

Хемилюминесцентный мониторинг антиоксидантов – ингибиторов свободнорадикального окисления липидов

**© Васильев Ростислав Федорович, Вепринцев Тимур Львович,
Наумов Владимир Владимирович, Трофимов Алексей Владиславович*⁺
и Федорова Галина Федоровна**

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН. Ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334. Россия.

Тел.: (495) 939-73-58. E-mail: avt-chph@mail.ru

*Ведущий направление; ⁺Поддерживающий переписку

Ключевые слова: *окси-хемилюминесценция углеводов, антиоксиданты в липидах, хемилюминесцентное определение.*

Аннотация

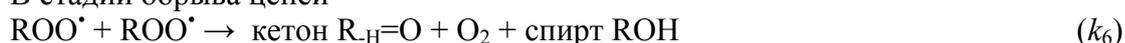
Рассмотрены основы хемилюминесцентного определения концентрации и реакционной способности антиоксидантов: механизм окси-хемилюминесценции углеводов, принципы выбора стандартной окисляющейся смеси, конструкция хемилюминометра, программа обработки результатов. Даны примеры применения хемилюминесцентного метода для анализа природных антиоксидантов в образцах липидов.

Введение

Жидкофазное окисление углеводов (RH) молекулярным кислородом представляет собой радикально-цепную реакцию. При умеренных температурах конечным продуктом является гидропероксид ROOH, а сама реакция неразветвленной:



В стадии обрыва цепей



возбуждается малоинтенсивная хемилюминесценция (ХЛ, излучение кетона или дикислорода), которую можно назвать окси-хемилюминесценцией. ХЛ используют как удобный кинетический метод, поскольку ее интенсивность (*I*) пропорциональна скорости квадратичного обрыва цепей, т.е. скорости гибели пероксидных радикалов $k_6[ROO^{\bullet}]^2$. При непрерывном сканировании кинетика ХЛ прямо отражает вариацию концентрации ROO^{\bullet} в растворе. Так, если в стандартный хемилюминесцирующий раствор ввести пробу, содержащую антиоксиданты (АОН), то они перехватывают пероксидные радикалы



понижают их концентрацию и, следовательно, тушат ХЛ. По мере расходования антиоксиданта постепенно восстанавливается начальная стационарная концентрация ROO^{\bullet} и, соответственно, начальная интенсивность ХЛ. «Украденная» светосумма ХЛ пропорциональна числу радикалов, перехваченных антиоксидантом, или, что то же самое, числу молекул АОН, содержавшихся в пробе, т.е. начальной концентрации $[AOH]_0$.

Что касается кинетики восстановления ХЛ, то здесь сосуществуют два типа обрыва цепей со следующими вкладами в суммарную скорость обрыва: $k_6[ROO^{\bullet}]^2$ и $k_7[ROO^{\bullet}][AOH]$. Отношение их вкладов равно $k_6[ROO^{\bullet}] / k_7[AOH]$; поэтому кинетика восстановления зависит и

от k_6 , и от k_7 , и из нее можно рассчитать одну из этих констант при условии, что другая известна. Однако, если k_6 много меньше, чем k_7 , то вклад члена $k_6[\text{ROO}^\bullet]^2$ (и, соответственно, интенсивность ХЛ) оказывается ничтожным практически до момента полного израсходования антиоксиданта и последний никак не проявляется в кинетике восстановления ХЛ и из нее определяется только константа скорости k_6 , но не k_7 .

Таким образом, регистрация тушения ХЛ и его кинетики является основой метода количественного определения как концентрации, так и реакционной способности антиоксидантов, входящих (или специально добавляемых) в искусственные и природные композиции, лекарства, пищевые продукты и т.п. материалы и предохраняющих их от окисления. Отметим, что вышеизложенный подход является несколько идеализированным, так как в реальных случаях картина может осложняться рядом вторичных или побочных процессов (см. ниже).

Экспериментальная часть

Выбор стандартного раствора. Термин «антиоксидант» обычно используют как синоним выражения «ингибитор цепного свободнорадикального (перекисного) окисления», когда речь идет о веществе, способном в малых количествах тормозить окислительный процесс. Типичным субстратом окисления являются углеводороды или вещества, содержащие углеводородные фрагменты и входящие в состав масел, жиров, липидов и т.п. [1–7].

