

УДК 543.253

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИОКСИДАНТОВ

© *В.В. Хасанов**, *Г.Л. Рыжова*, *Е.В. Мальцева*

Томский государственный университет, химический факультет, пр. Ленина, 36, Томск, 634050 (Россия), e-mail: xasanov@xf.tsu.ru

В обзорной статье рассматриваются наиболее часто применяемые способы исследования антиоксидантов. Значительное число методов оценки антиокислительной активности соединений систематизировано по способу регистрации параметров, на основе которых определяется антиокислительная активность, в том числе количественно. Приводятся описания деталей наиболее важных методов и ссылки на самые последние исследования, хотя основы многих современных способов изучения антиоксидантов были разработаны гораздо раньше. Отмечается тенденция сравнения полученных результатов определения антиокислительной активности с действием антиоксидантов в конкретной биологической модели.

Введение

Тема свободных радикалов и реакционноспособных кислородсодержащих частиц продолжает привлекать повышенное внимание со стороны научного сообщества и все в большей степени заинтересовывает широкую общественность. Потребляемая нами пища и состояние окружающей среды оказывают существенное влияние на биологическое производство свободных радикалов. Свободным радикалом считается химическое соединение, имеющее один или более неспаренных электронов, образованное в результате либо потери, либо приобретения одного электрона. Неспаренным считается электрон, занимающий в единственном числе молекулярную или атомную орбиталь. Высокая реакционная способность радикалов приводит в физиологических условиях к ускорению процессов окисления, разрушающих молекулярную основу клетки, и вызывает в результате многочисленные патологические состояния.

Соединения, способные связывать содержащие неспаренные электроны частицы с образованием менее активных или вовсе неактивных радикалов, называют антиоксидантами. Антиоксиданты играют важную роль в регуляции протекания свободно-радикальных превращений в организме, существенно влияя на его состояние, поэтому антиоксиданты и исследование антиокислительных свойств соединений в последнее время получили широкое распространение. Наиболее перспективными источниками антиоксидантов считаются растительные объекты.

Методы исследования общей антиокислительной активности (АОА) различаются по типу источника окисления, окисляемого соединения и способа измерения окисленного соединения. Эти методы дают широкий набор результатов, которые нельзя использовать по отдельности, а результаты должны быть интерпретированы с осторожностью.

По способам регистрации проявляемой антиокислительной активности можно разделить методы на волнометрические [1], фотометрические [2–13], хемилюминесцентные [14–16], флуоресцентные [17–22], электрохимические [23–28] и ряд более специфических [29–35]. Обычно используется протекающая по радикальному механизму модельная реакция (чаще всего – окисления) какого-либо индивидуального соединения, по влиянию на протекание которой и оценивается АОА индивидуального соединения или смеси. Кинетика контролируется либо по поглощению кислорода способами измерения объема [1], либо по изменению характеристик реакционной смеси – изменению поглощения электромагнитного излучения, флуоресценции, люминесценции и т.д. В ряде случаев создаются условия для генерирования свободных

* Автор, с которым следует вести переписку.

радикалов с постоянной скоростью, добавлением инициаторов, либо с химической генерацией радикалов в результате протекания контролируемого химического процесса (Фентон).

Электрохимические методы оценки АОО могут быть разделены на две группы. В части методов используется только электрохимическая регистрация какого-либо соединения, изменение концентрации которого косвенно связано с протеканием процессов окисления [23–26]. Другая группа методов [27–29] основана на непосредственном измерении окислительно-восстановительных потенциалов. Указывается, что эти параметры в целом коррелируют с АОО и могут быть использованы для ее оценки.

В разных методах определяются либо отдельные антиокислительные компоненты (например, витамин Е, аскорбиновая кислота и т.д.), либо общая антиокислительная активность (АОА). Действительно, определение концентрации отдельного соединения, обладающего свойствами антиокислителя, часто менее информативно по сравнению с определением общей антиокислительной активности. Общая антиокислительная активность может быть установлена несколькими методами: по поглощению кислорода при перекисном липидном окислении [1], окислению кроцина [2–4], хемилюминесценции с люминолом [14, 16, 36], окислению R-фикоэритрина [37–39], чувствительности эритроцитов к гемолизу [40], восстанавливающей железу активности [41], генерировании липидных перекисей [42–43]. Некоторые авторы измеряют активность антиокислительных ферментов, таких аскорбат-пероксидаза, глутатион-редуктаза, дегидроаскорбат-редуктаза и монодегидроаскорбат-редуктаза [44]. Все чаще выполняются сравнительные исследования, когда измеренная одним из методов АОО сравнивается с влиянием соединения на протекание той или иной патологии. Так, авторы [45] фракционировали компоненты зеленого чая, изучили активность фракций по методу DPPH и оценили их влияние на рост клеток рака желудка МК-1.

Фотометрические методы

Наиболее многочисленные методы и модификации методов, упоминаемые в литературе, используют фотометрическую регистрацию, вероятно, как самую удобную и доступную.

Колориметрическое определение общей антиокислительной активности (ТАС) по окислению кроцина впервые было предложено авторами [2]. Кроцин представляет собой красящее вещество желтых стручков, плода китайского растения *Gardenia grandiflora*. Метод с окислением кроцина заключается в следующем. В каждую лунку планшеты пипетируют по 100 мкл кроцина и 50 мкл испытуемого образца, разведенного в фосфатном буфере. Реакция инициируется добавлением 100 мкл предварительно подогретого до 37 °С раствора 2,2'-азобис-(2-амидинопропан) гидрохлорида (ААРН, 5 мг/мл) и окисление кроцина проводится инкубацией планшеты во влажном термостате при 37 °С в течение 60–75 минут. Контрольные лунки, содержащие кроцин, образцы и фосфатный буфер (по 100, 50 и 100 мкл соответственно), инкубируются параллельно.

После инкубирования измеряется оптическая плотность при 450 нм. Специфическое поглощение определяется по формуле:

$$100 \times (D_0 - D_{AOA})/D_0,$$

где D_0 – поглощение в отсутствие антиоксидантов; D_{AOA} – поглощение в присутствии антиоксидантов.

Последние усовершенствования этого метода позволяют определять антиокислительную активность плазмы человека [3]. Метод был стандартизован по индивидуальному соединению, в качестве которого был использован *Тролокс* (Trolox) – водорастворимый аналог витамина Е (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота). Структуры соединений приведены на рисунке 1.

Стандартная кривая по этому соединению строится предварительно, в диапазоне концентраций 0–10 мкг/мл. Исследования показали, что существенный вклад в общую АОО образцов вносят мочевая кислота, билирубин, альбумин, незначительный вклад приходится на долю аскорбиновой кислоты, и совсем никакого – на гемоглобин. ТАС не чувствителен к процессам замораживания – размораживания образцов и дает стабильные результаты при хранении образцов при комнатной температуре до 4 ч. Выяснилось, однако, что результаты определений занижаются в присутствии лимонной кислоты примерно на 20%. Числовые показатели АОО по данному методу для плазмы крови здоровых людей составляют в среднем $1,175 \pm 0,007$ мМ/л, в то время как диета на обогащенной антиоксидантами пище повышает это значение вдвое. В дальнейшем планируется модификация этого метода с целью дифференциации влияния эндо- и экзогенных антиоксидантов. Метод пригоден для оценки антиокислительной активности пищевых продуктов. Сделана также попытка автоматизации этого метода [4].

