, в частности полианилина [6]. Они проявляют электрохимическую активность только в кислых растворах и при  $\text{pH} > 4$  становятся непроводящими, тогда как исследование биологических объектов проводится в нейтральной среде. Это вынуждает вводить в состав модифицирующей пленки такие соединения как камфорсульфоновая кислота [7], норэпинефрин [8], цистеамин [9], цитилпиридилбромид/хитозан [10], додецилбензолсульфоновую кислоту [11]. В качестве модификаторов поверхности электродов для определения аскорбиновой кислоты, допамина и мочевой кислоты могут быть также использованы углеродные нанотрубки (УНТ) [12 – 16].

Однако применение модифицированных электродов осложняется необходимостью обновления их поверхности после каждого измерения. Избежать этих проблем позволяют пастовые электроды. Данная работа посвящена изучению реакции электроокисления АК на пастовых электродах из УНТ, влияния на процесс добавок лимонной кислоты и пригодности таких электродов для определения антиоксидантной активности продуктов растительного происхождения, в частности лимонного сока.

### **Экспериментальная часть**

Углеродный нановолокнистый материал синтезировали пиролизом бензола над катализатором, полученном при электроосаждении никеля на поверхность частиц терморасширенного графита из разбавленных водных растворов по методике описанной ранее [17, 18].

200 мг порошка катализатора в лодочке из нержавеющей стали помещали в трубчатый кварцевый реактор, который нагревали в горизонтальной электропечи до температуры 700 °С. Поток аргона со скоростью 100 мл·мин<sup>-1</sup> пропускали через сосуд с бензолом и реактор в течение 50 ч. При таком режиме конечный продукт содержал 20 % мас. катализатора и 80 % мас. многостенных углеродных нанотрубок [19].

Катализатор из конечного продукта удаляли обработкой его 50 % мас. азотной кислотой при комнатной температуре в течение 48 ч. После тщательной промывки дистиллированной водой продукт отфильтровывали и сушили 5 ч при 150 °С.

Для приготовления фосфатных буферных растворов использовали стандарт-титры (РИАП, Украина).

Углеродные пастовые электроды изготавливали заполнением стеклянной трубки (внутренний диаметр 2 мм, длина 5 см) нановолокнистым углеродным материалом, смоченным вазелиновым маслом. Токоподвод осуществляли через платиновую проволочку, плотно прижатую к электродной массе. Обновление поверхности электрода перед каждым измерением вели путем выталкивания столбика электродной массы высотой

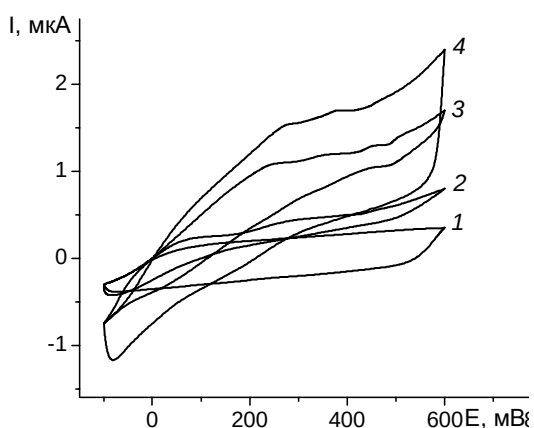
~ 0,5 мм, срезанием его лезвием безопасной бритвы и полировкой его рабочей поверхности на фильтровальной бумаге.

Вольтамперные характеристики снимали при помощи потенциостата ПИ-50-1.1, соединенным с двухкоординатным самописцем ПДА1, в трехэлектродной стеклянной ячейке. Вспомогательным электродом служил стеклоуглеродный стержень диаметром 2 мм, погруженный в исследуемый раствор на глубину 1 см. В качестве электрода сравнения использовали насыщенный хлоридсеребряный электрод. Значения потенциалов приведены относительно этого электрода.

