

УДК 543.426; 577.169

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ МЕТОДОМ АКТИВИРОВАННОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ 2,2'-АЗО-БИС(2-АМИДИНОПРОПАНА)

А.В. Алексеев, Е.В. Проскурнина, Ю.А. Владимиров

(кафедра медицинской биофизики, факультет фундаментальной медицины,
e-mail: proskurnina@gmail.com)

В качестве хемилюминесцентной системы для определения антиоксидантов предложена система на основе генератора свободных радикалов 2,2'-азо-бис(2-амидинопропана) (АБАП), активатора хемилюминесценции люминола в фосфатном буферном растворе (рН 7,4). Оптимизированы условия протекания хемилюминесцентной реакции. Разработана методика хемилюминесцентного определения с пределами обнаружения (мкмоль/л): 0,05 (тролокс), 0,20 (аскорбат), 0,03 (кверцетин); 0,03 (дигидрокверцетин). Проведено определение антиоксидантов в пищевом продукте.

Ключевые слова: антиоксиданты, активированная хемилюминесценция, 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан) (АБАП).

Интерес к свободным радикалам обусловлен тем, что они являются участниками важнейших физиологических процессов в живых организмах, процесса старения организма, а также различных патологических процессов при многих заболеваниях. Вещества, способные переводить свободные радикалы в неактивную форму, называются антиоксидантами, и знание их активности чрезвычайно важно для медицинской науки и практики [1–8].

Описано большое число методик определения антиоксидантной активности веществ. Однако результаты таких методик напрямую зависят от способа определения и выражения антиоксидантной активности.

Так, в работах [9–10] спектрофотометрически измеряли изменение оптической плотности растворов, содержащих специфические окрашенные свободные радикалы (катион-радикал АВТС (2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) и радикал DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил)), к которым добавляли антиоксиданты. Таким образом, определяли способность антиоксиданта к взаимодействию с радикалами АВТС и DPPH.

Электрохимическая методика, описанная в работе [11], основана на способности антиоксидантов участвовать в электрохимических реакциях в качестве восстановителя. По существу, она позволяет оценить восстановительный потенциал исследуемого антиоксиданта, равно как и любого другого соединения, присутствующего в среде.

Распространенный метод ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*) – поглощающая способность

кислородных радикалов) [12] основан на способности антиоксидантов перехватывать пероксильные радикалы, образующиеся при термическом разложении органических азосоединений, и измерении уменьшения флуоресценции β -фитоэритрина (β -PE) (длины волн возбуждения и эмиссии 540 и 565 нм соответственно). Существуют и другие разновидности данной методики [13].

Наибольшей чувствительностью обладают методики, основанные на хемилюминесценции. В части этих методик используются хемилюминесцентные реакции с участием пероксида водорода с пероксидазой из корней хрена [14] и с железом (II) [15], но так как пероксид водорода не стабилен и разлагается на воздухе, наибольшее распространение получили методики, основанные на хемилюминесцентной реакции между люминолом и 2,2'-азо-бис(2-амидинопропаном) (АБАП), разлагающимся при нагревании на два свободных радикала [16]. При этом интенсивность хемилюминесценции является мерой количества радикалов. При введении в систему антиоксидантов количество радикалов уменьшается, а вместе с этим падает и интенсивность хемилюминесценции. Существует несколько вариантов этой методики, позволяющих различными способами определять количество антиоксиданта [17–20], однако все они разработаны для щелочных сред (рН 8–10), что непригодно для анализа таких биологических объектов, как сыворотка крови.