Методика оценки антиоксидантной активности включает в себя выбор стандартного модельного вещества (RH), для которого доказан цепной свободнорадикальный механизм его окисления и известны константы скорости элементарных стадий. Такими углеводородами являются, например, этилбензол, дифенилметан и, намного реже, кумол, у которого слишком низкая константа скорости k_6 . Эффективность антиоксиданта тем выше, чем выше константа скорости k_7 , и чем ниже константы скорости продолжения цепей окисления образовавшимся радикалом AO^\bullet ($\text{AO}^\bullet + \text{RH} \rightarrow \text{AOH} + \text{R}^\bullet$). В результате уменьшается длина цепей окисления и, следовательно, скорость окисления. В настоящей работе представлен хемилюминесцентный метод оценки указанных констант скорости, характеризующих антиоксидантную активность вещества или группы веществ, входящих в состав объекта липидной или иной природы [8, 9, 13].

Схема установки представлена на рис 1. Реакционная ячейка представляет собой цилиндрический стеклянный термостатируемый сосуд объемом 8 мл, помещенный в светонепроницаемую камеру. Объем реакционной смеси составляет 4-6 мл. Подробное описание установки приведено в работе [10]. Для регистрации ХЛ служит фотоэлектронный умножитель (ФЭУ-38 или компьютеризованный цифровой счетчик фотонов *H7467* фирмы *Hamamatsu*, в состав которого уже включен источник питания и усилитель).



Рис. 1. Принципиальная схема фотометрической установки для регистрации слабых световых потоков.

В модельном стандартном растворе этилбензола или дифенилметана в инертном малополярном растворителе (бензоле или хлорбензоле) инициируется низкотемпературное (50-60 °С) окисление. Кинетика и механизм этих процессов хорошо изучены, известны константы скорости элементарных стадий [1, 5, 6, 9–15], что является надежной основой для оценки констант скорости реакций антиоксидантов. Постоянная скорость зарождения цепей окисления поддерживается термическим распадом инициатора (Y) – азодиизобутиронитрила (АИБН) [5, 6, 9, 12]. Смесь насыщается кислородом путем барботирования воздуха. Интенсивность довольно слабой ХЛ усиливается за счет переноса энергии на эффективные флуорофоры – 9,10-дибромантрацен (ДБА) [16, 17] или хелат европия (Eu³⁺-1,10-фенантролин-трис(теноилтрифторацетонат) [17, 18]. Вещества очищают стандартными методами [19].

Исследуемые образцы растворяют в хлорбензоле и вводят в модельную реакционную смесь. Объем пробы варьируется от 0.05 до 1 мл.

Результаты и их обсуждение

Моделирование кинетики хемилюминесценции

В основу расчетов положена кинетическая схема ингибированного окисления [1, 5, 6, 8–10, 13, 20–25] (таблица). Она включает стадии зарождения, продолжения и обрыва цепей окисления. В приведенной схеме использована традиционная в кинетической литературе [1, 3, 6, 9, 10, 13, 20, 22–25] нумерация элементарных реакций.

Таблица. Кинетическая схема свободнорадикального (перекисного) окисления модельного углеводорода в присутствии антиоксиданта*

№	Реакция	Стадия
<i>i</i>	$Y \rightarrow r \cdot \xrightarrow{O_2, RH} R \cdot$	Инициирование
1	$R \cdot + O_2 \rightarrow ROO \cdot$	Продолжение цепи
2	$ROO \cdot + RH \rightarrow R \cdot + ROOH$	
4	$R \cdot + R \cdot \rightarrow NRP$	Обрыв цепи
5	$R \cdot + ROO \cdot \rightarrow NRP$	
6	$ROO \cdot + ROO \cdot \rightarrow O_2 + NRP$	
7	$AOH + ROO \cdot \rightarrow AO \cdot + ROOH$	Передача цепи
8	$AO \cdot + ROO \cdot \rightarrow NRP$	Обрыв цепи
9	$AO \cdot + AO \cdot \rightarrow NRP$	Обрыв цепи
9'	$AO \cdot + AO \cdot \rightarrow AOH + NRP$	Обрыв цепи
10	$AO \cdot + RH \rightarrow AOH + R \cdot$	Передача цепи
10'	$AO \cdot + O_2 \xrightarrow{RH} NRP + HOON + R \cdot$	Передача цепи

* Y – инициатор, r· – свободный радикал, образующийся при распаде инициатора Y, NRP – нерекционноспособные продукты, обозначения констант скорости в формулах соответствуют номерам реакций