## Результаты и обсуждение

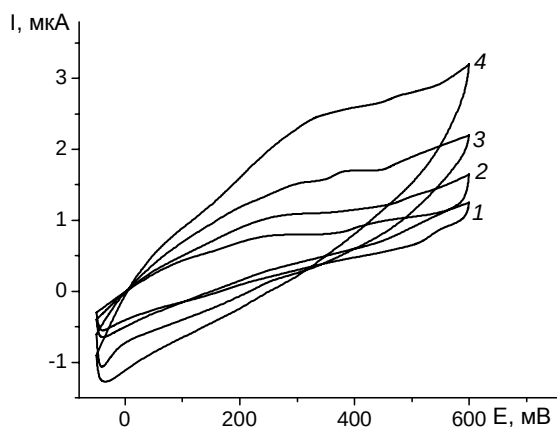
Аскорбиновая кислота – важный аналит, который присутствует во многих биологических жидких средах, соках, натуральных винах, лекарственных препаратах и т.д. Для вольтамперометрического определения АК могут быть использованы углеродные или металлические электроды с модифицированной поверхностью. Как показано в [20], окисление аскорбиновой кислоты более эффективно протекает на окисленной поверхности углерода. Вследствие того, что углеродные нанотрубки для очистки от катализатора подвергают кислотной обработке, на их портах образуются кислородсодержащие функциональные группы [21], что оказывает положительное влияние на электроокисление аскорбиновой кислоты. На рис. 1 приведены циклические вольтамперограммы электрода из УНТ в 0,1 моль·дм<sup>-3</sup> растворе фосфатного буфера, содержащего 0,1 – 10 ммоль·дм<sup>-3</sup> аскорбиновой кислоты.

В отличие от стеклоуглеродных электродов, на которых молекулы аскорбиновой кислоты окисляются при потенциале 384 мВ относительно хлоридсеребряного электрода [20], на электроде из УНТ окисление происходит при потенциале 200 мВ. Сдвиг потенциала в сторону отрицательных значений на 184 мВ указывает на то, что углеродные нанотрубки проявляют каталитическую активность в реакции электроокисления АК. Вольтамперограммы воспроизводятся при циклировании, свидетельствуя об отсутствии адсорбции продукта реакции на поверхности электрода. По этой причине на вольтамперограммах не отмечаются пики, соответствующие восстановлению диоксиаскорбата при развертке потенциала в катодном направлении. Предельный ток окисления линейно возрастает при увеличении содержания АК в электролите.

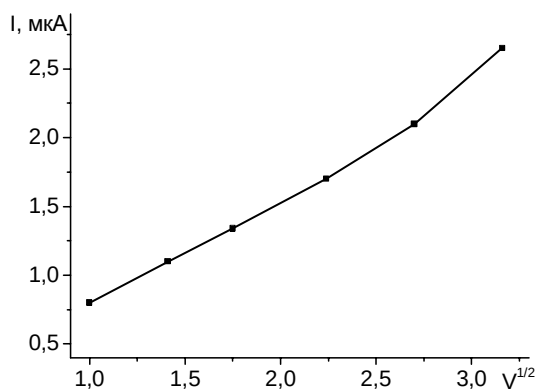


**Рис. 1.** Циклические вольтамперограммы электрода из УНТ в растворе фосфатного буфера, содержащего аскорбиновую кислоту: 1 – 0; 2 – 0,1; 3 – 1; 4 – 10 ммоль·дм<sup>-3</sup>.

Циклические вольтамперограммы электрода из углеродных нанотрубок в электролите, содержащем 1 ммоль·дм<sup>-3</sup> аскорбиновой кислоты при различных скоростях развертки потенциала показаны на рис. 2. Величина предельного тока окисления АК линейно зависит от квадратного корня скорости развертки (рис. 3), что указывает на то, что скорость реакции контролируется диффузией реагента в объеме электролита.



**Рис. 2.** Циклические вольтамперограммы электрода из УНТ в фосфатном буферном растворе, содержащем  $1 \text{ ммоль} \cdot \text{дм}^{-3}$  аскорбиновой кислоты при различных скоростях развертки потенциала: 1 – 1; 2 – 2; 3 – 5; 4 – 10 мВ/с.