При хемилюминесцентном определении антиоксидантов используют параметры TRAP (*total reactive*

antioxidant potential – общая потенциальная активность антиоксиданта) и метод TAR (*total antioxidant reactivity* – общая антиоксидантная активность) [9, 19–20]. Считается, что TRAP отражает количество антиоксиданта в системе, а TAR – его активность, т.е. скорость взаимодействия антиоксиданта с радикалами. Оба этих подхода были применены для анализа биологических объектов (сыворотка крови) и пищевых продуктов, когда не известны антиоксиданты, входящие в состав данных объектов, их концентрация и активность каждого из них. TRAP основан на измерении латентного периода (периода времени, в течение которого не наблюдается свечения хемилюминесценции), возникающего в результате добавления антиоксиданта, а в основе TAR лежит измерение снижения интенсивности хемилюминесценции при добавлении исследуемого антиоксиданта в систему. Конечные численные значения величин выражаются в эквивалентах тролокса. Тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота) – водорастворимый аналог токоферола (витамин Е) – в настоящее время принят за стандарт для оценки антиоксидантной активности и его активность условно принимается за единицу, а антиоксидантная активность исследуемого вещества выражается в эквивалентных молях тролокса на массу образца (мкмоль/мг) [14, 20]. В литературе имеется также описание использования его в качестве стандарта аскорбиновой кислоты [10].

В настоящей работе в качестве генератора свободных радикалов использован 2'-азо-бис(2-амидинопропан) (АБАП) и люминол как активатор хемилюминесценции (ХЛ). Цель работы заключалась в оптимизации условий определения при pH 7,4 (среднее значение pH сыворотки крови).

Экспериментальная часть

Объекты исследования, реагенты и аппаратура

Использовали следующие реагенты: люминол (5-амино-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-фталазиндион, гидразид 3-аминофталево́й кислоты), АБАП (2,2'-азо-бис(2-амидинопропан)гидрохлорид), кверцетин (3,3',4',5,7-пентагидроксифлаво́н), аскорбат натрия (натриевая соль *g*-лактон 2,3-дегидро-L-гулоновой кислоты). Все препараты фирмы «Fluka» (Германия).

Тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхромо-2-карбоновая кислота) («Aldrich», Германия), дигидрокверцетин (ДГК) (3,5,7,3',4'-пентаоксифлаво́н) («Диод», Россия). Раствор люминола (1 мМ) и раствор АБАП (50 мМ) готовили растворением навески в буферном растворе (KН₂РO₄ 100 мМ, pH 7,4). Раствор АБАП пригоден для работы в течение дня.

Растворы тролокса, кверцетина, дигидрокверцетина с концентрацией каждого 0,1 М готовили растворением навески в метаноле, а растворы с рабочими концентрациями 1 и 10 мкМ получали разбавлением исходного раствора в дистиллированной воде. Метанольный раствор сохранял свою активность длительное время, а водные растворы приходилось готовить в день эксперимента. Раствор аскорбата натрия концентрацией 10 мкМ готовили растворением навески в дистиллированной воде в день эксперимента. Работу выполняли на хемилюминометре «Lum-5773» («ДИСфот», Россия). Для сопряжения компьютера и хемилюминометра использовали программный продукт PowerGraph (версия 3.3).

Результаты и их обсуждение

Методика эксперимента

Общий объем системы составлял 1 мл. В кювету помещали нагретый (37°C) в термостате буферный раствор (pH 7,4) и раствор люминола. Через пять минут добавляли раствор АБАП. Данный порядок добавления реагентов обусловлен тем фактом, что АБАП практически сразу начинает генерировать радикалы и его необходимо добавлять в уже нагретый раствор. Скорость перемешивания 16 об/с. Хемилюминесцентные кривые представлены на рис. 1. Интенсивность хемилюминесценции ($I_{\text{ХЛ}}$) измеряли в вольтах (В).

Оптимизация условий хемилюминесцентных реакций

Поскольку данная методика предназначена для анализа биологических образцов, температура и pH системы были заранее определены: 37°C и 7,4 соответственно (физиологические параметры). Концентрации реагентов (АБАП и люминола) подбирали таким образом, чтобы время эксперимента было минимальным, сигнал максимальным, а расход реагентов как можно меньшим.

При увеличении концентрации АБАП максимум хемилюминесценции возрастает (рис. 2, а), время достижения максимума уменьшается (рис. 2, б). Данный эффект можно объяснить тем, что при увеличении концентрации АБАП концентрация радикалов в системе возрастает, поэтому они быстрее реагируют с люминолом, следовательно, активатор расходуется быстрее.