Константы скорости элементарных реакций, использованные в расчетах, взяты из [5, 6, 9, 11, 12, 22]. Анализ кинетической схемы в предположении стационарности концентраций свободных радикалов и при помощи компьютерного моделирования [26–28] показывает [8, 9, 20, 21, 24], что зависимость относительной интенсивности ХЛ (I/I_0) от времени (*t*) является S-образной (см. рис. 2), а максимальный наклон кинетической кривой определяется [20] соотношением (1), где

$$\left[\frac{d(I/I_0)}{dt} \right]_{\max} = \frac{l \cdot k_7 \sqrt{W_i} \left(\sqrt{W_i} + \frac{mk'_{10}[RH]}{\sqrt{k_9^*}} \right)}{\sqrt{k_6} \left(\sqrt{W_i} + \frac{nk^*_{10}[RH]}{\sqrt{k_9^*}} \right)} \quad (1)$$

I/I_0 – отношение интенсивностей свечения в присутствии антиоксиданта и без него, k_N – константа скорости реакции N (см. таблицу), $k_9^* = k_9 + k_9'$, $k_{10}^* = k_{10} + k_{10}'$, *l*, *m*, *n* –

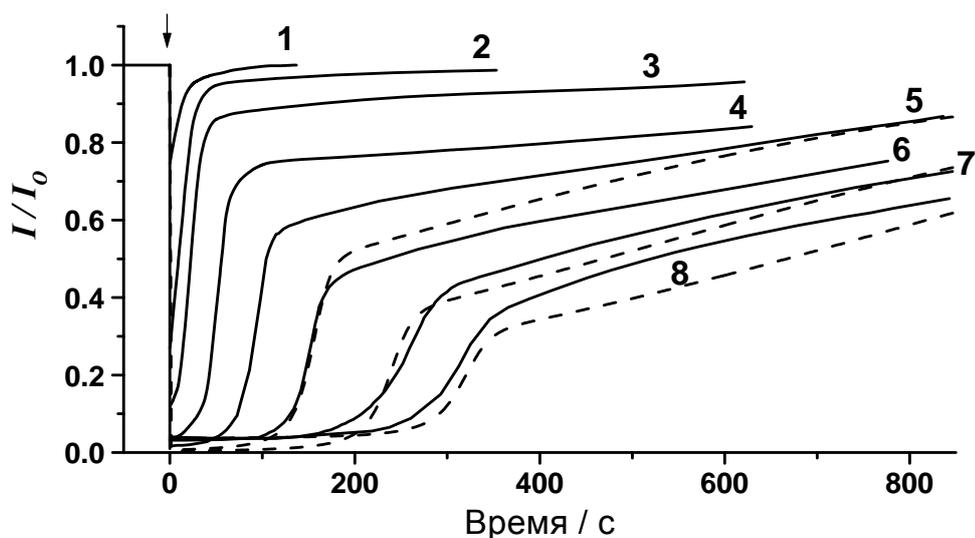


Рис. 2. Кинетические кривые ХЛ, полученные в модельной системе этилбензол–АИБН–ДБА в присутствии 0.042 (1), 0.17 (2), 0.34 (3), 0.68 (4), 1.4 (5), 2.7 (6), 4.1 (7) и 5.4 (8) г/л липидов при скорости инициирования $4.4 \cdot 10^{-8}$ моль/(л·с). Стрелкой показан момент введения пробы. Сплошные линии – эксперимент, пунктирные – результат математического моделирования. Пояснения в тексте.

Исследование зависимости величины $\left[\frac{d(I/I_0)}{dt} \right]_{\max}$ от W_i показывает [20, 21], что при типичных для большинства известных антиоксидантов [5, 6, 11, 20, 22, 23] значениях k_{10} и k_{10} оценка константы скорости k_7 возможна с помощью приближенного соотношения (2) [9, 20].

$$\left[\frac{d(I/I_0)}{dt} \right]_{\max} = (0.22 \pm 0.02) k_7 \sqrt{W_i/k_6} \quad (2)$$

Для уточнения полученных значений используют метод компьютерного моделирования [26–28]. При этом путем подбора констант скорости в рамках принятой кинетической схемы (таблица) добиваются максимального совпадения экспериментальных и расчетных кинетических кривых.

