

Федеральное государственное
автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт цветных металлов и материаловедения

Кафедра органической и аналитической химии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Б.Н. Кузнецов
« ____ » _____ 2016г

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

04.03.01 – Химия

**ЗАВИСИМОСТЬ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ
ГИДРОКСИЛИРОВАННЫХ ФУЛЛЕРЕНОВ C₆₀ И C₇₀ ОТ
КОЛИЧЕСТВА ГИДРОКСИЛЬНЫХ ГРУПП**

Руководитель _____ профессор, д-р техн.наук

Г.Н. Чурилов

Выпускник _____

Е.М.Кузьмина

Красноярск 2016

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Зависимость антиоксидантной активности гидроксированных фуллеренов C_{60} и C_{70} от количества гидроксильных групп» содержит 36 страниц текстового документа, 16 рисунков, 1 таблицу, ссылки на 29 литературных источников.

ФУЛЛЕРЕН, ФУЛЛЕРЕНОЛ, АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ, СВОБОДНЫЙ РАДИКАЛ.

В последнее десятилетие проявляется большой интерес к определению антиоксидантной активности лекарственных форм, биологически активных веществ, пищевых продуктов. Это связано с тем, что общепринято считать одной из основных причин наиболее опасных заболеваний - накопление свободных радикалов в организме человека.

Данная работа посвящена сравнению антиоксидантных свойств фуллеренолов полученных на основе C_{60} и C_{70} , содержащих разное количество гидроксильных групп.

Задачи работы:

- Выделить индивидуальные фуллерены C_{60} и C_{70} и получить на их основе фуллеренолы, содержащие разное количество гидроксильных групп., применяя три метода.
- Исследовать полученные фуллеренолы методом ИК-спектроскопии.
- Построить график зависимости оптической плотности раствора адреналина с фуллеренолом от концентрации введенного фуллеренола.
- Найти концентрации фуллеренолов, полученных на основе C_{60} и C_{70} , с разным количеством гидроксильных групп, при которых антиоксидантная активность фуллеренолов будет максимальной.
- Определить у какого из фуллеренолов, полученного разными методами, достигается максимальная антиоксидантная активность.

- Сравнить антиоксидантную активность фуллеренолов, полученных на основе C_{60} и C_{70}

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	5
1 Литературная часть	8
1.1 Фуллерены - история открытия	8
1.1.1 Фуллерены – особенности свойств и строения.....	9
1.1.2 Области применения фуллеренов.....	11
1.2 Гидроксильированные фуллерены.....	12
1.3 Образование свободных радикалов в живом организме.....	15
1.4 Антиоксиданты.....	16
2 Экспериментальная часть.....	19
2.1 Приборы и реактивы	19
2.2 Методики экспериментов	20
2.2.1 Выделение фуллеренов.....	20
2.2.2 Синтез гидроксильированных фуллеренов	20
2.2.2.1 Синтез фуллеренолов с наименьшим количеством гидроксиль – ных групп	20
2.2.2.2 Синтез фуллеренолов со средним количеством гидроксиль – ных групп	21
2.2.2.3 Синтез фуллеренолов с максимальным количеством гидроксиль – ных групп	22
2.2.3 Метод определения антиоксидантной активности.....	23
Результаты и их обсуждение.....	24
Выводы	32
Список литературы	33
Аннотация на английском языке	36

ВВЕДЕНИЕ

В последнее десятилетие проявляется большой интерес к определению антиоксидантной активности лекарственных форм, биологически активных веществ, пищевых продуктов и напитков. Это связано с тем, что общепринято считать одной из основных причин наиболее опасных заболеваний - накопление свободных радикалов в организме человека. Концентрация свободных радикалов (супероксидный радикал, пероксид водорода, гидроксил радикал и др.) возрастает за счет снижения активности естественной антиоксидантной системы человека, связанной с воздействием радиации, УФ облучения, курения, алкоголизма, постоянных стрессов, инфекционных болезней, некачественного питания. За счет вредных воздействий свободных радикалов повреждаются стенки сосудов, мембраны, окисляются липиды, что приводит к серьезным патологическим изменениям, к сердечно-сосудистым и онкологическим заболеваниям, а также к преждевременному старению. Вредное воздействие на организм свободных радикалов можно уменьшить за счет систематического употребления некоторых лекарственных растительных препаратов, биологически активных добавок, продуктов питания и напитков, обладающих хорошей антиоксидантной активностью. Основные природные антиоксиданты - витамины Е и С, полифенолы, флавоноиды, ароматические оксикислоты, антоцианы и другие. Антиоксиданты защищают клеточные структуры от повреждения их свободными радикалами, это предохраняет организм человека от болезней.

В связи с этим оценка антиоксидантной активности разных лекарственных форм - весьма актуальная задача [1-3].

Изучение свойств фуллеренов и их производных за последнее время позволило определить области их практического использования. Из них особый интерес представляет использование этих соединений в медицинской практике.

Использование фуллеренов и их производных для создания лекарственных препаратов обусловлено тем, что углерод является основным элементом биологических систем, а значит, наиболее пригоден для их модификации. Отличительной особенностью фуллеренов и большинства производных на их основе является низкая токсичность и способность выводиться из организма с приемлемой скоростью. Следует также отметить, что благодаря своей геометрии и электронной структуре, фуллерены способны образовывать соединения, содержащие в своем составе различные фармакофорные группы, способны легко переходить в возбужденное состояние под действием различных физических и химических факторов и заключать внутрь своей углеродной сферы атомы металлов. Соединения фуллеренов обладают антиоксидантными и радиозащитными свойствами, способны подавлять вирусную активность различных штаммов вируса гриппа, ВИЧ, гепатита С. При облучении в присутствии кислорода соединения фуллерена способны разрывать цепь ДНК, оказывая цитотоксический эффект на опухолевые клетки [4].

К молекуле фуллерена можно цеплять различные функциональные группы, что даёт нам право получать растворимые в воде производные фуллеренов. Одними из таких соединений являются гидроксильные фуллерены, которые так же обладают антиоксидантной активностью. На данный момент антиоксидантная активность фуллеренола, полученного на основе C_{60} , изучена хорошо, а на основе C_{70} – плохо. Так же, было бы интересно узнать, как влияет количество гидроксильных групп на антиоксидантные свойства фуллеренолов.

Целью выпускной квалификационной работы является определение зависимости антиоксидантных свойств фуллеренолов, полученных на основе C_{60} и C_{70} , от количества гидроксильных групп.

Для достижения поставленной цели, требовалось выполнить следующие задачи:

- Выделить индивидуальные фуллерены C_{60} и C_{70} и получить на их основе фуллеренолы, содержащие разное количество гидроксильных групп, применяя три метода.
- Исследовать полученные фуллеренолы методом ИК-спектроскопии.
- Построить график зависимости оптической плотности раствора адреналина с фуллеренолом от концентрации введенного фуллеренола.
- Найти концентрации фуллеренолов, полученных на основе C_{60} и C_{70} , с разным количеством гидроксильных групп, при которых антиоксидантная активность фуллеренолов будет максимальной.
- Определить у какого из фуллеренолов, полученного разными методами, достигается максимальная антиоксидантная активность.
- Сравнить антиоксидантную активность фуллеренолов, полученных на основе C_{60} и C_{70} .

Глава 1 ЛИТЕРАТУРНАЯ ЧАСТЬ

1.1 Фуллерены - история открытия

В конце двадцатого века одним из самых красивых открытий в науке стало обнаружение новой аллотропной формы углерода – фуллеренов. В 1985 году Г. Крото, Р. Керл и Р. Смолли впервые обнаружили в масс-спектрах паров графита вещества с молекулярной массой 720 и 840 и приписали им структуру сферических молекул, состоящих из 60 и 70 атомов углерода. Они предположили, что такая высокая стабильность объясняется структурой молекулы, имеющей совершенную симметрию футбольного мяча [5]. В итоге, словами Р. Смолли, «образ молекулы C₆₀ в виде футбольного мяча быстро сыграл роль волшебной палочки, приведшей к открытию нового мира нанометровых структур чистого углерода» [6]. В 1996 году Крото, Керл и Смолли была присуждена Нобелевская премия за открытие молекул C₆₀ и C₇₀, имеющих форму усеченного икосаэдра. Следует отметить, что теоретические предпосылки существования и стабильности таких молекул появились еще в начале 70-х годов прошлого столетия. Так, Е. Осаво предположил возможность существования полой, высокосимметричной молекулы C₆₀, имеющей форму усеченного икосаэдра, похожей на футбольный мяч, еще в 1971 году [7]. В 1973 г. российские ученые Д.А. Бочвар и Е.Г. Гальперн доказали стабильность молекулы C₆₀ квантово-химическими расчетами [8].