При увеличении концентрации люминола до 10 мкМ происходит рост максимума хемилюминесценции, при концентрации люминола более 10 мкМ дальнейшее увеличение его концентрации приводит к уменьшению максимума (рис. 2, в). Возможно дан-

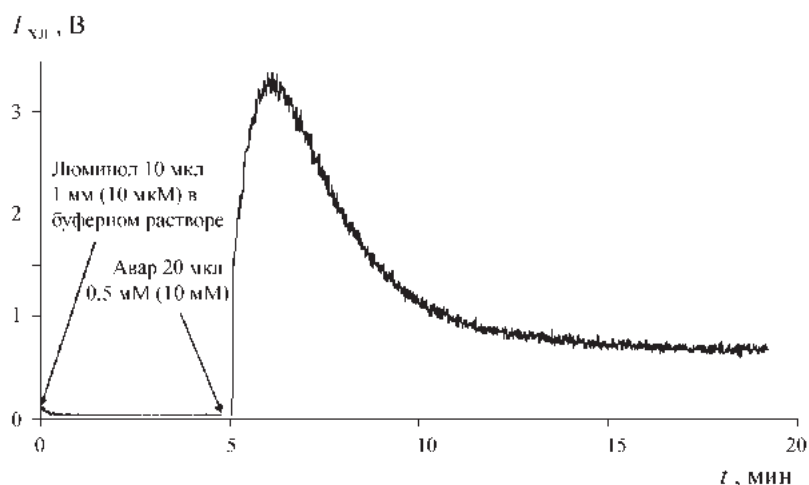


Рис. 1. Хемилюминесцентная кривая системы, состоящей из 10 мМ АБАП и 10 мкМ люминола в буферном растворе (общий объем 1 мл). Последовательность добавления реагентов, их объемы, начальные и конечные (в скобках) концентрации указаны на рисунке