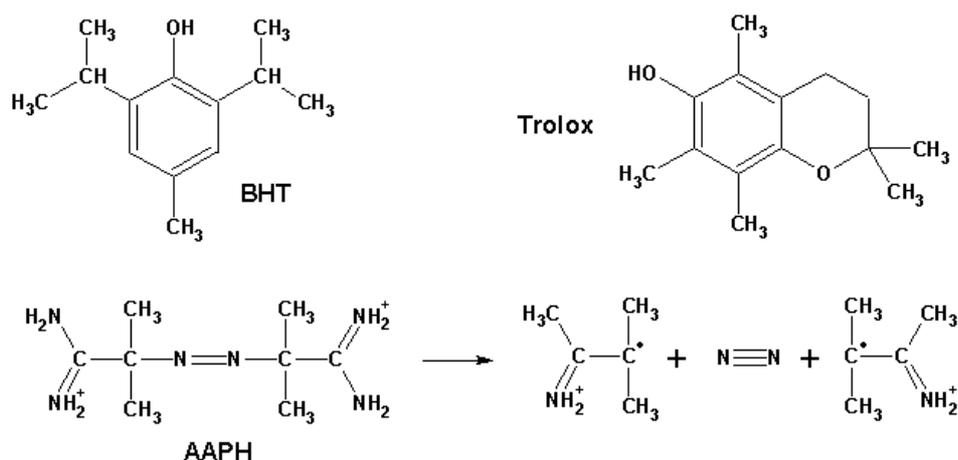


Рис. 1. Структуры некоторых антиоксидантов и соединения, генерирующего радикалы. Обозначены: BHT- 2,6-ди-трет-бутил-п-крезол; AAPH- 2,2'-азобис-(2-амидинопропан) гидрохлорид и схема его теплового распада

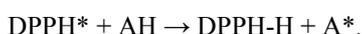
Антиокислительная активность в тканях мозга была исследована [5] по методу исследования с *Тролоksom* в качестве эквивалента (и названа TEAC), это является продолжением работ, использующих в качестве основы метода окисление кроцина.

Определение антиокислительной активности по методу TAC основано на оценке общего восстановительного эффекта индивидуальных низкомолекулярных антиоксидантов, как гидрофильных, так и гидрофобных. Оно дает информацию о типах антиоксидантов и их концентрациях без точного качественного различия. Эти методы основаны изначально на мониторинге изменения окраски, отнесенной к стандартному соединению – Trolox.

Способ с окислением дезоксирибозы в системе, генерирующей радикалы, описан авторами [6]. 2-деоксирибоза окисляется гидроксильными радикалами, образуемыми в реакции Фентона, и распадается до малонового диальдегида. Раствор испытуемого образца в фосфатном буфере, 0,2 мл 10 мМ раствора 2-деоксирибозы, 0,2 мл 0,1 мМ раствора комплекса $Fe^{2+}/EDTA$ и 0,2 мл 30% перекиси водорода смешивались и доводились 0,1 М фосфатным буфером (pH=7,4) до конечного объема 2 мл. Смесь инкубировалась при 37 °С в течение 4-х часов. После инкубации к реакционной смеси добавляли 1 мл 2,8% раствора трихлоруксусной кислоты и 1 мл 1% раствора тиобарбитуровой кислоты в 50 мМ раствора NaOH. Смесь нагревалась 10 мин при 100 °С и охлаждалась во льду, после чего измерялась оптическая плотность при 532 нм.

Другой фотометрический способ основан на фотоколориметрии железотиоцианатных комплексов [6]. По этому способу образец смешивают с 0,12 мл метанола, 2,88 мл 2,51% раствора линолевой кислоты в 80%-ном этаноле и доводят объем смеси 40 мМ фосфатным буфером (pH=7,0) до 12 мл. Смесь инкубируют при 40 °С и через определенные интервалы времени определяют концентрации гидропероксидов по железотиоцианатному методу. Для этого к аликвоте смеси добавляют по 0,2 мл раствора 20 мМ $FeCl_2$ и 30% NH_4CNS и измеряют оптическую плотность при 500 нм. При исследовании антиокислительной активности экстрактов чеснока [7] авторы использовали сочетание методов: окисления дезоксирибозы, железотиоцианатный и так называемый метод DPPH.

Одним из способов оценки АОА [8] является колориметрия свободных радикалов, основанная на реакции DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил ($C_{18}H_{12}N_5O_6$, $M = 394,33$), растворенного в метаноле, с образцом антиоксиданта (АН) по схеме:



В результате восстановления DPPH антиоксидантом снижается пурпурно-синяя окраска DPPH в метаноле, а реакция контролируется по изменению оптической плотности при 514 нм обычными методами спектрофотометрии. Авторы [9] модифицировали способ определения АОА объединением стандартной

фотометрической процедуры с методом оптотермического окна (optothermal window – OW) – недорогим, нетрадиционным детектором поглощения. Оптотермическое преобразование позволяет увеличить чувствительность определений на два порядка, увеличить линейный диапазон измерений в 16 раз по сравнению с традиционными способами спектрофотометрии. Важным преимуществом оптотермического способа измерения поглощения является также то, что возможна работа с опалесцирующими образцами. Принцип оптотермического окна вкратце заключается в следующем. Излучение с длиной волны 514 нм и мощностью 10 мВт, производимое аргоновым лазером, попадает на окно, представляющее собой сапфировый диск (Al_2O_3) толщиной 300 мкм, прозрачный для электромагнитного излучения длиной 514 нм. К верхней поверхности диска приклеена фторопластовая трубка – емкость для образца, а ко дну с обратной стороны – пьезоэлектрическое кольцо, генерирующее потенциал, возникающий при облучении раствора лазером.

Определение антиокислительной активности соединений на модели окисления униламелярных (одномембранных) липосом кислородом воздуха (катализируемое ионами Fe^{2+}) сообщается авторами [10]. Липосома представляет собой простейшую модель биологической клетки и так же, как последняя, имеет мембрану из двойного слоя фосфолипидов и внутреннее пространство. Авторы описывают процедуру приготовления липосом, содержащих в своей мембране различные жирорастворимые антиоксиданты (в соотношении 1 молекула антиоксиданта на примерно 100 молекул фосфолипида). Липосомы готовят из выделенного из морских объектов фосфатидилхолина, в состав которого входят остатки ненасыщенных жирных кислот. Продуктами окисления таких липосом являются диены, детектирование которых проводят фотометрически, при 232 нм. Реакция осуществляется в 96-луночной планшете, где непосредственно и измеряется оптическая плотность. Планшетный сканер имеет функцию встряхивания, для улучшения взаимодействия с кислородом суспензии липосом. Сообщается, что экспериментальная модель максимально имитирует реальное биологическое окисление, позволяя варьировать различные характеристики клеточных мембран – от заряда до подвижности.