Другое важное открытие в области фуллеренов было сделано в 1990 г. В. Кречмером и Д. Хафманом в институте ядерной физики в г. Гейдельберге (Германия). Они предложили способ выделения фуллеренов из сажи, образующейся при осаждении паров углерода при возгонке графита в электрической дуге [9]. Именно после этой работы начались интенсивные исследования в области фуллеренов, так как они стали доступными в препаративных количествах.

К настоящему времени произошли большие изменения в процессах выделения и очистки фуллеренов, что позволило повысить выход конечных продуктов и ускорить их разделение [10,11].

1.1.1 Фуллерены – особенности свойств и строения

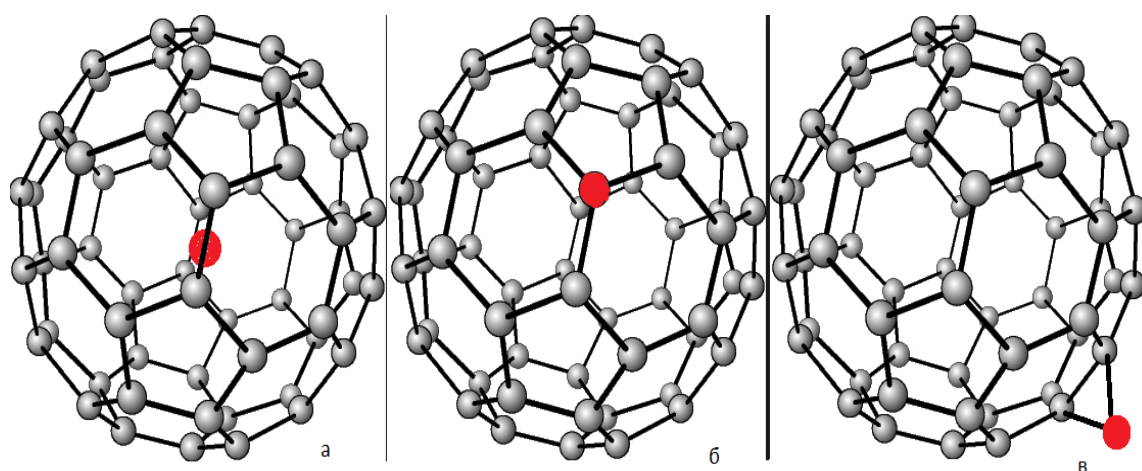
Фуллерены являются объёмными пустотелыми молекулами, они состоят из пятичленных и шестичленных углеродных колец. Пятиугольники в молекулах окружены шестиугольниками, подчиняясь «правилу изолированных пятиугольников». Так же, наряду с алмазом и графитом фуллерены являются ещё одной аллотропной формой углерода.

Основным представителем фуллеренов является молекула C_{60} , или, если её называть полным именем, бакминстерфуллерен (название дано в честь архитектора Фуллера, использовавшего для своих конструкций квазисферические полусферы, имеющие такую же структуру, как и фуллерены). Существуют так же высшие фуллерены, имеющие большее число атомов углерода: C_{70} , C_{72} , C_{74} , C_{76} , C_{78} , C_{80} и так далее с увеличением на два атома. Максимальное количество атомов в молекуле, зарегистрированной экспериментально, составляет 122.

Большое внимание в литературе уделено различным фуллереновым соединениям (рисунок 1), которые подразделяются на:

- Эндофуллерены (или внутрисферные) $M_m@C_n$ - молекулы фуллеренов, в которых m атомов других химических элементов (M) расположены внутри молекулы фуллерена C_n , где $m \geq 1$;
- Гетерофуллерены M_mC_{n-m} – молекулы фуллеренов, в которых m атомов углерода замещено на атомы других элементов;
- Экзофуллерены (или внешнесферные фуллерены) M_mC_n – молекулы фуллеренов, в которых m атомов других элементов присоединены к молекуле фуллерена снаружи.

Экзофуллерены, к которым присоединены только атомы металла, принято называть фуллеридами.



а) эндоэдральный фуллерен, б) гетерофуллерен, в) экзоэдральный фуллерен

Рисунок 1 – Модели молекул фуллерена

В литературе также можно встретить термины:

- Гидрофуллерен (или гидриды фуллеренов) – экзофуллерен с атомами водорода;
- Фуллерол (или фуллеренол, гидроксофуллерен) – экзофуллерен, содержащий ОН-группы;
- Фуллерит – фуллерен, находящийся в твёрдом состоянии.

На сегодняшний день количество элементов, с которыми получены различные фуллереновые соединения, составляет значительную часть таблицы Менделеева.

Наиболее хорошо изученными на сегодняшний день являются фуллерены C_{60} и C_{70} . Свойства высших фуллеренов в литературе освещены слабо, так как их исследование в индивидуальном виде усложняется ввиду высокой химической активности. Сродство к электрону у C_{60} составляет 2,65 эВ, потенциальная ионизация – 7,61 эВ, энергия связи на один атом углерода – 7 эВ, поляризуемость близка к 80 \AA^3 . Молекула может принимать до 12 электронов и отдавать один электрон, то есть заряд на C_{60} может меняться от

+1 до -12. При нагревании фуллерен легко переходит в газовую фазу без разрушения молекул. Фуллерены являются единственной растворимой формой углерода [12].

Фуллерены практически нерастворимы в воде, ацетоне, этаноле, тетрагидрофуране и других полярных растворителях, но в хлорбензоле, *o*-дихлорбензоле, бензоле и толуоле, хорошо растворяется с образованием окрашенных в красно-фиолетовый (C_{60}), тёмно-коричневый (C_{70}) цвет растворов [13]. Тот факт, что фуллерены гидрофобны, затрудняет изучение его физиологических и фармакологических свойств. Введение в молекулу фуллерена различного числа функциональных групп, в том числе гидрофильных, приводит к увеличению растворимости новых производных фуллерена в полярных растворителях, в том числе и в воде.

1.1.2 Области применения фуллеренов

Области применения фуллеренов весьма разнообразны. Это обусловлено тем, что строение фуллерена, внешне похожего на футбольный мяч, вбирает внутрь этого «мяча» все, что желательно туда поместить, от части генетического кода, витаминов, лекарственных препаратов до различных газов. Фуллерены обладают удивительной способностью встраиваться в поверхности клеточных мембран. Они не только являются уникальными антиоксидантами, но и такими же уникальными транспортерами самых различных веществ, что позволяет применять их в самых различных научных и практических областях. Физики с помощью фуллеренов создают солнечные батареи, материалы со сверхпроводимостью, химические лазеры и так далее. Медики и биологи применяют фуллерены как способ доставки в клетки различных препаратов, антибиотиков, гормонов и даже генов. Химические опыты с фуллеренами, работающими как катализаторы, а так же адсорбенты нового типа, так же показывают прекрасные результаты [14].

1.2 Гидроксированные фуллерены

Одними из наиболее перспективных водорастворимых производных фуллеренов с точки зрения применений в биомедицине являются фуллеренолы (полигидроксированные фуллерены). Модель фуллеренола представлена на рисунке 2.

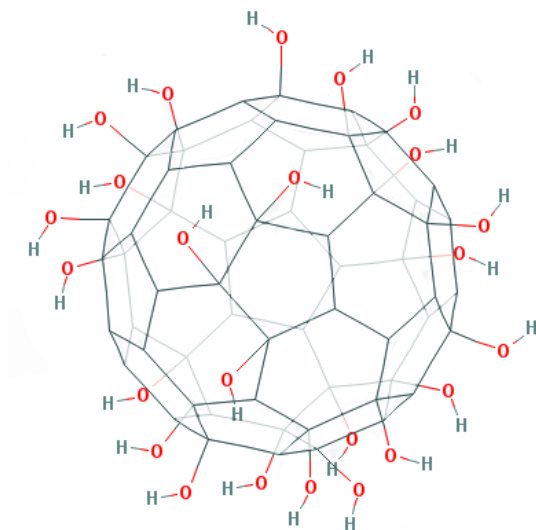


Рисунок 2 – Модель молекулы гидроксированного фуллерена

Важнейшим из фундаментальных свойств фуллеренолов является их антиоксидантная активность, они во много раз эффективнее широко используемых в медицине антиоксидантов, таких как витамины С и Е. Число ОН-групп, присоединенных к молекуле фуллерена, влияет на его растворимость в воде. В отличие от фуллеренов, фуллеренолы растворимы в воде, спирте, других полярных растворителях и частично в жирах, в частности, в оливковом и миндальном масле, что делает их более перспективными для применения в фармацевтических и косметических препаратах, чем фуллерены. Поэтому они могут быть использованы в кремах, мазях, гелях, шампунях. Фуллеренолы являются мощными противовирусными и антигрибковыми препаратами. Как «радикальные ловушки» они могут нейтрализовать одной молекулой более 20 свободных

радикалов. Они показали в 100 раз большую эффективность, чем все другие известные в настоящее время антиоксиданты. Предварительные тесты фуллеренолов на токсичность не выявили никаких отрицательных воздействий. Фуллеренол является мощным антиоксидантом и обладает сильным антивирусным действием. Поэтому применение косметики с фуллеренолом способствует эффективной борьбе со всеми признаками кожных инфекций, а также препятствует старению кожи, длительному глубокому увлажнению кожи и сохранению ее молодости. Необходимой для практического использования растворимостью обладают производные с 16 и более гидроксильными группами. Большинство методов, используемых для получения водорастворимых фуллеренолов, основаны на прямом взаимодействии фуллеренов со щелочью в присутствии катализатора, или на получении производных фуллеренов с последующей обработкой щелочью [15].