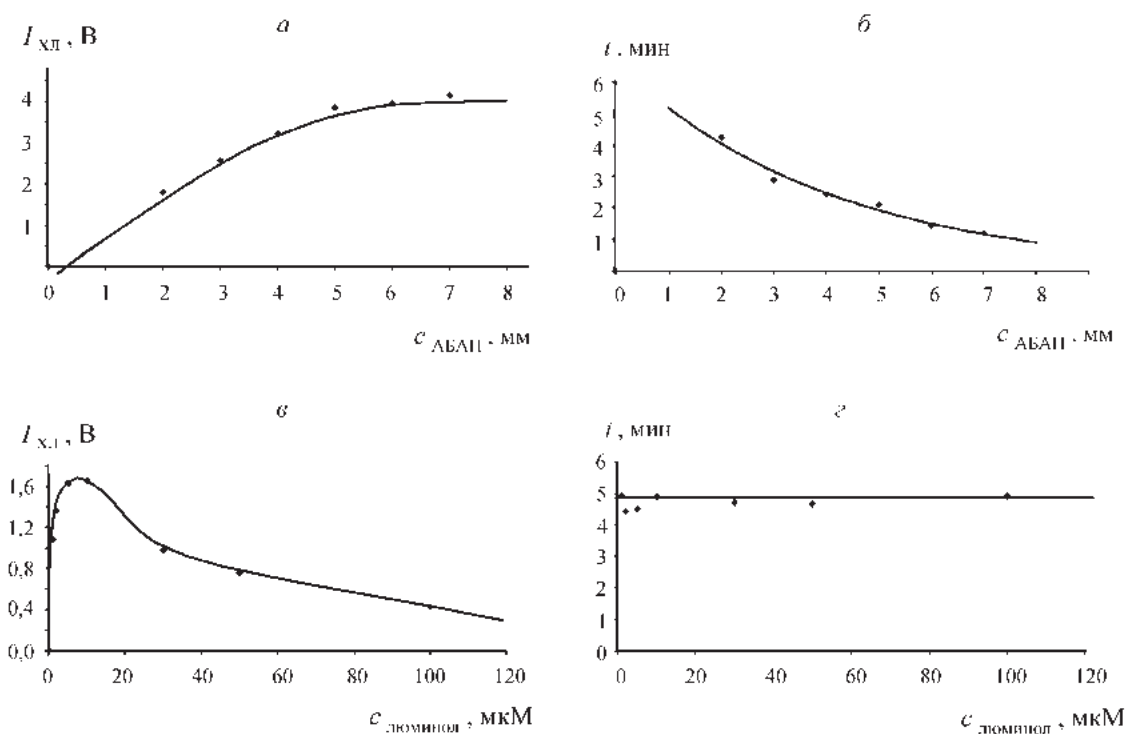


Рис. 2. Зависимость: а – максимума хемилюминесценции от концентрации АВАП, б – времени достижения максимума хемилюминесценции от концентрации АБАП, в – максимума хемилюминесценции от концентрации люминола, г – времени достижения максимума хемилюминесценции от концентрации люминола. Реагент: а, б – люминол (10мкМ); в, г – АВАП (2мМ). Методику эксперимента см. на рис. 1

ный эффект связан с концентрационным тушением. Концентрация люминола не влияет также на время достижения максимума, что говорит о зависимости кинетики начального участка только от концентрации АБАП (рис. 2, г). Таким образом, рабочая кон-

центрация люминола составляет 10 мкМ, поскольку при этом обеспечивается наибольшее значение максимума хемилюминесценции, рабочая концентрация АБАП – 3 мМ, так как в этом случае кривая хемилюминесценции быстро достигает максимального зна-

чения, что уменьшает время одного эксперимента при минимальном расходе реагента.

Определение антиоксидантов

При добавлении антиоксиданта к аналитической системе АБАП/люминол развитию хемилюминесценции предшествует участок, на котором интенсивность сигнала сопоставима с фоновыми значениями – латентный период (рис. 3). В течение латентного периода все радикалы расходятся на реакцию с антиоксидантом. В момент, когда все количество антиоксиданта израсходовано, происходит увеличение интенсивности хемилюминесценции,

поскольку радикалы начинают реагировать с люминолом. В качестве аналитического сигнала выбран латентный период, измеряемый как интервал от времени достижения максимума хемилюминесцентной кривой системы без антиоксиданта до времени достижения максимума в системе с антиоксидантом (рис. 4).

При увеличении начальной концентрации антиоксиданта латентный период возрастает. Зависимости латентного времени от концентрации антиоксидантов (тролокс, аскорбат натрия, кверцетин, дигидрокверцетин) приведены на рис. 5. Большие значения латентных периодов для кверцетина и дигидрокверце-

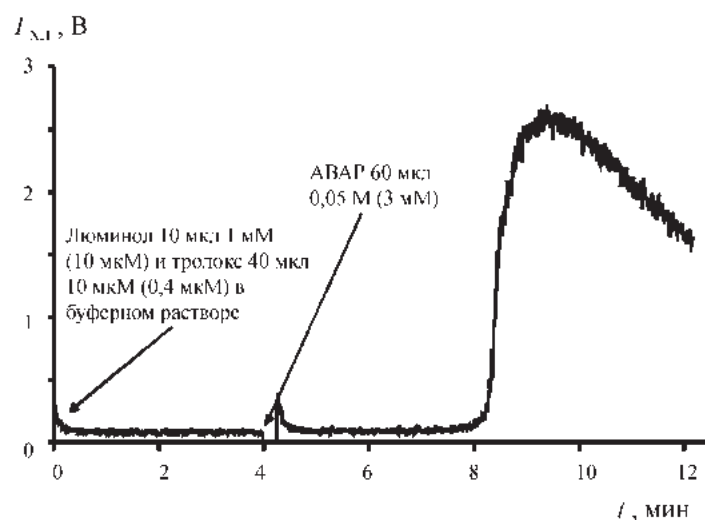


Рис. 3. Хемилюминесцентная кривая системы, состоящей из 10 мкМ люминола, 3 мМ АБАП и 0,4 мкМ тролокса. Последовательность добавления реагентов, их объемы, начальные и конечные концентрации указаны на рисунке