Другие используемые методы: по восстановлению антиоксидантами железа: (ferric reducing/antioxidant power-FRAP) [11] – позволяют прямое определение низкомолекулярных антиоксидантов. При низких pH восстановление $Fe(III)$ -трипиридилтриазинового комплекса в $Fe(II)$ -комплекс сопровождается появлением интенсивной голубой окраски. Измерения основаны на способности антиоксидантов подавлять окислительный эффект реакционных частиц, генерируемых в реакционной смеси. Этот метод отличается простотой, быстротой и небольшими затратами при исполнении.

Общая АОА нескольких популярных овощей и китайских трав оценивалась авторами [12] с использованием системы ABTS/ H_2O_2 /пероксидазы хрена на планшетном сканере. Среди протестированных овощей большинство показали наличие АОА вообще, а максимальную АОА имеют сахарная свекла и красная капуста. Среди известных китайских трав исключительно высокой АОА обладают тропическая *Almond Terminalia* и горный *Radicis Cortex*.

Рабочий раствор, содержащий 2,0 мМ ABTS и 0,86 нМ пероксидазы хрена в 50 мМ фосфатном буфере (pH=7,0), загружается в количестве 240 мкл в ячейки 96-луночной планшеты. Туда же добавляется 10 мкл образца и 25 мкл 1 мМ раствора перекиси водорода в 50 мМ фосфатном буфере. Отсчет времени до начала образования зеленой окраски радикала ABTS⁺ начинался немедленно. Система калибровалась по аскорбиновой кислоте, выстраиванием зависимостей времени индукции (до появления зеленой окраски) от концентрации аскорбиновой кислоты. АОА образцов выражали в количестве 1 мг аскорбиновой кислоты на г исследованного растения.

При инкубировании ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолино-6-сульфоновая кислота)) с пероксидазой и перекисью водорода образуется относительно стабильный катион-радикал ABTS⁺, с максимумом поглощения 414 нм в спектре электромагнитного излучения. В присутствии антиоксидантов [13] обнаруживается период индукции перед появлением окраски. Низкомолекулярные антиоксиданты задерживают образование окраски пропорционально своему количеству. Метод быстрый, но самый дорогой из всех выше рассмотренных.

Хемилюминесцентные методы

Хемилюминесцентное детектирование перокси-радикалов и сравнение антиокислительной активности фенольных соединений описано в [14]. В методе, являющемся одним из множества модификаций методов

хемилюминесцентного определения антиокислительной активности, используется способность люминола давать свечение после взаимодействия со свободными радикалами. Свободные радикалы в системе генерируются постоянно в результате иницируемого теплом распада 2,2'-азобис-(2-амидинопропан) дигидрохлорида (AAPH). Авторы исследовали кинетику хемилюминесценции свободного и ингибированного бутилированным гидрокситолуолом (ВНТ, 2,6-ди-трет-бутил-п-крезол) и *Тролоксом* распада AAPH. Структуры соединений приведены на рисунке 1.

Кинетика изменения интенсивности люминесценции (в относительных единицах – RLU) показана на рисунке 2. Свечение падает до нуля спустя три недели (на рисунке не показано).

Зависимость интенсивности люминесценции люминола от pH среды показана на рисунке 3. По данным авторов следует, что при $\text{pH} < 7$, люминесценция исчезает вовсе.

При добавлении образца антиоксиданта наблюдается подавление люминесценции. При этом в случае соединения *Тролокс* отчетливо заметен период индукции – время, по истечении которого люминесценция возрастает, достигая практически первоначального уровня. Период индукции $T_{\text{и}}$ прямо пропорционален количеству добавленного *Тролокса* (рис. 4).

Несколько иначе ведет себя ВНТ. При его добавлении не наблюдается полного ингибирования люминесценции, сопровождаемого периодом индукции, но заметно частичное подавление люминесценции (рис. 5).

Авторы сделали предположение о том, что разные влияния на хемилюминесценцию соединений одного класса (фенолы), вызваны, по-видимому, различной степенью ионизации молекул *Тролокса* и ВНТ вследствие различной кислотности их ОН-групп. Эти выводы косвенно подтверждаются зависимостями подавления люминесценции от величины pH среды при одинаковых концентрациях антиоксидантов.

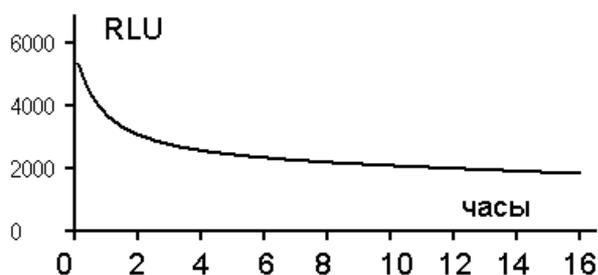


Рис. 2. Кинетика изменения интенсивности люминесценции люминола (в относительных единицах – RLU) в отсутствие антиоксидантов [14]. Инициатор – AAPH

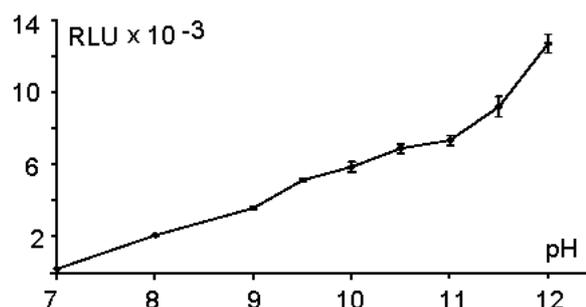


Рис. 3. Зависимость интенсивности хемилюминесценции от pH среды [14]

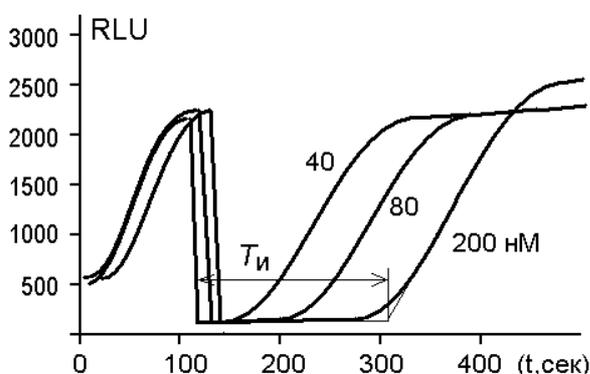


Рис. 4. Изменение интенсивности люминесценции при добавлении в систему 40, 80 и 200 нМ *Тролокса* [14]