Самым многообещающим является применение полигидроксилированных фуллеренов в медицине. Фуллереновые производные с ОН группами предотвращают ишемию (отравление из-за недостатка кислорода), которая вызывается резким увеличением АФК при энергетическом истощении тканей [16]. В экспериментах *in vivo* было показано, что фуллеренолы $C_{60}(OH)_{24}$ обладают антипролиферативными свойствами (препятствуют размножению клеток) и, благодаря своей способности присоединять свободные радикалы, предотвращают цитотоксичные последствия применения доксорубина, используемого в химиотерапии рака [17].

Фуллеренолы интересуют исследователей не только как потенциальные лекарственные средства. Способностью $C_{60}(OH)_x$ присоединять свободные радикалы и образовывать гель при температурной обработке объяснялось уменьшение эффекта старения природного каучука при добавлении к нему фуллеренола в работе [18], наблюдался также сильный упрочняющий эффект.

Использование раствора фуллеренола (0,3 вес. %) в воде в качестве смазки значительно уменьшало период обкатки керамических деталей на основе Si_3N_4 и Al_2O_3 по сравнению с использованием только воды при той же скорости и нагрузке в работе [19]. Кроме того, при добавлении фуллеренола в воду был расширен диапазон скоростей, в пределах которого может быть достигнут низкий коэффициент трения.

Есть устоявшееся мнение, о том, что фуллеренолы это «полиспирты» - это незнание принципиальных отличий между фенолами и спиртами. Абсолютно не корректно, особенно для химиков, называть фуллеренолы «полиспиртами», как это встречается в литературе и Интернете, в частности, в статье [20]. Соединения, в молекулах которых гидроксильные группы связаны непосредственно с атомами углерода ароматического кольца, то есть не через алифатический мостик, называются фенолами. Та же мысль прослеживается в «Химической энциклопедии» в статье [21].

Ядром фуллеренола является фуллерен, и это не просто ароматическая молекула, а гиперароматическая молекула, и гидроксильные группы фуллеренола связаны, именно, с атомами углеродного ядра фуллерена. Поэтому фуллеренолы должны относиться к классу фенолов, а не к классу спиртов.

В той же «Химической энциклопедии» говорится, что спирты – это органические соединения, содержащие в молекуле одну или несколько гидроксильных групп ОН у насыщенных атомов углерода[22]. Это означает, что в случае ароматических спиртов, таких как бензиловый спирт, гидроксильные группы связаны с ядром через алифатический мостик, а не связаны с атомами углерода ядра напрямую. Если бы фуллеренол был «полиспиртом», то он бы имел структуру аналогичную бензиловому спирту, а не фенолу, то есть гидроксильные группы были бы присоединены через какой-нибудь алифатический мостик. В структуре фуллеренола каких-либо алифатических мостиков нет, поэтому его нужно относить к классу фенолов, а не к классу спиртов.

Химические свойства фуллеренолов из-за принадлежности их к классу фенолов (полифенолов) должны быть близки к химическим свойствам фенолов и полифенолов. Это открывает широкую перспективу для синтеза фуллеренольных аналогов многих соединений, в которых сейчас для их синтеза используются фенолы: лекарственных препаратов, смол, пластмасс, красителей (азокрасителей) и других. Такие новые соединения должны сочетать как свойства уже применяемых фенольных аналогов, так и свойства нанокластеров углерода[23].

1.3 Образование свободных радикалов в живом организме

В процессе жизнедеятельности любого организма в клетках и межклеточном пространстве происходит один из самых универсальных процессов – образование свободных радикалов. Они составляют особый класс химических веществ, различных по своему атомарному составу, но характеризующихся наличием в молекуле непарного электрона. Свободные радикалы – это вещества, являющиеся непременными спутниками кислорода и обладающие высокой химической активностью. Свободные радикалы представляют собой активные неустойчивые частицы, образующиеся в ходе процессов естественного метаболизма клеток. Их образованию способствуют многие процессы, сопровождающие жизнедеятельность организма: стрессы, экзогенные и эндогенные интоксикации, влияние техногенных загрязнений окружающей среды и излучения. Легкость образования свободных радикалов связана с уникальными свойствами молекул кислорода. В химических соединениях атомы кислорода двухвалентны. Однако в молекуле кислорода оба атома соединены только одинарной связью, а остающийся на каждом атоме кислорода один электрон свободен. И когда их валентности направлены в разные стороны, образуется очень опасный для биологических субстанций нестабильный токсичный кислород. Патологическое действие свободных

радикалов связано, прежде всего, с их влиянием на клеточные мембраны. Это приводит к тому, что начинается разрушительная цепная реакция, которая губительно действует на живые клетки. В результате организм начинает преждевременно стареть, начинаются патологические изменения, которые могут стать причиной рака, сердечно-сосудистых заболеваний, диабета, ослабления зрения, памяти. Ученые предполагают, что начальной стадией многих заболеваний – от простого кашля до онкозаболевания – является именно большое количество свободных радикалов в организме[24].

1.4 Антиоксиданты

Антиоксиданты -ингибиторы окисления, природные или синтетические вещества, способные замедлять окисление. Рассматриваются преимущественно в контексте окисления органических соединений. Антиоксиданты действуют так, чтобы прекратился процесс неуправляемых, цепных реакций образования свободных радикалов, процесс окисления липидов мембран клеток. Механизм действия наиболее распространенных антиоксидантов состоит в обрыве реакционных цепей: молекулы антиоксиданта взаимодействуют с активными радикалами с образованием малоактивных радикалов. Окисление замедляется также в присутствии веществ, разрушающих гидроперекиси. В этом случае падает скорость образования свободных радикалов. Даже в небольшом количестве (0,01-0,001 %) антиоксиданты уменьшают скорость окисления, поэтому в течение некоторого периода времени (период торможения, индукции) продукты окисления не обнаруживаются. Наиболее известные антиоксиданты: аскорбиновая кислота (витамин С), токоферол (витамин Е), β-каротин (провитамин А) и ликопин (в томатах). К ним также относят полифенолы: флавин и флавоноиды (часто встречаются в овощах), танины (в какао, кофе, чае), антоцианы (в красных ягодах) [25].

Среди антиоксидантов, известных к настоящему моменту, фуллерены, точнее, их водные растворы являются самыми мощными, хотя механизмы их действия принципиально иные, чем у обычных антиоксидантов. Они действуют даже в сверхмалых дозах, а их действие даже после однократного приема длится месяцами. Фуллерены качественно превосходят все другие антиоксиданты по силе и продолжительности действия. У них другой механизм действия. Если классические антиоксиданты это восстановители, которые расходуются в ходе реакции, то фуллерены это катализаторы рекомбинации, взаимоуничтожения свободных радикалов и не расходуются вовсе. По своему действию фуллерены аналогичны витаминам, С 60 можно смело назвать "витаминной формой углерода".

Так, фуллерены как антиоксиданты в сотни и тысячи раз эффективнее, чем те же витамины С и Е. Молекула обычного антиоксиданта средство одноразовое. Встретив свободный радикал, она гибнет, модифицируется, образуя с ним безвредное соединение. На нейтрализацию одного радикала идет одна молекула антиоксиданта. А молекула фуллерена действует по-другому. Свободные радикалы могут не только атаковать соседние биомолекулы, но и соединиться друг с другом рекомбинировать, образовав безвредный продукт. Но для этого они должны встретиться, что при низких концентрациях маловероятно. А фуллереновый шарик имеет свойство собирать на своей поверхности свободные радикалы, которые довольно прочно "прилипают" к нему, встречаясь на его поверхности, и рекомбинируют, соединяясь друг с другом, а фуллерен остается сам собой. "Святая" друг с другом свободные радикалы, фуллерен ускоряет их рекомбинацию в сотни и тысячи раз.

Таким образом, фуллерен работает точно так же, как каталитический нейтрализатор выхлопных газов на автомобиле, он "дожигает" на своей поверхности свободные радикалы, не меняясь сам, и тем самым очищает внутреннюю среду организма.

Поэтому даже микродозы фуллерена сотые и тысячные доли процента действуют так же эффективно, как в десятки раз большие дозы других антиоксидантов. И после однократного введения фуллеренов в организм их действие длится неделями и месяцами [26].