Поскольку скорость инициирования, задаваемая распадом инициатора, при температурах опытов практически постоянна, то величина F , определяемая выражением (3), представляет собой

$$F = W_i \cdot \int_0^{\infty} \left(1 - \frac{I}{I_0} \right) dt \quad (3)$$

«украденную светосумму» – количество обрывов цепей окисления за время опыта, не сопровождавшихся ХЛ, то есть обрывов в реакции пероксидных радикалов с молекулами антиоксиданта. Иначе говоря, величина F характеризует антиоксидантную емкость количества образца, находящегося в единице объема реакционной смеси. Соответственно, удельная антиоксидантная емкость (F_S) выражается как $F_S = F/m$ согласно соотношению (4), где m – масса образца в единице объема.

$$F_S = \frac{W_i}{m} \int_0^{\infty} \left(1 - \frac{I}{I_0} \right) dt \quad (4)$$

В качестве примера на рис. 2 приведены кинетические кривые, полученные при введении в модельную систему липидов, выделенных из мышечной ткани наваги дальневос-

точной экстракцией смесью хлороформ – метанол в объёмном соотношении 2:1. При введении липидного образца в реакционную ячейку происходит резкое снижение интенсивности ХЛ, свидетельствующее о присутствии антиоксиданта (антиоксидантов). Затем интенсивность свечения возрастает, приближаясь к исходному (в отсутствие антиоксиданта) уровню, сначала круто (1-й участок), а затем полого (2-й участок). Это свидетельствует о присутствии в липидном образце, по крайней мере, двух ингибиторов, значительно различающихся значениями k_7 .

Величина $\left[\frac{d(I/I_0)}{dt} \right]_{\max}$ несколько уменьшается с увеличением концентрации липидов в системе, по-видимому, вследствие влияния продуктов реакции. Поэтому для получения наиболее достоверного значения $\left[\frac{d(I/I_0)}{dt} \right]_{\max}$ первого участка кинетической

кривой проводили экстраполяцию к минимальным значениям концентрации липидов в системе. Оценочные значения k_7 для каждого из двух антиоксидантов получали подстановкой в выражение (1) значений $\left[\frac{d(I/I_0)}{dt} \right]_{\max}$ соответствующих участков. Дальнейшее уточнение

констант проводили путем подбора при сопоставлении экспериментальных кинетических кривых с кривыми, полученными компьютерным математическим моделированием [26–28].

При расчете антиоксидантной емкости по соотношению (2) величину $\int_0^{\infty} \left(1 - \frac{I}{I_0} \right) dt$ («украденную светосумму») измеряли как площадь, заключенную между прямой $I/I_0 = 1$ и кинетической кривой ХЛ, продолженной до их пересечения.

В результате получилось, что исследованный образец содержит два типа антиоксидантов со следующими параметрами:

- 1) $k_7 = 3.8 \cdot 10^6$, $k_{10} = 0.05$, $k_{10}' = 0.05$ л/(моль·с), $[AON]_1 = 1.07$ мкмоль/г;
- 2) $k_7 = 6.0 \cdot 10^4$, $k_{10} \approx k_{10}' \approx 0$ л/(моль·с), $[AON]_2 = 2.26$ мкмоль/г.

Суммарная удельная антиоксидантная емкость F'_S составляет 6.0 ± 0.6 мкмоль/г.

Таким образом, анализ кинетических кривых в сочетании с численным моделированием дает возможность оценить как молярное содержание антиоксиданта в пробе, так и константы скорости реакций взаимодействия антиоксиданта с пероксидным радикалом и продолжения цепей окисления образовавшимся радикалом AO^{\cdot} .

Полученный набор констант представляет собой комплексный показатель эффективности присутствующего в исследуемом образце антиоксиданта. В случае смеси антиоксидантов получаемые значения имеют эффективный характер.

Для сравнительных экспресс-анализов в качестве показателя активности можно использовать приведенную величину максимального наклона кинетической кривой ХЛ,

$$\frac{1}{W_i} \left[\frac{d(I/I_0)}{dt} \right]_{\max}$$

Измерительная установка комплектуется из серийных приборов за исключением светонепроницаемой камеры и реакционной ячейки (рис. 1), которые достаточно просты в изготовлении. Возможно использование хемилюминометров, выпускаемых промышленностью.

Минимальный набор реактивов включает: 1) хлорбензол (растворитель), 2) этилбензол или дифенилметан (субстрат окисления), 3) азодиизобутиронитрил (источник свободных радикалов – инициатор цепного процесса окисления), 4) дибромантрацен (усилитель ХЛ, увеличивающий ее квантовый выход). Методика допускает замену любого из четырех перечисленных компонентов другим веществом с аналогичными свойствами.

Выводы

1. Использование хемилюминесценции, сопровождающей окисление довольно простых углеводородных субстратов, оказывается удобным универсальным инструментом мониторинга антиоксидантного статуса липидных материалов.
2. Анализ кинетических кривых интенсивности свечения позволяет определить присутствие в одном образце антиоксидантов различной силы, измерить их количество и антирадикальную активность.