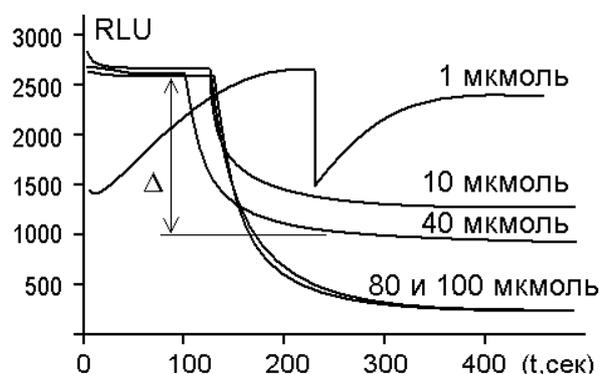
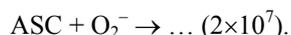
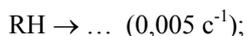


Рис. 5. Изменение интенсивности люминесценции при добавлении в систему 1, 10, 40, 80 и 100 мкМ ВНТ [14]

Математическое моделирование кинетики фотохемилюминесценции (ФХЛ) с участием рибофлавина в присутствии антиоксидантов – супероксиддисмутазы и аскорбиновой кислоты провели авторы [15]. Была использована специально разработанная компьютерная программа Kinetic Analyzer. Интенсивность фотохемилюминесценции (ФХЛ) принимали пропорциональной концентрации супероксида, поскольку в системе присутствовал люцигенин. Показано, что экспериментальные кривые ФХЛ описываются достаточно точно для следующей совокупности реакций (в скобках – константы скоростей, $M^{-1} \times c^{-1}$):



Здесь RH – рибофлавин, ${}^*O_2^-$ – супероксидный радикал; R^* – радикал рибофлавина; SOD – супероксиддисмутазы; ASC – аскорбат.

Хемилюминесцентное определение антиоксидантов с люминолом в присутствии пероксидазы хрена описано авторами [16].

Флуориметрические методы

Метод определения адсорбционной емкости по отношению к кислородным радикалам («Oxygen Radical Absorption Capacity»-ORAC) [17] является одним из наиболее применяемых в настоящее время. Он был первоначально разработан доктором Гоуа Као (Dr. Guohua Cao) в Национальном институте старения (США) в 1992 г. В 1996 г доктор Као объединился с доктором Рональдом Прайером (R. Prior) в совместную группу в Исследовательском центре старения USDA (администрации по контролю за лекарственными средствами США), где был создан полуавтоматический метод [18]. С тех пор автоматизированный метод интенсивно применялся при исследованиях антиоксидантов и окислительного стресса [19–21]. Метод основан на измерении интенсивности флуоресценции определенного соединения и ее изменении от времени протекания реакции. В присутствии соединений, связывающих кислородные радикалы, увеличивается время флуоресценции вследствие защитного действия антиокислителей. Количественное определение антиокислительной активности (АОА) осуществляется по площади между двумя кривыми – свободной реакции и с добавлением антиоксидантов (рис. 6).

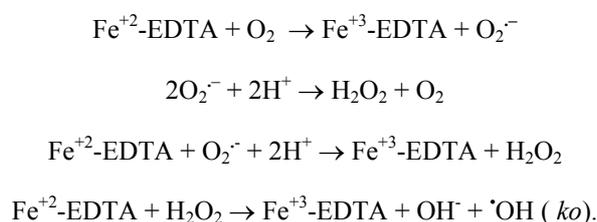
Степень уменьшения флуоресценции есть мера степени деградации флуоресцирующего соединения под воздействием кислородных радикалов. Первоначально в качестве флуоресцирующего вещества применялся белок В-фикоэритрин. Однако оказалось, что он вступает в реакцию с фенольными соединениями, являющимися главными антиоксидантами растительного происхождения, что приводило к систематически заниженным результатам определения АОА. Поэтому на фирме Brunswick Laboratories впервые применили другое, более стабильное, флуоресцирующее соединение – флуоресцеин. Метод, основанный на поглощении кислородных радикалов (ORAC), – относительно простой и чувствительный, но длительный по времени (около 95 мин на определение) и требует наличия флуоресцентного детектора. В этой системе 2,2'-азо-бис-(2-амидинопропан) дигидрохлорид (AAPH, см. рис. 1) используется в качестве источника перекисных радикалов.

Утверждается, что существует шесть наиболее вредных кислородных реакционноспособных частиц: пероксидные (ROO^{\cdot}) и гидроксильный (HO^{\cdot}) радикалы, супероксид-ион (O_2^-), синглетный кислород (1O_2), перекись водорода H_2O_2 и пероксинитрит ($OONO^{\cdot}$). Метод ORAC измеряет только антиокислительную активность против пероксидного и гидроксильного радикалов, но в дальнейшем планируется

распространить его и на другие вредные реакционноспособные частицы. Указанным методом (ORAC) может быть определена антиокислительная активность как водорастворимых, так и жирорастворимых объектов, таких как пищевые продукты, напитки, химикаты, добавки, плазма и сыворотка крови, моча и т.д. При этом не требуется практически никакой предварительной пробоподготовки, за исключением того, что биологические образцы перед определением должны соответствующим образом храниться (в сухом льду). Тем не менее анализ одного образца занимает более 1,5 ч. В качестве стандартных соединений применяются *Тролокс* (определение пероксидов) и галловая кислота (гидроксил-радикалы). Соответственно, единицей измерения в методе ORAC является микромоль стандарта на единицу массы или объема.

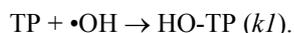
Метод Гуо и Янга [22] основан на определении антиокислительной активности соединений по их способности связывать гидроксил-радикалы $\text{HO}\cdot$, которые, как полагают, являются наиболее реакционноспособными в физиологических условиях и ответственными за множество нежелательных в организме последствий, таких как онкогенез, атеросклероз и мутации ДНК.

В модельной системе, предложенной авторами, генерация гидроксил-ионов протекает из кислорода при участии комплексов железа с этилендиаминтетрауксусной кислотой (EDTA) по следующей схеме:



Добавления перекиси водорода в этом случае не требуется.

Образованные радикалы $\text{HO}\cdot$ взаимодействуют с терефталевой кислотой (TP) с образованием флуоресцирующей 2-гидрокситерефталевой кислоты (HO-TP):



С этой реакцией может конкурировать реакция связывания гидроксил-радикалов антиоксидантами:



Стехиометрия реакции такова, что наблюдается прямая и пропорциональная корреляция в логарифмических координатах между количеством добавленного антиоксиданта (на рисунке обозначено как $\log[\text{Cscav}]$) и отношением интенсивностей флуоресценции в свободной системе и в присутствии антиоксиданта ($\log[\text{F}_0/\text{Fscav}-1]$). На рисунке 7 приведены зависимости для двух антиоксидантов: Microhydrin® (1) и MegaHydrin™ (2).

Длина волны возбуждения составляла 326 нм, а испускания – 432 нм.