Глава 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Приборы и реактивы

- Хроматограф Agilent 1200-Series;
- Синтезированная смесь фуллеренов;
- Толуол о.с.ч;
- Коническая колба (250-500 мл);
- Роторный испаритель;
- Чашка Петри;
- Цилиндр (50, 100 мл);
- Стакан низкий лабораторный Н-1-250 из стекла с делениями;
- Стакан высокий лабораторный В-1-100 из стекла с делениями;
- Весы аналитические «ВЛР 200»;
- Химические пробирки П-1-16-150;
- Бюкс высокий СВ-24/10 30x50 ХС;
- Пипетка (1, 5 мл);
- Баня водяная;
- Дистиллированная вода;
- Олеум х.ч;
- Перекись водорода 30%;
- Азотная кислота о.с.ч;
- Карбонат натрия о.с.ч;
- Гидрокарбонат натрия о.с.ч;
- Спектрофотометр «UVIKON-943»;
- Кюветы с толщиной поглощающего слоя 10 мм;
- Секундомер электронный JS-307;
- Аптечный адреналина гидрохлорид (0,1%);

2.2 Методики экспериментов

2.2.1 Выделение фуллеренов

Выделение индивидуальных фуллеренов C_{60} и C_{70} из синтезированной смеси фуллеренов проводили с помощью хроматографа Agilent 1200-Series, оснащенного колонкой COSMOSIL Buckyprep. В качестве растворителя использовался толуол. Фуллереновая смесь была получена методом электродугового распыления графита в лаборатории АМИВ ИФ СО РАН. Исходная фуллереновая смесь содержала 60% C_{60} , 20% C_{70} и 10% высших фуллеренов. Содержание C_{60} и C_{70} составило по 99%.

2.2.2 Синтез гидроксированных фуллеренов

После получения индивидуальных C_{60} и C_{70} , растворы были подвержены испарению, с целью их концентрирования, а затем полностью высушены. Были получены порошки чёрного цвета C_{60} и C_{70} . Затем были получены гидроксированные фуллерены тремя разными методами по методикам, предложенным в статье [27].

2.2.2.1 Синтез фуллеренолов с наименьшим количеством гидроксильных групп

Гидроксирование фуллеренов проводили обработкой с использованием смеси олеума и азотной кислоты и последующим гидролизом водой промежуточных соединений. Полученные фуллереновые смеси растворяли в смеси олеума и азотной кислоты. Растворение происходило быстро, затем испаряли и полученные порошки растворяли в воде, раствор фильтровали и выпаривали, повторяли эту процедуру 4 раза. Получили аморфные порошки коричневого цвета хорошо растворимые в

воде с гидроксильными группами в среднем 16 штук для $C_{60}OH$ и 20 штук для $C_{70}OH$. Схема синтеза на примере фуллеренола $C_{60}OH_{16}$ представлена на рисунке 3.

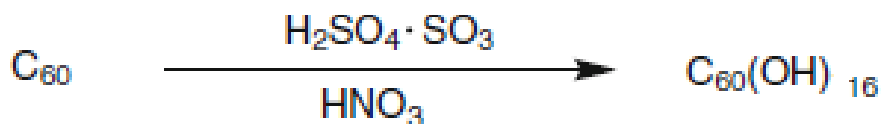


Рисунок 3 - Схема синтеза фуллеренола $C_{60}OH_{16}$

2.2.2.2 Синтез фуллеренолов со средним количеством гидроксильных групп

Гидроксילирование фуллеренов проводили обработкой с использованием азотной кислоты и последующим гидролизом водой промежуточных соединений. Полученные фуллереновые смеси кипятили в концентрированной азотной кислоте при температуре приблизительно 120°C в течение шести часов. Растворимую в кислоте фракцию отбирали декантацией и выпаривали. Полученные порошки растворяли в воде, раствор фильтровали и выпаривали, повторяли эту процедуру 4 раза. Получили аморфные порошки коричневого цвета хорошо растворимые в воде с гидроксильными группами в среднем 24 штуки для $C_{60}OH$ и 28 штук для $C_{70}OH$. Схема синтеза на примере фуллеренола $C_{60}OH_{24}$ представлена на рисунке 4.

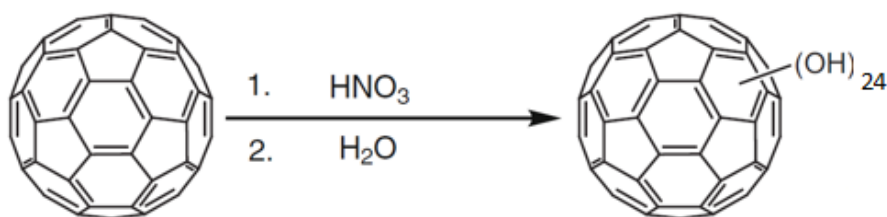


Рисунок 4 - Схема синтеза фуллеренола $C_{60}OH_{24}$

2.2.2.3 Синтез фуллеренолов с максимальным количеством гидроксильных групп

Гидрокселирование фуллеренов проводили обработкой с использованием олеума, пероксида водорода и последующим гидролизом водой промежуточных соединений. Полученные фуллереновые смеси растворяли в олеуме, наблюдали раствор зелёного цвета. Растворение происходило быстро. Затем отмывали водой, центрифугировали и повторяли эту процедуру 4 раза. После полученную смесь кипятили в перексиде водорода в течение 3 дней. Полученные порошки растворяли в воде, раствор фильтровали и выпаривали, повторяли эту процедуру 4 раза. Получили аморфные порошки коричневого цвета хорошо растворимые в воде с гидроксильными группами в среднем 36 штук для $C_{60}OH$ и 40 штук для $C_{70}OH$. Схема синтеза на примере фуллеренола $C_{60}OH_{36}$ представлена на рисунке 5.

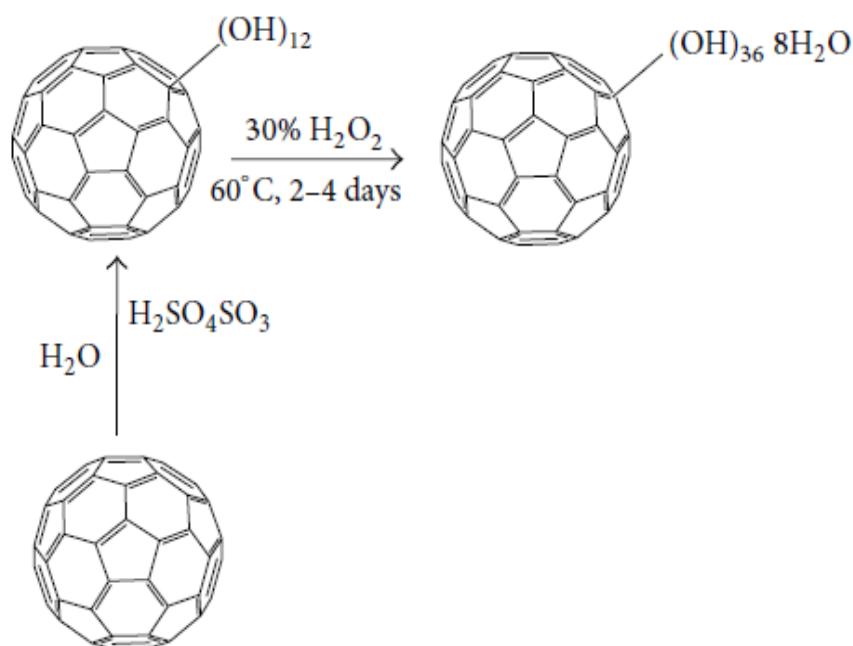


Рисунок 5 – Схема синтеза фуллеренола $C_{60}OH_{36}$

2.2.3 Метод определения антиоксидантной активности

Об антиоксидантной активности гидроксилированных фуллеренов судили по их способности ингибировать аутоокисление адреналина и тем самым предотвращать активных форм кислорода.

Для этого к 4 мл 0,2 М натрий-карбонатного буфера рН=10,65 добавляли 0,2 мл 0,1% аптечного раствора адреналина гидрохлорида, тщательно и быстро перемешивали, помещали в спектрофотометр и определяли оптическую плотность через 30 секунд в течение пятнадцати минут при длине волны 347 нм в кювете толщиной 10 мм. Далее к 4 мл 0,2 М натрий-карбонатного буфера рН=10,65 добавляли 0,1 мл исследуемого раствора и 0,2 мл 0,1% аптечного раствора адреналина гидрохлорида, перемешивали и измеряли оптическую плотность через 30 секунд в течение пятнадцати минут при длине волны 347 нм в кювете толщиной 10 мм.