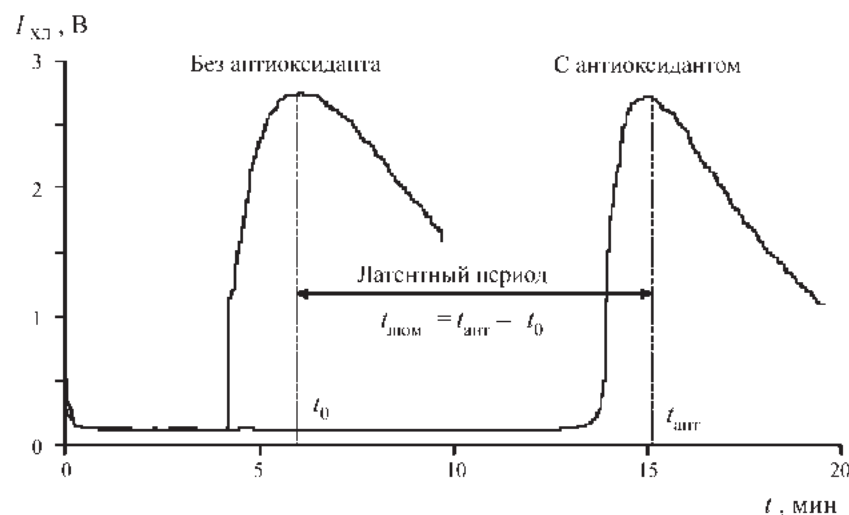


Рис. 4. Хемилюминесцентные кривые систем, состоящих из 10 мкМ люминола и 3 мМ АБАП с антиоксидантом (1 мкМ тролокса) и без него. Методику эксперимента см. на рис. 3

тина можно объяснить их меньшей активностью по отношению к свободным радикалам по сравнению с тролоксом и аскорбатом натрия. Таким образом, латентный период характеризует не только количество антиоксиданта, но и его активность. Уравнения регрессии и другие метрологические характеристики методики представлены в табл. 1.

Таким образом, для разных антиоксидантов были получены линейные градуировочные зависимости латентного периода от концентрации. Методика определения антиоксидантов отличается простотой, экспрессностью и низкими пределами обнаружения на уровне 0,05–0,20 мкМ. Правильность определения отдельных антиоксидантов была про-

верена методом “введено-найденно” на модельных растворах (табл. 2).

Определение антиоксидантов в чайном напитке

Для оценки возможности практического применения методики проведено определение антиоксидантов в чайном напитке «Green Tea Lipton» (ООО «Юнилевер СНГ»). Для определения антиоксидантов использовали метод добавок – к исходному раствору чайного напитка, разбавленному в 100 раз дистиллированной водой, добавляли различные количества аскорбата натрия: 0; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 мкМ. Латентный период измеряли так, как было описано

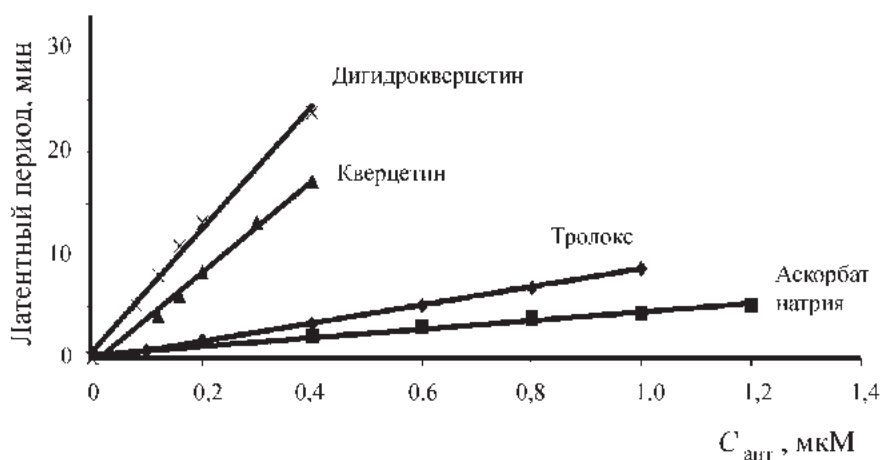


Рис. 5. Зависимость латентного периода от концентрации соответствующего антиоксиданта. Реагенты: АБАП (3мМ), люминол (10мкМ)