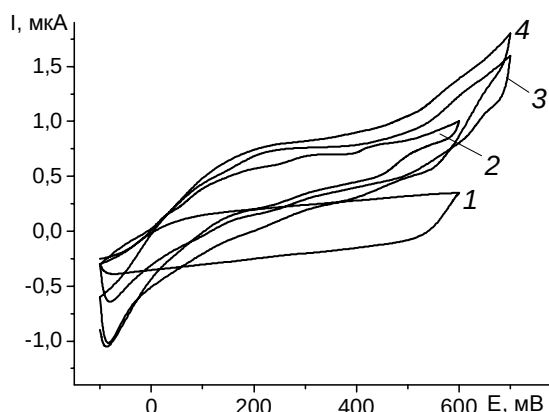


**Рис. 3.** Зависимость предельного тока окисления аскорбиновой кислоты от скорости развертки потенциала.

Протекание процесса электроокисления АК зависит от pH раствора. В кислых растворах на вольтамперограммах наблюдается только один пик, тогда как в щелочных проявляется и второй. В водных растворах молекулы аскорбиновой кислоты депротонируются в две стадии с  $pK_1 = 4,17$  и  $pK_2 = 11,57$ . Следовательно, в нейтральных растворах аскорбиновая кислота существует в виде однодепротонированного аскорбат-аниона. Поэтому окисление аскорбиновой кислоты в нейтральной среде происходит при участии двух электронов и одного протона. Аскорбат-анион может быть окислен электрохимически на электроде из стеклоуглерода при потенциале выше 0,3 В относительно насыщенного каломельного электрода. Реальные растворы содержат множество ионов, которые могут окисляться на аноде при столь высоких потенциалах. Следовательно, анодный ток представляет сумму токов окисления этих веществ и аскорбат-анионов, что может смещать отклик окисления аскорбата. Поэтому огромное значение имеет создание электрокаталитически активной поверхности электрода, способной понизить потенциал электроокисления аскорбата до приемлемого уровня, что позволит избежать разряда на аноде посторонних веществ. Поскольку каталитическую активность в реакции электроокисления АК проявляют как наноразмерные структуры, так и окисленная поверхность углерода [20], то электроды из УНТ представляют собой композицию из этих материалов. Так как электроокисление аскорбата протекает с переносом протона, можно предположить, что между его гидроксильной группой и карбонильной группой на поверхности углерода образуется водородная связь, перенос протона по которой происходит по безбарьерному механизму. Это и приводит к снижению потенциала окисления аскорбата.

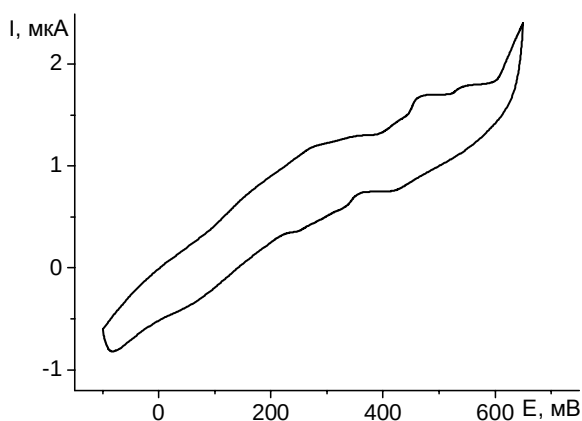
На рис. 4 приведены вольтамперограммы электрода из углеродных нанотрубок в  $0,1 \text{ моль} \cdot \text{дм}^{-3}$  растворе фосфатного буфера, содержащего  $1 - 10 \text{ ммоль} \cdot \text{дм}^{-3}$  лимонной кислоты. Хотя в молекуле лимонной кислоты (ЛК) имеется оксигруппа, при потенциалах рабочего электрода до + 0,7 В ее окисление не происходит. Увеличение тока при повы-

шении содержания лимонной кислоты в электролите может быть связано с возрастанием емкости двойного слоя, заряд которого происходит при больших величинах тока.



**Рис. 4.** Вольтамперограммы электрода из УНТ в растворе фосфатного буфера, содержащего лимонную кислоту: 1 – 0; 2 – 0,1; 3 – 0,5; 4 – 1 моль·дм<sup>-3</sup>.

Несколько неожиданным оказался эффект добавления в фоновый электролит, содержащий аскорбиновую кислоту, лимонной кислоты (рис. 5). Для фосфатного буферного раствора, содержащего эквимольную ( $1 \cdot 10^{-3}$  моль·дм<sup>-3</sup>) смесь АК и ЛК, на вольтамперограмме отмечаются два участка предельного тока, соответствующие поэтапному окислению молекул аскорбиновой кислоты. При этом предельный ток существенно выше по сравнению с растворами, не содержащими лимонной кислоты. Это может быть объяснено тем, что в водных растворах для аскорбиновой кислоты характерно равновесие двух форм: дикето- и диэнольной.