Антиоксидантную активность (АА) исследуемых фракций выражали в процентах ингибирования аутоокисления адреналина и вычисляли по формуле

$$AA = \frac{(D_1 - D_2) \cdot 100}{D_1}, \quad (1)$$

Где D_1 – оптическая плотность адреналина, D_2 - оптическая плотность исследуемой фракции. Значение АА более 10% свидетельствует о наличии антиоксидантной активности [28].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Были выделены индивидуальные фуллерены C_{60} (99%) и C_{70} (99%) и получены на их основе фуллеренолы, содержащие разное количество гидроксильных групп: $C_{60}OH_{16}$ ($C_{70}OH_{20}$), $C_{60}OH_{24}$ ($C_{70}OH_{28}$), $C_{60}OH_{36}$ ($C_{70}OH_{40}$).

Хроматограммы полученных фуллеренов представлены на рисунках 6 и 7.

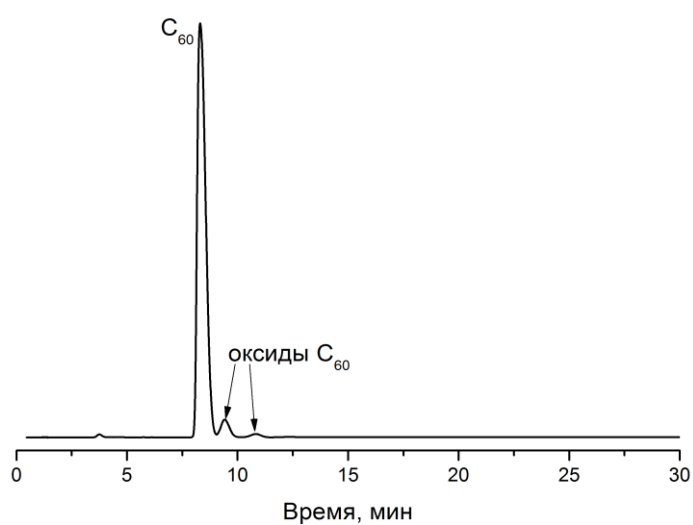


Рисунок 6 - Хроматограмма фуллерена C_{60}

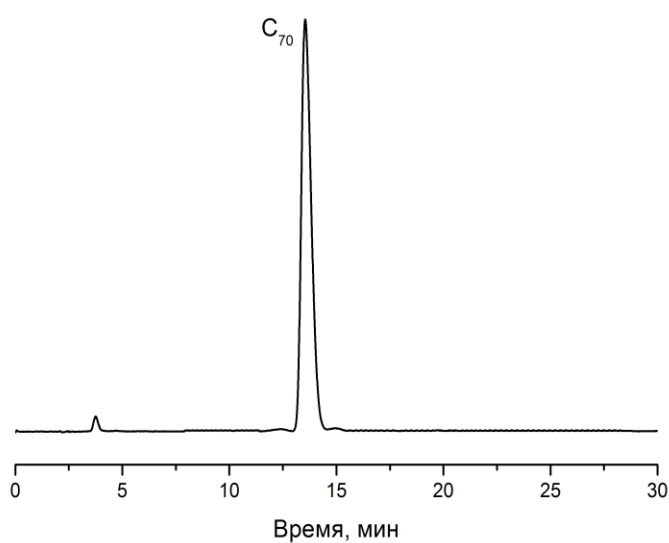


Рисунок 7 - Хроматограмма фуллерена C_{70}

Методом ИК-спектроскопии было установлено, что характеристические пики соответствуют литературным данным для фуллеренола $C_{60}OH_{24}$. Спектры предоставлены на рисунке 8.

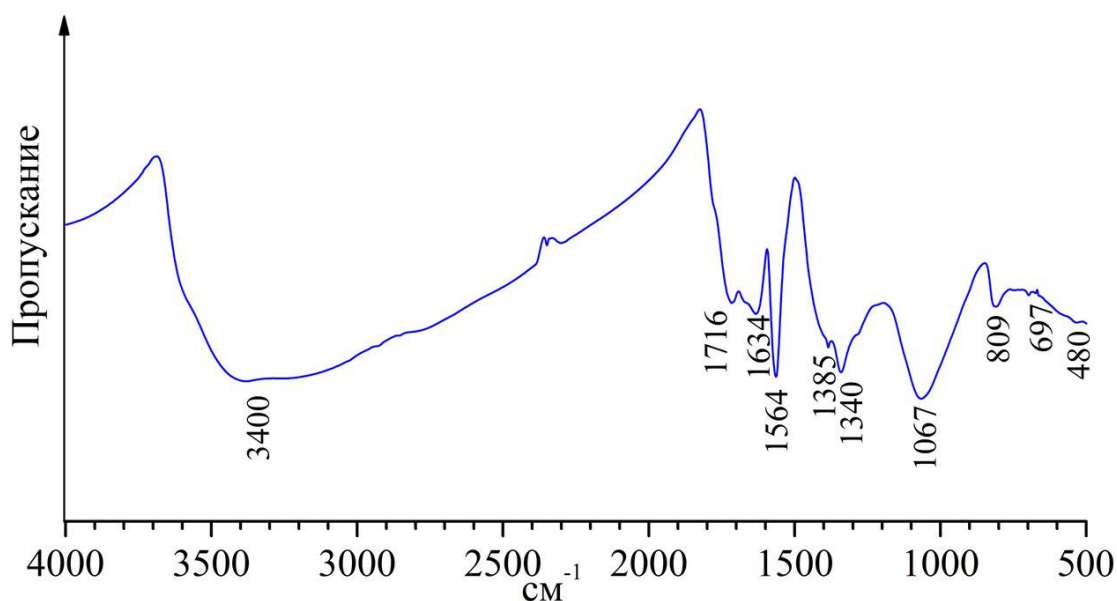


Рисунок 8 – ИК-спектр для фуллеренола $C_{60}OH_{24}$

Из данного спектра, представленного на рисунке 8 следует, что пик при длине волны равной 3400 см^{-1} соответствует связи О-Н, пик при длине волны равной 1067 см^{-1} соответствует связи С-О, а пик при длине волны равной 1564 см^{-1} соответствует связи С-С. ИК-спектры других фуллеренолов идентичны представленному.

С помощью ФЭС разложили экспериментальную линию C_{1s} , что позволило выделить 3 компоненты. Аналогично анализу спектра фуллеренола в работе [29] пик, соответствующий энергии связи электрона $284,7\text{ эВ}$ с учетом компенсации заряда, мы отнесли к связи углерода в фуллерене C_{60} , пик с энергией связи $286,6\text{ эВ}$ – к углероду в степени окисления +1 (гидроксильированный углерод С-ОН), пик при $288,5\text{ эВ}$ – углероду в степени окисления +2 (полуацеталь RO-C-OH или карбонил С=O). Анализ образца был проведен на фотоэлектронном спектрометре SPECS (SPECS GmbH, Германия). Спектр предоставлен на рисунке 9.

Фотоэлектронные спектры других фуллеренолов идентичны представленному.