Эта методика была применена для анализа пищевых гидридных антиоксидантов Microhydrin® и MegaHydrin™, являющихся торговыми марками компаний RBC-Globenet (Ирвинг, Техас, США) и Flantech Group (Коттонвуд, Аризона, США), соответственно. Microhydrin® представляет собой коллоидное соединение на основе сикагеля, а MegaHydrin™ – полиминеральное коллоидное образование, при этом оба с включенными в структуру гидрид-ионами.

Электрохимические методы

Схема вольтамперометрического определения антиокислительной активности фенолкарбоновых кислот растительного происхождения на ДНК-модифицированном углеродном трафаретном электроде описана в [23]. Схема основана на известном способе количественного определения нативной двунитовой ДНК с использованием комплекса $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ в качестве электрохимического маркера. Количество $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$, связанного со слоем ДНК – снижается по мере разрушения последней в результате реакции расщепления. На антиокислительную активность тестировали два стандартных соединения фенолкарбоновых кислот и четыре экстракта растительного происхождения.

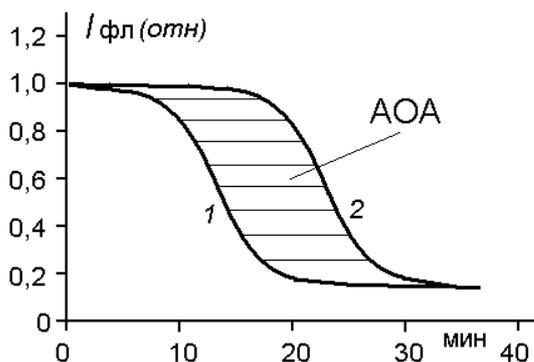


Рис. 6. Принцип определения АОА по изменению продолжительности флуоресценции [17–21]. Кривая 1 – кинетика флуоресценции в отсутствие антиоксидантов, кривая 2 – то же, в присутствии антиоксидантов

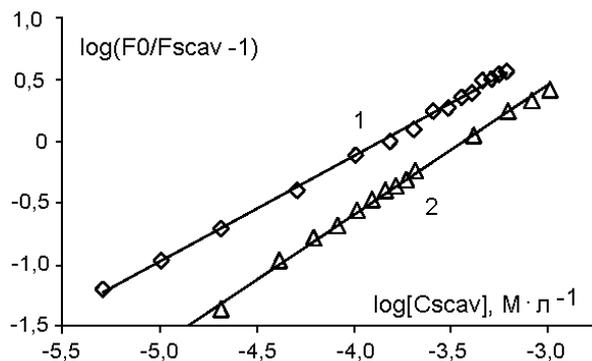


Рис. 7. Зависимость в логарифмических координатах отношения интенсивностей свободной флуоресценции и флуоресценции в присутствии антиоксидантов ($F_0/F_{scav}-1$) от количества добавленного антиоксиданта $[C_{scav}]$, по данным авторов [22]. Антиоксиданты: 1 – Microhydrin®; 2 – MegaHydrin™

Использовался компьютеризованный вольтамперометрический анализатор ECA pol 110 (Istran, Словакия) с двухэлектродной системой (FACH, Словакия), включающей рабочий электрод поверхностью 25 мм^2 вместе с хлорсеребряным электродом сравнения и отдельным платиновым электродом, использованным для дифференциальной пульсирующей вольтамперометрии. Измерения проводили в стеклянной вольтамперометрической ячейке (10 мл) при температуре $22 \text{ }^\circ\text{C}$. УФ-видимый спектрофотометр UV-1601 (Shimadzu, Япония) использовался для оптических измерений радикалов по методу DPPH. ВЭЖХ анализы выполняли на приборе HP 1100 (Hewlett-Packard, Германия). Комплексное соединение $[\text{Co}(\text{phen})_3](\text{ClO}_4)_3$ синтезировали согласно [24]. Растительные экстракты получали экстракцией 2 г сухого растения в 100 мл воды при $70 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 1 ч.

Нанесение ДНК на электрод осуществляли без какой-либо предварительной электрохимической обработки. 5 мкл раствора ДНК наносили на поверхность электрода и оставляли на ночь для высыхания.

Модифицированный ДНК электрод погружался в раствор фосфатного буфера при pH 7,0, после чего споласкивался водой. Комплекс маркера $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ сорбировали на электроде из его раствора концентрации $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ в 10 mM фосфатном буфере при перемешивании в течение 120 секунд. Дифференциальная импульсная вольтамперограмма получалась немедленно (без замены среды) при развертке от +0,4 до $-0,5 \text{ V}$ на амплитуде импульса 100 мВ при скорости развертки 25 мВ/с. С использованием программного обеспечения записывали величину тока через каждые 2 мВ развертки.

Вольтамперометрическое определение активности антиоксидантов на основе измерения вольтамперометрической характеристики катодного восстановления кислорода в апротонных растворителях предложено авторами [25–26]. Определены коэффициенты активности для восьми антиоксидантов.

Простой электрохимический способ определения антиокислительной активности флавоноидов, основанный на измерении потенциала полувольты окисления на проточном колоночном электроде, предложен авторами [27]. Сообщается, что электрохимическая активность соединений коррелирует со способностью подавлять перекисное окисление липидов.

Антиокислительная емкость плазмы измерялась циклической вольтамперометрией [28] на приборе Potentiostat Galvanostat Model 273, EG & G (Princeton Applied Research, США). Была использована трехэлектродная система. В качестве рабочего электрода применялся дисковый стеклоуглеродный электрод (Laboratory Instruments, Чехия) диаметром 2 мм. Перед каждым определением электрод полировали. Платиновая проволока служила вспомогательным электродом, а насыщенный каломельный электрод являлся электродом сравнения. Образец плазмы в количестве 0,3 мл смешивался с фосфатным буферным раствором (1,5 мл) при pH=7,4. Циклические вольтамперограммы (рис. 8) снимали в диапазоне от $-0,4$ до $-0,8 \text{ V}$ со скоростью развертки 200 мВ/с. Каждый образец анализировался дважды.

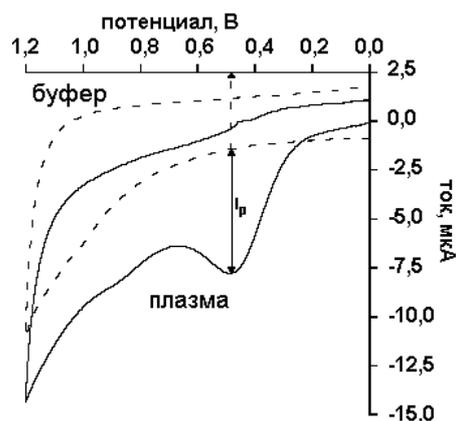


Рис. 8. Иллюстрация принципа определения АОА из кривых циклической вольтамперометрии согласно [28]

Исследования антиокислительных свойств плазмы крови проводились на группе добровольцев из 29 человек, в возрасте от 18 до 32 лет, которым назначали силимарин или плацебо. Результаты определения АОА плазмы у обоих типов пациентов позволяют получить удовлетворительную информацию об антиокислительном состоянии плазмы. Метод подходит для контроля низкомолекулярных антиоксидантов в пищевых продуктах. Циклическая вольтамперометрия способна контролировать снижение АОА плазмы и эффективность диализа. Метод относительно простой и надежный для определения антиокислительной активности плазмы или сыворотки крови.