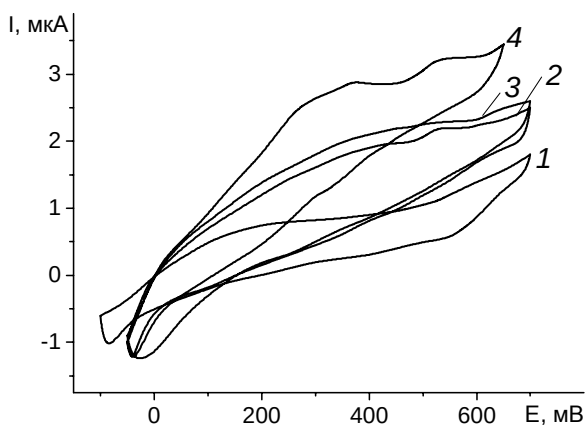


**Рис. 5.** Циклические вольтамперограммы электрода из УНТ в растворе фосфатного буфера, содержащем 1 ммоль АК и 1 ммоль ЛК.

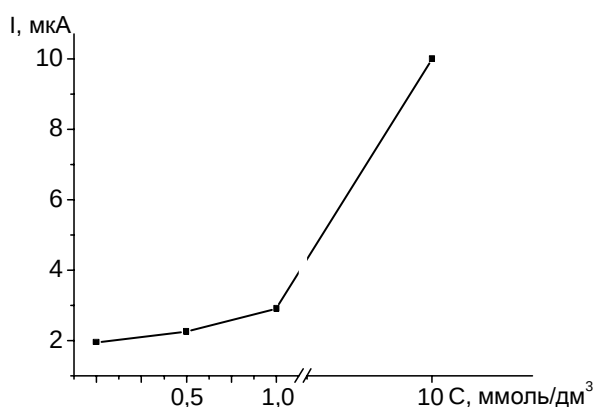
Добавление лимонной кислоты, по-видимому сдвигает равновесие в сторону диэнольной формы, которая и способна к окислению.

Кроме того, в электролите, содержащем лимонную кислоту, при развертке потенциала в катодном направлении на вольтамперограмме отмечаются процессы восстановления, что указывает на адсорбцию продукта реакции поверхностью электрода.

Поскольку сок лимонов содержит 4 – 5 % ( $\sim 0,1$  моль·дм<sup>-3</sup>) лимонной кислоты и при исследовании антиоксидантной активности в раствор добавляют буфер, приводящий к уменьшению концентрации кислоты, то вольтамперограммы электрода из углеродных нанотрубок снимали в  $0,1$  моль·дм<sup>-3</sup> растворе фосфатного буфера, содержащего  $10$  ммоль·дм<sup>-3</sup> ЛК и  $0,01$  –  $10$  ммоль·дм<sup>-3</sup> АК (рис. 6). Линейная зависимость предельного тока окисления аскорбиновой кислоты от содержания ее в растворе соблюдается в интервале концентраций  $0,1$  –  $1$  ммоль·дм<sup>-3</sup> (рис. 7).

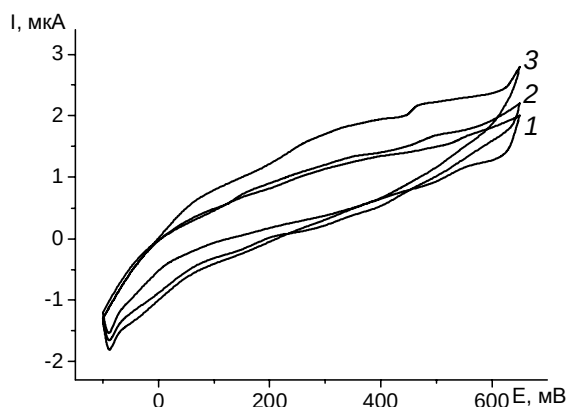


**Рис. 6.** Циклические вольтамперограммы электрода из УНТ в растворе фосфатного буфера, содержащем  $10 \text{ ммоль} \cdot \text{дм}^{-3}$  ЛК и АК: 1 – 0; 2 – 0,1; 3 – 0,5; 4 –  $1 \text{ ммоль} \cdot \text{дм}^{-3}$ .



**Рис. 7.** Зависимость предельного тока окисления АК от ее концентрации в электролите, содержащем  $10 \text{ ммоль} \cdot \text{дм}^{-3}$  лимонной кислоты.