Таблица 1

Метрологические характеристики методики определения антиоксидантов

Антиоксидант	Уравнение градуировочной прямой, $P = 0,95; n = 6$	Коэффициент корреляции	Предел обнаружения, мкмоль/л	Коэффициент чувствительности
Тролокс	$t_{л} = (8,8 \pm 0,1)c - (0,07 \pm 0,05)$	0,999	0,05	$k = 8,8 \pm 0,1$
Аскорбат натрия	$t_{л} = (4,2 \pm 0,1)c - (0,31 \pm 0,09)$	0,982	0,20	$k = 4,2 \pm 0,1$
Кверцетин	$t_{л} = (44,32 \pm 0,04)c - (0,58 \pm 0,06)$	0,994	0,03	$k = 44,32 \pm 0,04$
Дигидрокверцетин	$t_{л} = (59,24 \pm 0,03)c + (0,67 \pm 0,08)$	0,995	0,03	$k = 59,24 \pm 0,03$

Т а б л и ц а 2

Проверка правильности методики определения антиоксидантов методом «введено-найдено»
($n = 3, P = 0,95$)

Определяемое вещество	Содержание, мкМ		s_r
	введено	найдено	
Тролокс	0,50	0,52±0,04	0,03
Аскорбат натрия	0,60	0,64±0,07	0,04
Кверцетин	0,20	0,18±0,02	0,04
Дигидрокверцетин	0,20	0,21±0,02	0,04

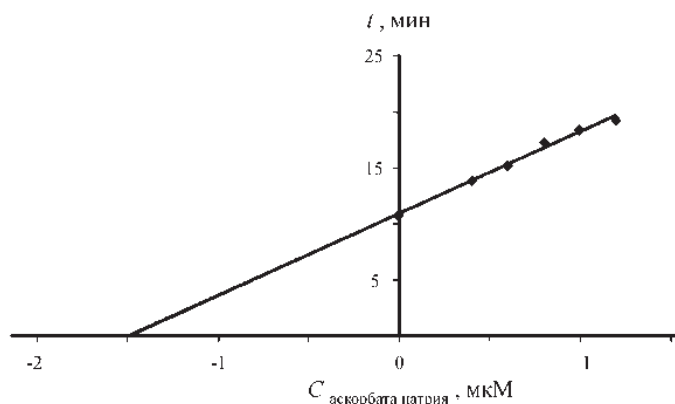


Рис. 6. Градуировочная зависимость латентного периода от концентрации добавленного аскорбата натрия. Реагенты: АБАП (3мМ), люминол (10мкМ)

выше. Была построена градуировочная зависимость латентного периода от концентрации добавленного антиоксиданта (рис. 6). Было посчитано уравнение градуировочной прямой:

$$t_{л} = (7,3 \pm 0,2)c + (10,9 \pm 0,3) \quad (P = 0,95; n = 6).$$

Коэффициент корреляции: $r = 0,995$;
относительное стандартное отклонение $s_r = 0,03$.

Далее посчитали содержание антиоксидантов в единицах аскорбата натрия в исходном растворе чая «Green Tea Lipton» (в бутылке):

$$c \text{ (аскорбат натрия)} = (7,45 \pm 0,45) \text{ мМ.}$$

Данные значения согласуются со значениями, полученными для данного пищевого продукта при использовании спектрофотометрической методики определения антиоксидантов с помощью катион-радикала АВТС (2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин 6-сульфонат) [10], которые также выражены в единицах аскорбата натрия (c (аскорбата натрия) = $(7,3 \pm 0,2)$ мМ).