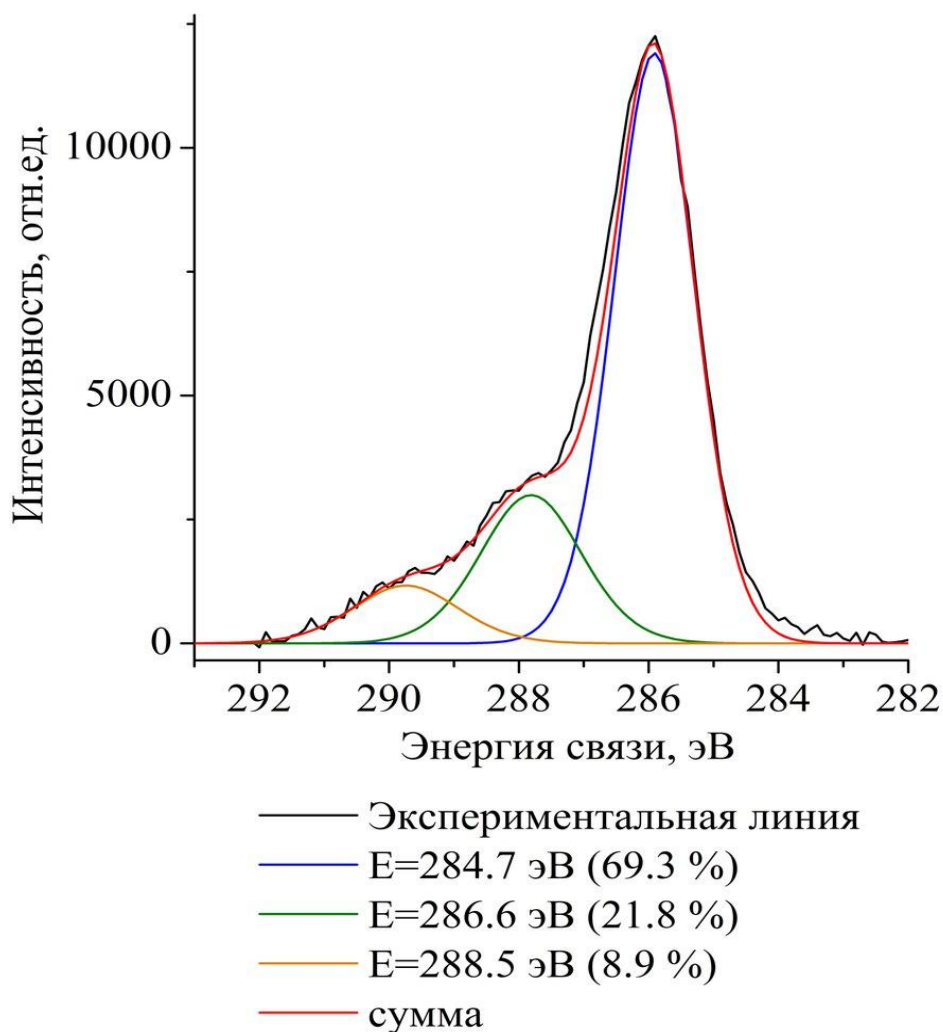
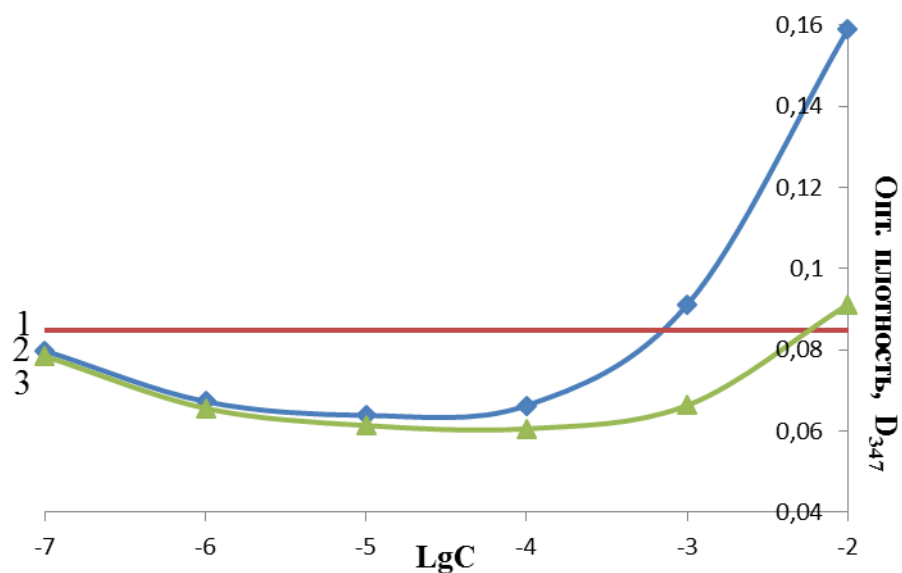


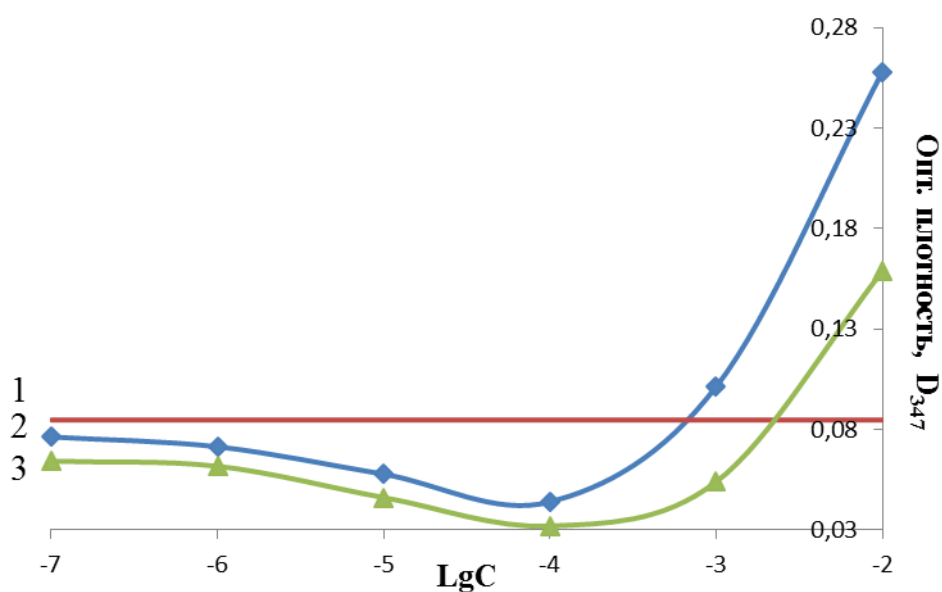
Рисунок 9 – Фотоэлектронный спектр для фуллеренола $C_{60}OH_{24}$

Так же были построены графики зависимости оптической плотности раствора адреналина с фуллеренолом от концентрации введенного фуллеренола. Данные оптических плотностей взяты при 14,5 минутах. Графики зависимости представлены на рисунках 10, 11, 12.



1 – адреналин, 2 – адреналин + C₆₀OH₁₆, 3 – адреналин + C₇₀OH₂₀

Рисунок 10 - Зависимость оптической плотности раствора адреналина с фуллеренолом от концентрации введенного фуллеренола

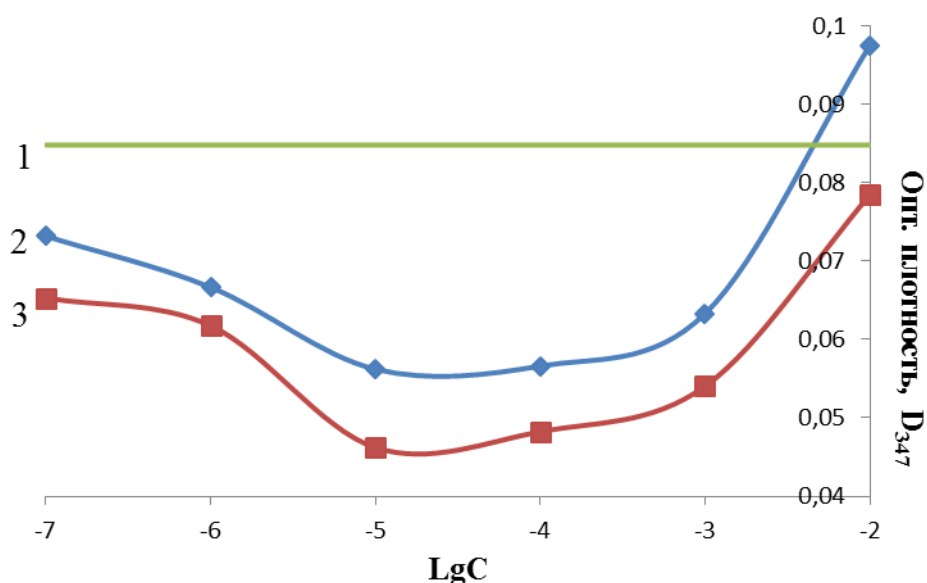


1 – адреналин, 2 – адреналин + C₆₀OH₂₄, 3 – адреналин + C₇₀OH₂₈

Рисунок 11 – Зависимость оптической плотности раствора адреналина с фуллеренолом от концентрации введенного фуллеренола

Из данных графиков представленных на рисунках 10, 11, 12 следует, что при максимальных концентрациях фуллеренола антиоксидантная

активность фуллеренола становится прооксидантной, то есть при данных концентрациях скорость аутоокисления адреналина увеличивается.

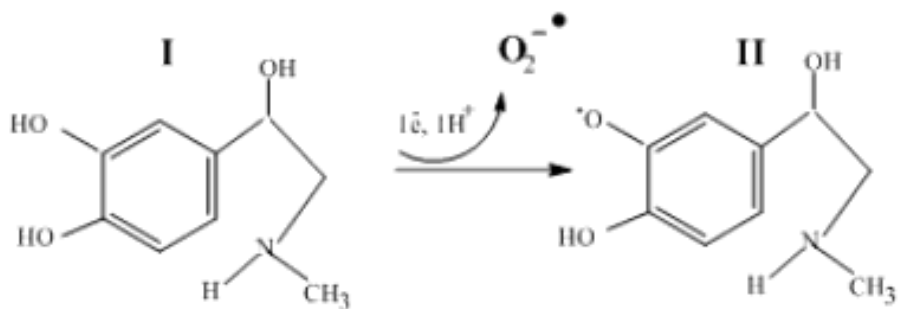


1 – адреналин, 2 – адреналин + C₆₀ОН₃₆, 3 – адреналин + C₇₀ОН₄₀

Рисунок 12 - Зависимость оптической плотности раствора адреналина с фуллеренолом от концентрации введенного фуллеренола

Так же из данных графиков представленных на рисунках 10, 11, 12 было определено, что максимальная антиоксидантная активность достигается при концентрации 0,0001 мг/мл для C₆₀ОН₁₆ (C₇₀ОН₂₀), C₆₀ОН₂₄ (C₇₀ОН₂₈), и при концентрации 0,00001 мг/мл для C₆₀ОН₃₆ (C₇₀ОН₄₀).