На рис. 8 приведены вольтамперограммы электрода из углеродных нанотрубок в  $0,1 \text{ моль} \cdot \text{дм}^{-3}$  растворе фосфатного буфера, содержащего 10 – 30 % лимонного сока.



**Рис. 8.** Циклические вольтамперограммы электрода из УНТ в растворе фосфатного буфера, содержащем сок лимона: 1 – 10; 2 – 20; 3 – 30 %.

Исходя из результатов, приведенных на рис. 8 можно сделать вывод, что концентрация антиоксиданта в электролите, содержащем 10 % лимонного сока соответствует  $0,1 \text{ моль} \cdot \text{дм}^{-3}$  АК.

Окисление начинается при потенциале 230 мВ как и для АК, однако это не служит основанием для утверждения, что антиоксидантная активность лимонного сока определяется наличием в нем только аскорбиновой кислоты. В отличие от вольтамперограмм, снятых для модельных растворов аскорбиновой кислоты, для вольтамперограмм, полученных в электролитах с добавками лимонного сока при развертке потенциала в катодном направлении наблюдается восстановление продукта реакции электроокисления. Это может быть связано с тем, что антиоксидантная активность лимонного сока определяется ароматическими соединениями, которые, вследствие структурного подо-

бия с графеновыми плоскостями боковых поверхностей УНТ, адсорбируются на поверхности электрода за счет образования  $\pi$ -связей.

## Выводы

Показано наличие каталитической активности многостенных углеродных нанотрубок в реакции электроокисления аскорбиновой кислоты. Линейная зависимость величины предельного тока окисления аскорбиновой кислоты от ее содержания в растворе соблюдается в интервале концентраций  $1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-2}$  моль·дм<sup>-3</sup>. Определению содержания аскорбиновой кислоты не мешает наличие в растворе лимонной кислоты, что дает возможность применять данную методику для исследования антиоксидантной активности соков, в частности плодов цитрусовых.

## Литература

1. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. – М.: МАИК "Наука/Интерпериодика", 2001. – 343 с.
2. Бойко М.А., Терах Е.И., Просенко А.Е. Исследование взаимосвязи между электрохимической и противоокислительной активностью алкилзамещенных фенолов // Кинет. и катал. – 2006. – Т. 47, № 5. – С. 700 – 704.
3. Бойко М.А., Терах Е.И., Просенко А.Е. Взаимосвязь между электрохимической активностью алкил- и тиоалкилзамещенных фенолов и их антиокислительным действием // Журн. физ. химии. – 2006. – Т. 80, № 8. – С. 1396 – 1402.
4. Продукты пищевые: Вольтамперометрический метод определения массовой концентрации витамина С: ГОСТ Р 52690 – 2006. Офиц. изд. М.: Стандартинформ. 2007. 111. 12 с. (Нац. стандарт РФ).
5. Яшин А.Я. Инжекционно-проточная система с амперометрическим детектором для селективного определения антиоксидантов в пищевых продуктах и напитках // Рос. хим. журн. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И.Менделеева). – 2008. – Т. LII, № 2. – С. 130 – 135.
6. Malinauskas A., Garijnutė R. Electrochemical response of ascorbic acid at conducting and electrogenerated polymerpolymers modified electrodes for electroanalytical application: a review // Talanta. – 2004. – V. 64, № 1. – P. 121 – 129.
7. Zhang Lei, Dong Shaojun. The electrocatalytic oxidation of ascorbic on polyaniline film synthesized in the presence of camphorsulfonic acid // J. Electroanal. Chem. – 2004. – V. 568, № 1. – P. 189 – 194.
8. Norepinephrine-modified glassy carbon electrode for the simultaneous determination of ascorbic acid and uric acid / H.R. Zara, F. Memarzadeh, A.M. Mazloun, M. Namazian, S.M. Golabi // Electrochim. Acta. – 2005. – V. 50, № 16 – 17. – P. 3495 – 3502.
9. Shervedani Resa Karimi, Bagherzadeh Mojtaba, Mozaffari Seyed Ahmad. Determination of dopamine in the presence of high concentration of ascorbic acid by using gold cysteamine self-assembled monolayers as a nanosensor // Sens. and Actuators. B. – 2006. – V. 115, № 2. – P. 614 – 621.
10. Electrochemical method for simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid using cetilpyridine bromide/chitosan composite film modified glassy carbon electrode / Cao Xiaomei, Luo Ziqiang, Ding Yaping, Zou Xuelian, Bian Quixiang // Sens. and Actuators. B. – 2008. – V. 129, № 2. – P. 941 – 946.
11. The application of conducting polymers nanoparticle electrodes to sensing of ascorbic acid / Ambrasi Andriano, Morrin Aoife, Smyth Malcolm R., Killarard Antohony J. // J. Anal. chim. acta. – 2008. – V. 609, № 1. – P. 37 – 43.