Благодарности

Авторы благодарят за финансовую поддержку ОХНМ РАН (Программа № 1).

Литература

- [1] Эмануэль Н.М., Денисов Е.Т., Майзус З.К. Цепные реакции окисления углеводов в жидкой фазе. *М.: Наука. 1965.* 375с.
- [2] Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. - *М.: Наука. 1972.* 252с.
- [3] Бурлакова Е.Б. *Успехи химии. 1975.* Т.44. №10. С.1871.
- [4] Ржавская Ф.М. Жиры рыб и морских млекопитающих. *М.: Пищевая промышленность. 1976.* 471с.
- [5] Эмануэль Н.М., Гал Д. Окисление этилбензола (модельная реакция). *М.: Наука. 1984.* 376с.
- [6] Денисов Е.Т., Азатян В.В. Ингибирование цепных реакций. *Черноголовка: ИХФЧ РАН. 1997.* 268с.
- [7] Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. *М.: Наука - Интерпериодика. 2001.* 343с.
- [8] Васильев Р.Ф. *ДАН СССР. 1962.* Т.144. №1. С.143.
- [9] Шляпинтох В.Я., Карпухин О.Н., Постников Л.М. и др. Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов. *М.: Наука. 1966.* 300с.
- [10] Беляков В.А., Васильев Р.Ф., Федорова Г.Ф. *Кинетика и катализ. 1996.* Т.37. №4. С.542.
- [11] Денисов Е.Т. Константы скорости гомолитических жидкофазных реакций. *М.: Наука. 1971.* 712с.
- [12] Кулици З.И., Терман Л.М., Цепалов В.Ф., Шляпинтох В.Я. *Изв. АН СССР. ОХН. 1963.* №2. С.253.
- [13] Васильев Р.Ф., Федорова Г.Ф. *Кинетика и катализ. 2004.* Т.45. №5. С.695.
- [14] Belyakov V.A., Vasil'ev R.F., Trofimov A.V., Fedorova G.F. In: *Free Radicals in Biology and Environment (NATO Adv. Sci. Inst. Series, Series 3: High Technology).* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. **1997.** V.27. P.233.
- [15] Fedorova G.F., Trofimov A.V., Vasil'ev R.F., Veprintev T.L. *Arch. Org. Chem. (ARKIVOC). 2007.* N 8. P.163.
- [16] Васильев Р.Ф., Вичутинский А.А., Черкасов А.С. *Докл. АН СССР. 1963.* Т. 149. № 1. С. 124.
- [17] Беляков В.А., Васильев Р.Ф., Федорова Г.Ф. *Изв. АН СССР. Сер. физ. 1973.* Т. 37. № 4. С. 747.
- [18] Bower H., Blanc J., Ross D. *J. Am. Chem. Soc. 1964.* Vol. 86. N 23. P. 5125.
- [19] Гордон А., Форд Р. Спутник химика. *М.: Мир. 1976.* 543 С. (Gordon A.J., Ford R.A. The Chemist's Companion. *New York - Sydney - Toronto: John Wiley & Sons. 1972).*
- [20] Наумов В.В., Храпова Н.Г. *Кинетика и катализ. 1984.* Т.25. №3. С.563.
- [21] Наумов В.В., Васильев Р.Ф. *Кинетика и катализ. 2003.* Т.44. №1. С.111.
- [22] Рогинский В.А. Фенольные антиоксиданты. Реакционная способность и эффективность. *М.: Наука. 1988.* 247с.
- [23] Бурлакова Е.Б., Крашаков С.А., Храпова Н.Г. *Химическая физика. 1995.* Т.14. №10. С.151.
- [24] В.А. Беляков, Р.Ф. Васильев, Г.Ф. Федорова. *Кинетика и катализ. 2004.* Т.45. №3. С.355.
- [25] Belyakov V.A., Fedorova G.F., Naumov V.V., Trofimov A.V., Vasil'ev R.F. In: *Bioluminescence and Chemiluminescence. Progress and Perspectives.* Eds. A. Tsuji, M. Matsumoto, M. Maeda, L.J. Kricka, P.E. Stanley. *Singapore: World Scientific Publishing Co. 2005.* P.283.
- [26] Mendes, P. *Comput. Appl. Biosci. 1993.* Vol.9. P.563.
- [27] Mendes, P. *Trends Biochem. Sci. 1997.* Vol.22. P.361.
- [28] Mendes P., Kell D.B. *Bioinformatics. 1998.* Vol.14. P.869.