Методы, использующие биологические маркеры

Авторы [29] описали анализ восстанавливающей способности и количественную оценку антиокислительной активности *in vitro* гидрида кремния и семи коммерчески доступных водорастворимых антиоксидантов. Эксперимент включает определение окислительно-восстановительных потенциалов, pH и клеточную фотосенсибилизацию методом спектрофотометрии, что позволило объективно оценить антиокислительную эффективность соединений.

Для оценки абсолютной восстановительной способности антиоксидантов было использовано модифицированное Кларком (1923) уравнение Нернста, связывающее парциальное давление водорода и восстановительный потенциал в единицах гН:

$$E_h = 1,23 - RT(pH/F + \ln[1/P_o]/4F),$$

где E_h – измеренный окислительно-восстановительный потенциал; F – константа Фарадея; R – универсальная газовая постоянная; T – абсолютная температура. Число 1,23 – разность измеренного потенциала при парциальном давлении кислорода в одну атмосферу и в растворе при том же значении pH. гН определяется как:

$$гН = -\log P_o,$$

где P_o – парциальное давление кислорода.

Величина гН характеризует абсолютный восстановительный потенциал соединения, исключая влияние pH на величину измеренного окислительно-восстановительного потенциала. Сравнивая величины гН до и после обработки антиоксидантом, можно получить представление о восстановительной активности соединения, а заодно и сравнить их (табл. 1).

Таблица 1. Значения величин $\Delta гН$ ряда коммерческих антиоксидантов.

Соединение	$\Delta гН$	+/-	Стандартное отклонение
Microhydrin®	6,83	0,03	0,04
Total Antioxidant	5,48	0,04	0,05
Vitamin C	4,54	0,03	0,05
Antioxidant Plus	3,02	0,04	0,03
Multi Vitamin	2,06	0,03	0,04
CoQ ₁₀	1,45	0,02	0,03
Zinc	0,26	0,03	0,04
Nanohydrate®	-0,55	0,03	0,05

Для измерений окислительно-восстановительного потенциала и pH в сосуд с магнитной мешалкой помещали 250 мл бидистиллированной воды и измеряли pH на приборе «Hanna HI 9023», (Hanna Instruments, США) и ред-окс потенциал на приборе «Orion quickcheck Model 108» (Beverly, США). 100 мг антиоксиданта помещали в 250 мл бидистиллированной воды, перемешивали в течение 2-х минут и снова измеряли pH и редокс-потенциал, разность потенциалов и дает величину ΔrH .

Однако измерение восстановительного потенциала хорошо только *in vitro*, проблема моделирования *in vivo* при этом сохраняется. В самом деле, если сделать предположение о том, что наилучшими антиоксидантами являются энергичные восстановители, то можно прийти до абсурдного вывода об эффективности таких соединений, как борогидрид натрия $NaBH_4$ или алюмогидрид лития $LiAlH_4$, которые в физиологических условиях окажутся, скорее всего, сильнейшими цитотоксикантами. Поэтому наряду с величиной абсолютного восстановительного потенциала авторы оценили и эффективность антиоксидантов на живой модели.

В качестве таковой подходят яйцеклетки китайского хомяка (СНО), а в качестве удобных для контроля реакционноспособных кислородных частиц – поглощающие излучение радикалы красителя малахитового зеленого. Генерирование свободных радикалов из молекул красителя осуществляется при облучении прокрашенных им клеток при помощи гелий-неонового лазера при длине волны 632,8 нм в течение 1 ч и мощности 2000 Вт/м². Это и есть процесс фотосенсибилизации клеток. По ее завершении аликвоты по 500 мкл взвеси клеток с содержанием 6×10^4 клеток/мл переносили в две 1 мл кюветы, в одну из которых добавляли 500 мкл бидистиллированной воды, а в другую – 500 мкл раствора антиоксиданта концентрацией 400 мкл/мл. Кюветы стояли в течение 15 мин, после чего определяли поглощение в каждой из них на длине волны 629 нм.

Процент восстановления свободных радикалов определяли по формуле:

$$\% \text{ Reduced} = 100\% \left\{ \frac{A(629)_{\text{sam}} - A(629)_{\text{min}}}{A(629)_{\text{max}} - A(629)_{\text{min}}} \right\}.$$

Затем каждый образец клеток окрашивался в течение 30 мин смесью «живой/мертвый» («LIVE/DEAD®», L-3224, Molecular Probes, США), состоящей из 1 мл 2 мкМ кальцеина-АМ и 4 мкМ этидиум гомодимера-1 (EthD-1), и анализировали методом флуоресцентной микроскопии. Результаты исследований с фотосенсибилизацией клеток приведены в таблице 2.

Многие из антиокислителей оказались способными связывать свободные радикалы, сохраняя при этом жизнеспособность клеток. Оценка жизнеспособности основана на том, что кальцеин АМ, взаимодействуя с внутриклеточной эстеразной активностью в живой клетке, образует флуоресцирующие при 530 нм (зеленый цвет) продукты [30]. Если клетка утратила жизнеспособность, интенсивность флуоресценции резко снижается, при этом проникающий через клеточную мембрану EthD-1 взаимодействует с ДНК, генерируя интенсивную красную флуоресценцию [31].

Достоинства и слабые места использования окисления протеинов в качестве маркера окислительного стресса *in vivo* обсуждаются авторами [32]. Утверждается, что протеины имеют преимущество по сравнению с такими маркерами, как продукты перекисного окисления или ДНК, потому, что всякая модификация протеинов весьма сильно отражается на их биологических свойствах. К тому же продукты модификации (окисления) протеинов относительно стабильны и легко детектируемы. Вид их модификации позволяет более точно определить повреждающие механизмы и факторы.

Таблица 2. Восстановление свободных радикалов в клетках

Соединение	% Reduced	+/-	Стандартное отклонение
Microhydrin®	91,6	0,39	0,04
Total Antioxidant	77,7	0,22	0,05
Vitamin C	71,0	0,40	0,05
Antioxidant Plus	67,0	0,56	0,03
Multi Vitamin	52,3	0,58	0,04
CoQ ₁₀	25,1	0,42	0,03
Zinc	15,9	0,46	0,04
Nanohydrate®	1,8	0,36	0,05

Окислительное повреждение ДНК радикалами, образующимися в реакции Фентона, с последующим анализом продуктов окисления использовано авторами [33] для оценки хемопротекторной и антиокислительной активности соединений. 250 мкг ДНК инкубируется в присутствии (500–600 мкМ) или без антиоксидантов в растворе диметилсульфоксида (<5%) в трис-буфере при 37 °С в течение 15 мин. Затем добавляются реагенты Фентона (25 мкМ CuSO₄; 0,1–3 мМ H₂O₂; 100 мкМ NTA; 100 мкМ аскорбиновой кислоты), продуцирующие гидроксил-радикалы и смесь инкубируется еще 45 мин при той же температуре. После инкубации ДНК осаждается этанолом с хлористым натрием. ДНК, содержащая образованные 8-оксопроизводные гуанозина, анализируется после маркирования радиоактивным ³²P по методу, описанному [34].