12. Чен В., Жин Г., Жан Ю. Электрохимическое поведение золотого электрода, модифицированного пленкой из одностенных углеродных нанотрубок с бромидом додецилдиметиламмония, и его электрокаталитическая активность по отношению к аскорбиновой кислоте // *Электрохимия*. – 2005. – Т. 41, № 10. – С. 1193 – 1199.
13. Selective response of dopamine in the presence of ascorbic acid at multi-walled carbon nanotube modified gold electrode / Zhang Ping, Wu Fang-Hui, Zhao Guang-Chao, Wei Xian-Wen // *Bioelectrochemistry*. – 2005. – V. 67, № 1. – P. 109 – 114.
14. Hu C.G., Wang W.L., Feng B. Simultaneous measurement of dopamine and ascorbic acid at CNT electrode // *J. Mod. Phys. B*. – 2005, № 9. – V. 19, № 1 – 3. – P. 607 – 610.
15. Shahrokhian Saeed, Zare-Mehrjardi Hamid Reza. Application of thionine-nafion supported on multi-walled carbon nanotube for preparation of a modified electrode in simultaneous voltammetric detection of dopamine and ascorbic acid // *Electrochim. Acta*. – 2007. – V. 52, № 22. – P. 6310 – 6317.
16. Yogeswaran Umasankar, Chen Shen-Ming. Separation and concentration effect f-MWCNTs on electrocatalytic responses of ascorbic acid at f-MWCNTs incorporated with poly(neutral red) composite films // *Electrochim. Acta*. – 2007. – V. 52, № 19. – P. 5985 – 5996.
17. Выделение меди из разбавленных растворов на дисперсном графитовом катоде / Г.М. Загоровский, Г.П. Приходько, В.М. Огенко, И.Г. Сидоренко // *Журн. прикл. химии*. – 2001. – Т. 74, № 3. – С. 476 – 478.
18. Электроосаждение никеля на трехмерном графитовом катоде В.М. Огенко, И.Г. Сидоренко, Г.П. Приходько, Г.М. Загоровский // *Укр. хим. журн.* – 2002. – Т. 68, № 9. – С. 36 – 39.
19. Загоровский Г.М., Сидоренко И.Г., Чуйко А.А. Получение углеродных наноструктур путем пиролиза бензола на терморасширенном графите с электроосажденным никелем // *Наносистемы, наноматериалы, нанотехнологии*. – Зб. наук. праць. – Т. 1, вип. 1. – Київ: Академперіодика, 2004. – С. 165 – 171.
20. Jeromerajan Premkumar, Soo Beng Khoo. Electrocatalytic oxidations of biological molecules (ascorbic acid and uric acid) at highly oxidized electrodes // *J. Electroanal. Chem.* – 2005. – V. 576, № 1. – P. 105 – 112.
21. Solution properties of single-walled carbon nanotubes / Chen Jian, Hamon Mark A, Hui Hu, Yongsheng Chen, Rao Apparao M., Eklund Peter C., Haddon Robert C. // *Science*. – 1998. – V. 282, № 5386. – P. 95 – 98.

## VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF THE ANTIOXIDANT CONCENTRATION AT THE ELECTRODE OF CARBON NANOTUBES

**I.G. Sydorenko**

*Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine  
General Naumov Str. 17, 03164 Kyiv-164, sydorenko\_inna@isc.gov.ua*

*The electrical oxidation of ascorbic acid at the electrode of carbon nanotubes in phosphate buffer solution has been studied. Due to the presence of oxygen containing functional groups at the ports of nanotubes, they have a catalytic activity in the reaction of ascorbic acid electrical oxidation. The linear dependence of the plateau current of ascorbic acid oxidation on its concentration in the solution is kept within concentration of 0.1 – 10 mmol·dm<sup>-3</sup>. The presence of citric acid doesn't interfere with determination of ascorbic acid concentration what gives chance to apply the method for determination of juices antioxidant activity, particularly that of citric fruits.*