Таким образом, данная методика применима для определения содержания антиоксидантов в пищевых продуктах, а также отличается низкими пределами обнаружения, простотой и хорошей воспроизводимостью.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ и РФФИ (проект № 11-04-01743-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Stocker P., Lesgards J. F., Vidal N., Chalier F., Prost M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2003. **1621**. P. 1.
- Maulik G., Maulik N., Bhandari V., Kagan V. E., Pakrashi S., Das D. K. // *Free Rad. Biol. Res.* 1997. **27**. P. 221.
- Visioli F., Galli C. // *Anal. Biochem.* 1997. **249**. P. 244.
- Saez F., Motta C., Boucher D., Grizard G. // *Mol. Hum. Reprod.* 1998. **4**. P. 667.
- Kawagoe M., Nakagawa K. // *Toxicol. Lett.* 2000. **114**. P. 189.
- Takami M., Preston, S. L., Behrman H. R. // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2000. **278**. P. 646.
- Krasowska A., Piasecki A., Murzyn A., Sigler K. // *Folia Microbiol.* 2007. **52**. P. 45.
- Campos A. M., Sotomayor C. P., Pino E., Lissi E. // *Biol. Res.* 2004. **37**. P. 287.
- Campos A. M., Escobar J., Lissi E. // *J. Braz. Chem. Soc.* 1996. **7**. P. 43.
- Kim D. O., Lee K. W., Lee H. J., Lee C. Y. // *J. Agric. Food Chem.* 2002. **50**. P. 3713.
- Psotova J., Zahalkova J., Hrbac J., Simanek V., Bartek J. // *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 2001. **145**. P. 81.
- Cao G., Alessio H. M., Cutler R. G. // *Free Rad. Biol. Med.* 1993. **14**. P. 303.
- Wu X., Gu L., Holden J. // *J. of Food Composition and Analysis.* 2004. **17**. P. 407.
- Georgetti S. R., Casagrande R., Di Mambro V. M., Azzolini A. E., Fonseca M. J. // *AAPS PharmSci.* 2003. **5**. P. 20.
- Cheng Z., Yan G., Li Y., Chang W. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2003. **375**. P. 37.
- Lissi E., Pascual C., Del Castillo M. D. // *Free Radic. Res. Commun.* 1992. **17**. P. 299.
- Lissi E., Salim-Hanna M., Pascual C. // *Free Rad. Biol. Med.* 1995. **18**. P. 153.
- Krasowska A., Rosiak D., Szkapia K., Oswiecimska M., Witek S., Lukaszewicz M. // *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2001. **6**. P. 71.
- Slavikova H., Lojek A., Hamar J., Duskova M., Kubala L., Vondracek J., Ciz M. // *Free Rad. Biol. Med.* 1998. **25**. P. 9.
- Uotila J. T., Kirkkola A. L., Rorarius M., Tuimala R. J., Metsa-Ketela T. // *Free Rad. Biol. Med.* 1994. **16**. P. 581.

Поступила в редакцию 10.10.11

DETERMINATION OF ANTIOXIDANTS BY SENSITIZED CHEMILUMINESCENCE USING 2,2'-AZO-BIS(2-AMIDINOPROPANE)

A.V. Alexeev, E.V. Proskurnina, Yu.A. Vladimirov

(*M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Basic Medicine*)

For the determination of antioxidants, an analytical procedure was proposed based on chemiluminescence. The analytical system consists of a free-radicals generator 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) and luminol as a chemiluminescence sensitizer in phosphate buffer solution (pH 7,4). The analytical conditions were optimized. The analytical procedure provides detection limits as low as (μM) for: trolox – 0,05; ascorbic acid – 0,20; quercetin – 0,03; dihydroquercetin – 0,03. The procedure was used for determination of antioxidants in food.

Key words: *antioxidants, sensitized chemiluminescence, 2-2'-azo-bis(2-amidinopropane).*

Сведения об авторах: *Алексеев Андрей Владимирович* – аспирант кафедры медицинской биофизики факультета фундаментальной медицины МГУ (kvark-87@mail.ru); *Проскурнина Елена Васильевна* – доцент кафедры медицинской биофизики факультета фундаментальной медицины МГУ, канд. хим. наук (proskurnina@gmail.com); *Владимиров Юрий Андреевич* – зав. кафедрой медицинской биофизики факультета фундаментальной медицины МГУ, профессор, академик РАН (yuvlad@mail.ru).