Антиокислительная активность кверцетина в лизосомальных фракциях печени мыши изучалась авторами [35] с использованием гидрофильного генератора радикалов 2,2'-азо-бис-(2-амидинопропан)-дигидрохлорида (AAPH) и гидрофобного генератора радикалов 2,2'-азо-бис-(2,4-диметилвалеронитрила) (AMVN). Ингибируемое кверцетином лизосомальное пероксиокисление липидов измерялось по методу TBARS с реакционными частицами тиобарбитуровой кислоты. Отмечается, что антиокислительная активность кверцетина на модели с гидрофильным генерированием радикалов оказалась выше. Синтетический жирорастворимый антиоксидант ди-трет-бутил-п-крезол оказался более активен в реакциях окисления липидов, нежели кверцетин и тем более, чем рутин – гликозид кверцетина. Изучение ингибирующего влияния антиокислительной активности всех рацематов альфа-токоферола, 2,6-ди-трет-бутил-п-крезола (BHT) и *Тролокса* на образование реакционных частиц тиобарбитуровой кислоты (TBARS) и короткоцепочечных альдегидов в гомогенатах печени крыс исследовали авторы [46]. Концентрации TBARS измеряли флуориметрически, а альдегиды определялись методом газовой хроматографии после дериватизации пробы метилгидразином. Показано, что содержание TBARS и альдегидов в гомогенатах печени в процессе пробоподготовки снижается в присутствии антиоксидантов. Предполагается, что эти вещества образуются в результате автоокисления гомогенатов в процессе подготовки пробы. Наиболее эффективным ингибитором образования альдегидов оказался токоферол, а накопление TBARS в максимальной степени подавляется *Тролоксом*.

Выводы

В заключение хочется отметить объективную невозможность существования не то что единого метода для оценки антиокислительной активности соединений, но даже возможности сравнения результатов, полученных разными методами. И связано это, очевидно, с многообразием протекающих в природе радикальных процессов. Одно дело, когда определяется антиокислительная активность соединения (или группы соединений), применяемого для стабилизации химических продуктов и полимеров, и совсем другое – влияние антиоксидантов на процессы, протекающие в живой клетке. В результате каждый исследователь выбирает готовый, создает новый или модифицирует уже известный метод, исходя из своих целей и возможностей. В обзоре не рассматривались стандартизованные инструментальные способы (ВЭЖХ, ГЖХ) определения индивидуальных антиоксидантов, поскольку эти методы имеют частные приложения и едва ли применимы к задачам определения АОА сложных смесей и биологических объектов.

Список литературы

1. Wayne D.D., Burton G.W., Ingold K.U., Locke S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins // *FEBS Letters*. 1985. V. 187. P. 33–37.
2. Tubaro F., Ghiselli A., Rapuzzi P., Maiorino M., Ursini F.: Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics // *Free Radicals in Biology and Medicine*. 1998. V. 24. P. 1228–1234.
3. Lussignoli S., Fraccaroli M., Andrioli G., Brocco G., Bellavite P. A microplate-based colorimetric assay of the total peroxy radical trapping capability of human plasma // *Analytical Biochemistry*. 1999. № 269. P. 38–44.
4. Kampa M., Nistikaki A., Tsaousis V., Maliaraki N., Notas G., Castanas E. A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay // *BMC Clinical Pathology*. 2002. V. 2 (<http://www.biomedcentral.com/1472-6890/2/3>).
5. Shea T.B., Rogers E., Ashline D., Ortiz D., Sheu M.-S. Quantification of antioxidant activity in brain tissue homogenates using the 'total equivalent antioxidant capacity' // *Journal of Neuroscience Methods*. 2003. V. 125. P. 55–58.