Механизм образования оксид-радикала в процессе аутоокисления адреналина по хиноидному пути представлен на рисунке 13. Механизмы антиоксидантного и прооксидантного действия фуллеренола представлены на рисунках 14, 15. Механизм предложен в статье [27].



I – Адреналин, II – адреналинсемихинон

Рисунок 13 - Механизм образования оксид-радикала

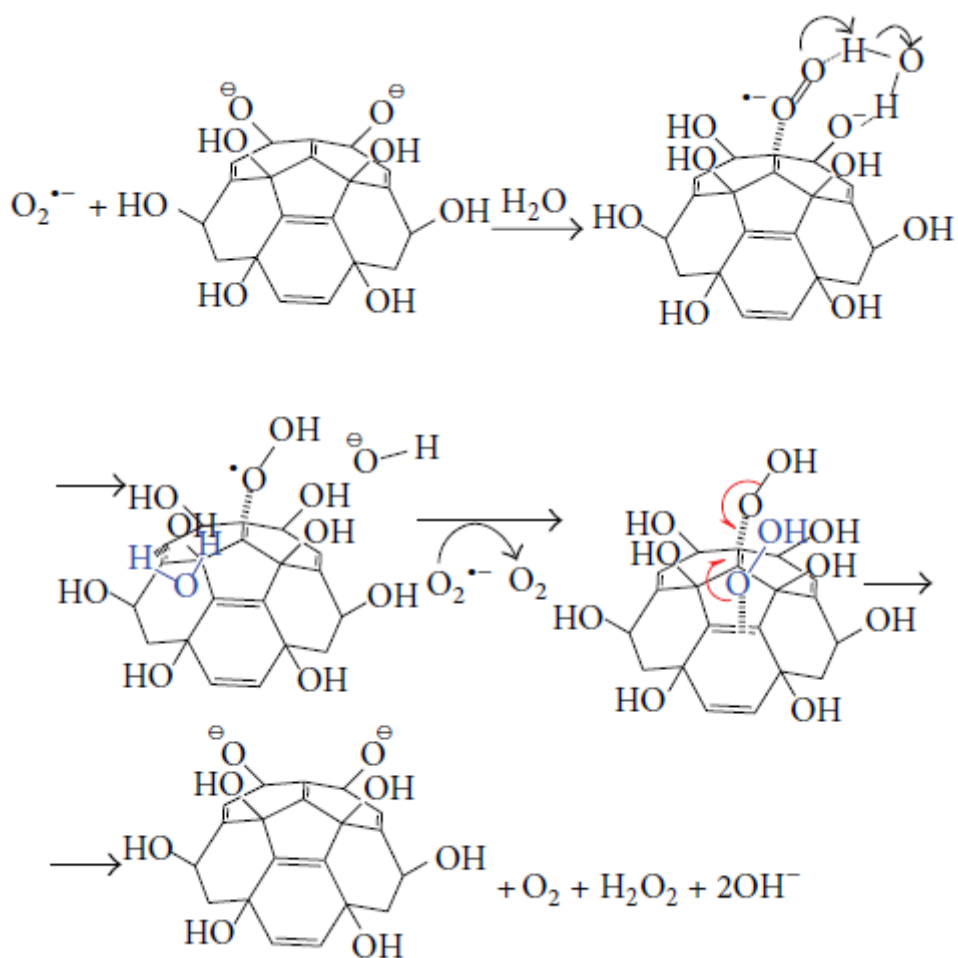


Рисунок 14 – Механизм антиоксидантного действия фуллеренола

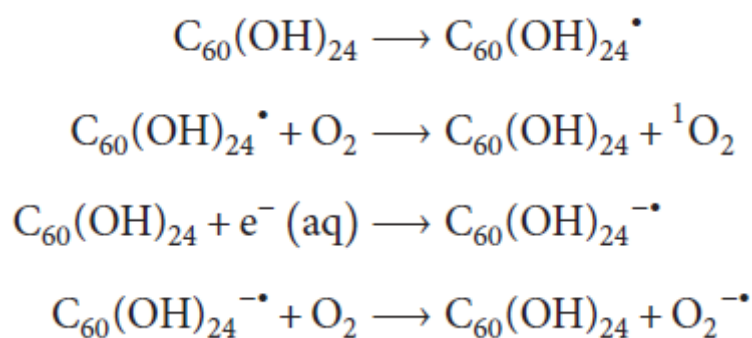


Рисунок 15 - Механизм проокислительного действия фуллеренола

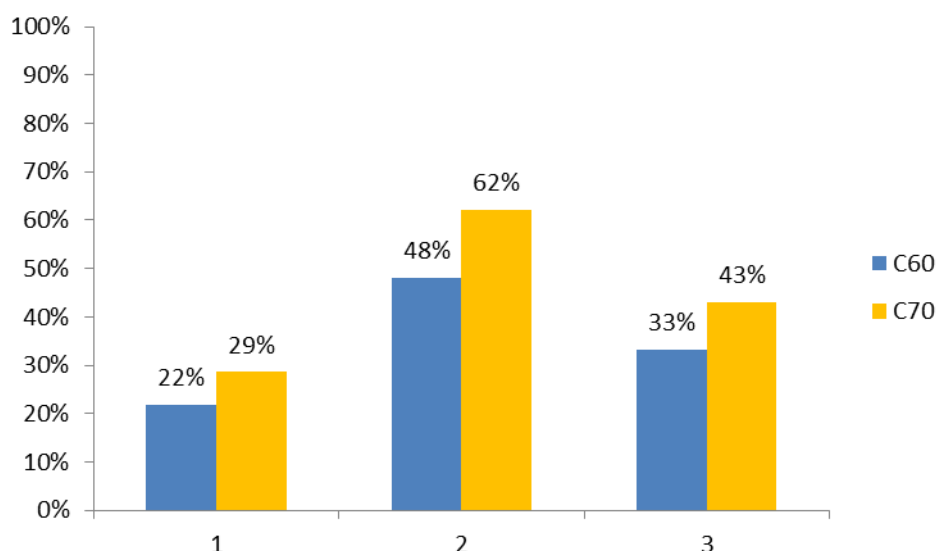
Затем были рассчитаны антиоксидантные активности гидроксильных фуллеренов по формуле (1) для фуллеренолов с концентрацией, обладающими максимальными антиоксидантными свойствами, и построен график зависимости антиоксидантной активности фуллеренолов от количества гидроксильных групп. Данные оптических плотностей взяты при 14,5 минутах. График зависимости представлен на рисунке 16.

Расчет антиоксидантной активности предоставлен в таблице 1.

Таблица 1 – Расчёт антиоксидантной активности

Количество групп	Оптическая плотность при 14,5 минутах		Антиоксидантная активность, %	
	C ₆₀ ОН	C ₇₀ ОН	C ₆₀ ОН	C ₇₀ ОН
Минимальное число ОН-групп	0,0663	0,0600	22	29
Среднее число ОН-групп	0,0440	0,0320	48	62
Максимальное число ОН-групп	0,0567	0,0482	33	43

Оптическая плотность адриналина = 0,0848.



1 – $C_{60}OH_{16}$ ($C_{70}OH_{20}$), 2 – $C_{60}OH_{24}$ ($C_{70}OH_{28}$), 3 – $C_{60}OH_{36}$ ($C_{70}OH_{40}$)

Рисунок 16 – Зависимость антиоксидантной активности фуллеренолов от количества гидроксильных групп

В результате сравнения антиоксидантной активности фуллеренолов полученных по трём разным методикам, максимальной антиоксидантной активностью обладают фуллеренолы, которые были получены методом обработки фуллеренов азотной кислотой, с последующим гидролизом водой, содержащие в среднем 24 группы для $C_{60}OH$ и 28 групп для $C_{70}OH$. Из графика, предоставленного на рисунке 16, следует, что антиоксидантная активность фуллеренолов, полученных на основе C_{70} , более высокая, чем антиоксидантная активность фуллеренолов, полученных на основе C_{60} .