6. Chung S.-K., Osawa T. Hydroxy radical scavengers from white mustard (*Sinapis alba*) // Food Science and Biotechnology. 1998. V. 7. №4. P. 209–213.
7. Kim M.-Y., Choi S.-W., Chung S.-K. Antioxidative Flavonoids from the Garlic (*Allium sativum* L.) Shoot // Food Science and Biotechnology. 2000. V. 9. №4. P. 199–203.
8. Blois M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical // Nature. 1958. V. 26. P. 1198–1200.
9. Buijnsters M., Bicanic D., Mihai Chirtoc M., Nicoli M.C., Min-Kuo Y. Evaluation of Antioxidative Activity of Some Antioxidants by Means of a Combined Optothermal Window and a DPPH* Free Radical Colorimetry // Analytical Sciences (Japan). Special Issue. 2001. V. 17. P. s544–s546.
10. Alvik A.C., Lovaas E.A high throughput assay for screening of antioxidants. Institute of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Tromso, Norway. 2001. [www.farmasi.uit.no/EN/Erik/Poster Marin Biopros-01-WEB.pdf](http://www.farmasi.uit.no/EN/Erik/Poster%20Marin%20Biopros-01-WEB.pdf).
11. Benzie I.F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: the FRAP assay // Analytical Biochemistry. 1996. V. 239. P. 70–76.
12. Chen I.C., Chang H.C., Yang H.W., Chen G.L. Evaluation of Total Antioxidant Activity of Several Popular Vegetables and Chinese Herbs: A Fast Approach with ABTS/H₂O₂/HRP System in Microplates // Journal of Food and Drug Analysis. 2004. V. 12. №1. P. 29–33.
13. Arnao M. B., Cano A., Hernandez-Ruiz J., Garcia-Canovas F., Acosta M. Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase: a new approach for determining total antioxidant status of foods // Analytical Biochemistry. 1996. V. 236. P. 255–261.
14. Krasovska A., Rosiak D., Czkapiak K., Lukaszewicz M. Chemiluminescence detection of peroxyl radicals and comparison of antioxidant activity of phenolic compounds // Current topics in Biophysics. 2000. V. 24. P. 89–95.
15. Магин Д.В., Измайлов Д.Ю., Попов И.Н., Левин Г., Владимиров Ю.А. Фотохемиллюминесценция как метод изучения антиоксидантной активности в биологических системах. Математическое моделирование // Вопросы медицинской химии. 2000. Т. 4. С. 65–68.
16. Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V.M., Azzolini A., Forseka M.J. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method // AAPS Pharm Sci. 2003. V. 5(2). DOI: 10.1208/ps050220 (www.pharmsci.org)
17. Cao G. H., Alessio H. M. Cutler R. G. Oxygen Radical Absorbency Capacity Assay for Antioxidants // Free Radicals In Biology And Medicine. 1993. V. 3. №14. P. 303–311. (<http://www.brunswicklabs.com/ORAC.pdf>)
18. Cao G., Verdon C.P., Wu A.H.B., Wang H., Prior R.L. Automated-Assay of Oxygen Radical Absorbency Capacity with the Cobas Fara-Ii // Clinical Chemistry. 1995 V. 41. P. 1738–1744.
19. Ehlenfeldt M.K., Prior R.L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001. V. 49. P. 2222–2227.
20. Cao G., Sanchez-Moreno C., Prior R.L. Procyanidins, anthocyanins and antioxidant capacity in wines // Faseb Journal. 2000. V. 14. P. A564–A564.
21. Cao G.H., Shukitt-Hale B., Bickford P.C., Joseph J.A., McEwen J., Prior R.L. Hyperoxia-induced changes in antioxidant capacity and the effect of dietary antioxidants // Journal of Applied Physiology. 1999. V. 86. P. 1817–1822.
22. Yang X.F., Guo X.Q. Fe(II)-EDTA Chelate-Induced Aromatic Hydroxylation of Terephthalate as a New Method for the Evaluation of Hydroxyl Radical-Scavenging Ability // The Analyst. 2001. №126. P. 928–932.
23. Labuda J., Bučková M., Heilerová L., Čaniová-Žiaková A., Brandšterová E., Mattusch J., Wennrich R. Detection of Antioxidative Activity of Plant Extracts at the DNA-Modified Screen-Printed Electrode // Sensors. 2002. V. 2. P. 1–10 (<http://www.mdpi.net>).
24. Korbut O., Bučková M., Tarapčík P., Labuda J., Gründler P. // Journal of Electroanalytical Chemistry. 2001. V. 506. P. 143.
25. Короткова Е.И. Новый способ определения активности антиоксидантов // Журнал физической химии. 2000. Т. 74. №9. С. 1544–1546.
26. Korotkova E.I., Karbainov Y.A., Shevchuk A.V. Study of antioxidant properties by voltammetry // Journal of Electroanalytical Chemistry. 2002. V. 518. №1. P. 56–60.
27. Yang B., Kotani A., Arai K., Kusu F. Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials // Analytical Sciences (Japan). 2001. V. 17. P. 599–604.
28. Psotová J., Zahálková J., Hrbáč J., Šimánek V., Bartek J. Determination of total antioxidant capacity in plasma by cyclic voltammetry. Two case reports // Biomedical Papers. 2001. V. 145. №2. P. 81–83.
29. Stephanson C.J., Stephanson A.M., Flanagan G.P. Antioxidant capability and efficacy of Mega-H silica hydride, an antioxidant dietary supplement, by in vitro cellular analysis using photosensitization and fluorescence detection // Journal of Medicinal Food. 2002. №5. P. 9–16.
30. Hayes A.W. (ed.) Principles and Methods of Toxicology. Raven Press, 1994.
31. Hodder P.S., Beeson C., Ruzicka J. Equilibrium and Kinetic Measurements of Muscarinic Receptor Antagonism on Living Cells Using Bead Injection Spectroscopy // Analytical Chemistry. 2000. V. 72. P. 3109–3115.
32. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples // Drug Metabolism Reviews. 2000. V. 32. №3-4. P. 307–326.
33. Srinivasan P., Vadhanam M.V., Arif J.M., Gupta R.C. A rapid screening assay for antioxidant potential of natural and synthetic agents *in vitro* // International Journal of Oncology. 2002. V. 20. P. 983–986.

34. Devanboyina U., Gupta R. C. Sensitive detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by 32P-postlabeling assay and the basal levels in rat tissues // *Carcinogenesis*. 1996. V. 17. P. 917–924.
35. Nakagawa K., Kawagoe M., Yoshimura M., Arata H., Minamikawa T., Nakamura M., Matsumoto A. Differential Effects of Flavonoid Quercetin on Oxidative Damages Induced by Hydrophilic and Lipophilic Radical Generators in Hepatic Lysosomal Fractions of Mice // *Journal of Health Science*. 2000. V. 46. №6. P. 509–512.
36. Aejmelaeus R., Ketela T. M., Pirttila T., Hervonen A., Alho H. Unidentified antioxidant defenses of human plasma in immobilized patients: a possible relation to basic metabolic rate// *Free Radicals Research*. 1997. V. 26. P. 335–341.
37. Ghiselli A., Serafini M., Maiani G., Azzini E., Ferro-Luzzi A. A fluorescence- based method for measuring total plasma antioxidant capability // *Free Radicals In Biology And Medicine*. 1995. V. 18. P. 29–36.
38. DeLange R.J., Glazer A.N. Phycoerythrin fluorescence-based assay for peroxy radicals: a screen for biologically relevant protective agents// *Analytical Biochemistry*. 1989. V. 177. P. 300–306.
39. Glazer A. N. Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species// *Methods of Enzymology*. 1990. V. 186. P. 161–168.
40. Abella A., Messaoudi C., Laurent D., Marot D., Chalas J., Breux J., Claise C., Lindenbaum A. A method for simultaneous determination of plasma and erythrocyte antioxidant status. Evaluation of the antioxidant activity of vitamin E in healthy volunteers//*British Journal of Clinical Pharmacology*. 1996. V. 42. P. 737–741.
41. Benzie I.F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: the FRAP assay // *Analytical Biochemistry*. 1996. V. 239. P. 70–76.
42. Dasgupta A., Malhotra D., Levy H., Marcadis D., Blackwell W., Johnston D. Decreased total antioxidant capacity but normal lipid hydroperoxide concentrations in sera of critically ill patients // *Life Sciences*. 1997. V. 60. P. 335–340.
43. Dasgupta A., Zdunek T. In vitro lipid peroxidation of human serum catalyzed by cupric ion: antioxidant rather than prooxidant role of ascorbate // *Life Sciences*. 1992 V. 50. P. 875–882.
44. Dat J.F., Foyer C.H., Scott I.M. Changes in Salicylic Acid and Antioxidants during Induced Thermotolerance in Mustard Seedlings // *Plant Physiology*. 1998. V. 118. P. 1455–1461.
45. Kinjo J., Nagao T., Tanaka T., Nonaka G., Okawa M., Nohara T., Okabe H. Activity-Guided Fractionation of Green Tea Extract with Antiproliferative Activity against Human Stomach Cancer Cells // *Biol.Pharm.Bull. (Pharmaceutical Society of Japan)*. 2002. V. 25. №9. P. 1238–1240.
46. Balthazary S.T., Sallman H.-P., Fuhrmann H. The determination of TBA-Reactive substances and alkenals in the presence of antioxidants // *Acta Veterinaria Hungarica*. 2000. V. 47. №2. P. 155–159.

Поступило в редакцию 12 августа 2004 г.