ВЫВОДЫ

- 1 В данной работе была определена зависимость антиоксидантных свойств фуллеренолов, полученных на основе C_{60} и C_{70} , от количества гидроксильных групп.
- 2 Были выделены индивидуальные фуллерены C_{60} (99%) и C_{70} (99%) и получены на их основе фуллеренолы, содержащие разное количество гидроксильных групп: $C_{60}OH_{16}$ ($C_{70}OH_{20}$), $C_{60}OH_{24}$ ($C_{70}OH_{28}$), $C_{60}OH_{36}$ ($C_{70}OH_{40}$).
- 3 Методом ИК-спектроскопии было установлено, что характеристические пики соответствуют литературным данным для фуллеренола $C_{60}OH_{24}$.
- 4 При максимальных концентрациях фуллеренола антиоксидантная активность фуллеренола становится прооксидантной, то есть при данных концентрациях скорость аутоокисления адреналина увеличивается.
- 5 Показано, что максимальная антиоксидантная активность достигается при концентрации 0,0001 мг/мл для $C_{60}OH_{16}$ ($C_{70}OH_{20}$), $C_{60}OH_{24}$ ($C_{70}OH_{28}$), и при концентрации 0,00001 мг/мл для $C_{60}OH_{36}$ ($C_{70}OH_{40}$).
- 6 В результате сравнения антиоксидантной активности фуллеренолов полученных по трём разным методикам, максимальной антиоксидантной активностью обладают фуллеренолы, которые были получены методом обработки фуллеренов азотной кислотой, с последующим гидролизом водой, содержащие в среднем 24 группы для $C_{60}OH$ и 28 групп для $C_{70}OH$.
- 7 Показано, что антиоксидантная активность фуллеренолов, полученных на основе C_{70} , более высокая, чем антиоксидантная активность фуллеренолов, полученных на основе C_{60} .

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Эмануэль, Н.М. Свободные радикалы в биологии. Часть 1/ Н.М. Эмануэль. - М.: Мир, 1979. – 308 с.
2. Kehrер, J. Free Radicals as Mediators of Tissue Injury and Disease/ J. Kehrер// Critical Reviews in Toxicology. - 1993. - V.23. - P. 21-48.
3. Acworth I.N. Reactive oxygen species/ I.N. Acworth, B. Bailey// The Handbook of Oxidative Metabolism. - 1995. –V12. - P. 1 - 4.
4. Юровская, М.А. Фуллерены/ М.Н. Юровская, Л.Н. Сидоров, А. Я. Борщевский. - М.: Экзамен, 2005. – 688 с.
5. Kroto, H.W. C₆₀: buckminsterfullerene/ H.W. Kroto, J. R. Heath, S.C. O'Brien, R. F. Curl, R. E. Smalley, 1985. – V.318. - P. 162 –165.
6. Смоли, Р. Е. Открывая фуллерены/ Р. Е. Смоли // Усп. физических наук. – 1998. – №3. – С. 323 – 330.
7. Yoshida, Z. Aromaticity / Z. Yoshida, E. Osawa // Chemical Monograph. – 1971. - Series 22. – P. 174–178.
8. Бочвар, Д.А. О гипотетических системах: карбододекаэдре, s-икосаэдре и карбон-икосаэдре/ Д.А. Бочвар, Е.Г. Гальперн // Докл. АН СССР. – 1973. – V. 209. – P. 610 – 612.
9. Erokin, M. Yu. Synthesis and biological activity of fullereneols with various contents of hydroxyl groups/ E. Yu., Melenevskaya, K. V. Nasonova, T. S. Bryazhnikova, E. M. Erokina, D. M. Danilenko, O. I. Kiselev// Pharmaceutical Chemistry Journal. - 2014. - Vol. 47(2). - P. 87-91.
11. Meier, M. S. Efficient preparative separation of C₆₀ and C₇₀. Gel permeation chromatography of fullerenes using 100% toluene as mobile phase / M.S. Meier, V. P. Selegue // J.Org.Chem. – 1992. – V. 57. – P. 1924 – 1926.
12. Чурилов, Г.Н. Фуллерены: Синтез и теория образования/ Г.Н Чурилов, Н.В. Булина, А.С. Фёдоров. - Новосибирск: СО РАН, 2007. – 230 с.
13. Дикий, В.В. Термодинамические свойства фуллеренов C₆₀ и C₇₀ / В.В. Дикий, Г.Я. Кабо // Успехи химии. – 2000. – Т. 69, №2 – С. 107 – 117.

14. Области применения фуллеренов. – URL: <http://svetla.com/ru/o-vode/o-fulerenah/>(дата обращения 06.02.16).
15. Пиотровский, Л. Б. Фуллерены в биологии / Л. Б. Пиотровский, О. И. Киселев. - СПб.:Росток, 2006. - 336 с.
16. Chen, Y. W. Fullerene derivatives protect against oxidative stress in RAW 264.7 cells and ischemia-reperfused lungs / Y. W. Chen, K. C. Hwang, C. C. Yen, Y. L. Lai // Am. J Physiol. – 2004. – V. 287. – P. R21-R26.
17. Torres, V.M. Fulleranol C₆₀(OH)₂₄ prevents doxorubicin-induced acute cardiotoxicity in rats / V.M. Torres, B. Srdjenovic, V. Jacevic // Pharmacol Rep. – 2010. – V. 62, №4. – P. 707-718.
18. Kondo, H. Reinforcement and Antioxidation Effects of Fulleranol-Containing Natural Rubber / H. Kondo, Y. Ohtake // Journal of Applied Polymer Science. – 2014– V.118. – P. 3625–3631.
19. Liu, Y.H. Modification on the tribological properties of ceramics lubricated by water using fulleranol as a lubricating additive / Y.H. Liu, X.K. Wang, P.X. Liu // Science China Technological Sciences. 2014. – V.55, №9. – P. 2656–2661.
20. Семенов, К. Н. Фуллеренеол C₇₀: синтез, идентификация, политермическая растворимость и плотность водных растворов/ К. Н. Семенов, Н. А. Чарыков, А. Е. Пронских, В. А. Кескинов, 2015. - С. 146–156.
21. Химик/ Фенолы. – URL: <http://www.xumuk.ru/encyklopedia/2/4739.html> (Дата обращения 16.04.16)
22. Химик/ Спирты. – URL: <http://www.xumuk.ru/encyklopedia/2/4176.html> (Дата обращения 16.04.16)
23. Witte, P. Water solubility, antioxidant activity and cytochrome C binding of four families of exohedral adducts of C(60) and C(70) / P. Witte, F. Beuerle, U. Hartnagel, R. Lebovitz, A. Savouchkina, S. Sali, D. Guldi, N. Chronakis, Hirsch A // Org. Biomol. Chem. – 2007. – V. 5. – P. 3599–3613
24. Гильмутдинова, А.А. Синтез и свойства новых функциональнозамещенных производных фуллерена C₆₀, содержащих

- диоксолановый и полиольный фрагменты / А.А. Гильмутдинова, В.П. Губская, Г.М. Фазлеева, И.А.Нуретдинов // Минск. – 2014. – С. 291 – 296
25. Википедия/ Антиоксиданты. - URL: <https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%BD%D1%82%D0%B8%D0%BE%D0%BA%D1%81%D0%B8%D0%B4%D0%B0%D0%BD%D1%82%D1%8B> (дата обращения 20.05.2016).
26. Орлов, А. Д. Шунгит - Камень чистой воды/ А.Д Орлов. - СПб.: Диля, 2004. — 50 с.
27. Wang, Z. Syntheses, structures and antioxidant activities of fullerenols: knowledge learned at the atomistic level/ Z. Wang, S. Wang, Z. Lu, X. Gao// J Clust Sci. – 2014. - №3. – P.107 – 114.
28. Рябина, Е.И. Влияние ферментации и изменения кислотности среды на состав и антиоксидантную активность водных экстрактов чая/ Е.И. Рябина, Е.Е. Зотова, Н.И. Пономарёва, О.А. Мезенцева, М.А. Булгакова// Химия растительного сырья. – 2014. - №2. – С.169-175.
29. Vilen, V. Spectroscopic and Photophysical Properties of a Highly Derivatized C60 Fullerol/ V. Vilen, P. R. Marcoux, M. Lekka // Adv. Funct. Mater. – 2006. – V.16. – P. 120 – 128.

SUMMARY

The purpose of this work is comparative study of the antioxidant activity of fullerenols with different number of hydroxyl-groups by inhibition of the adrenaline autoxidation.

Conclusions were drawn:

- Antioxidant activities fullerenolos becomes pro-oxidantic activities with increase in concentration fullerenolos.
- Concentration was found at which antioxidant activities fullerenolos reaches a maximum. For $C_{60}OH_{16}$ ($C_{70}OH_{20}$) и $C_{60}OH_{24}$ ($C_{70}OH_{28}$) it is equal 0,0001mg/ml, for $C_{60}OH_{36}$ ($C_{70}OH_{40}$) – 0,00001mg/ml.
- Maximal Antioxidant activities reaches at the fullerenolos, which have got a middle number of groups, such as $C_{60}OH_{24}$ ($C_{70}OH_{28}$).