

УДК 577.175.6:547.999.3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ БИОАНТИОКСИДАНТОВ И ИХ СМЕСЕЙ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

© *Н.Н. Сажина*

*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина 4,
Москва, 119334 (Россия), e-mail: Natnik48s@yandex.ru*

Для изучения антиоксидантных свойств различных биологических объектов в настоящее время широко используются простые и оперативные электрохимические методы. Одним из них является амперометрический метод, который применяется в разных сферах науки, технологии и медицины для определения антиоксидантной активности (АОА) различных напитков, экстрактов и биологических жидкостей, а также суммарного содержания присутствующих в них антиоксидантов (АО).

В настоящей работе проведены измерения АОА (электрохимической окисляемости) некоторых известных индивидуальных АО и их смесей амперометрическим методом. Определены коэффициенты их окисляемости. Полученные значения АОА хорошо коррелируют с АОА этих соединений, измеренных другими методами. Для большинства комбинаций бинарных смесей использованных АО наблюдается совпадение экспериментальных значений АОА и расчетных с использованием полученных коэффициентов окисляемости для каждого компонента смеси. Это свидетельствует об отсутствии взаимодействия между ними (синергизма или антагонизма) в процессе окисления. Исключение составили несколько смесей с меньшим значением измеренной АОА по сравнению с расчетной (антагонизм). При электрохимическом окислении смеси «глутатион окисленный + аскорбиновая кислота» происходит, по-видимому, частичное восстановление глутатиона аскорбиновой кислотой, что приводит к превышению измеренного значения АОА над расчетным. Полученные результаты могут быть полезными при работе с приборами, основанными на амперометрическом методе.

Ключевые слова: антиоксиданты, антиоксидантная активность, окисление, амперометрический метод.

Введение

В настоящее время для определения антиоксидантной активности (АОА) различных биологических объектов: экстрактов лекарственных трав, напитков, БАДов, плазмы крови и пр. – широко используются оперативные электрохимические методы [1–12]. Одним из таких методов является разработанный Я.И. Яшиным с сотрудниками амперометрический метод [5], который использовался в настоящей работе. В монографии разработчиков [6] и статье [7] представлен широкий обзор исследований, проведенных ими с использованием данного метода и ВЭЖХ, в которых определялось в основном суммарное содержание АО в различных природных объектах. Автор работы [13] обратил внимание на особенности определения суммарной концентрации АО амперометрическим методом. При анализе кинетики процесса окисления смесей АО он показал, что этот метод вполне подходит для измерения АОА, но может давать существенные погрешности при измерении суммарного содержания АО.

Сравнительные же результаты определения амперометрическим методом окислительных характеристик индивидуальных АО и сравнение их с антиокислительными параметрами, полученными другими методами, в литературе отсутствуют.

Цель настоящей работы – определение АОА и констант окисления некоторых известных индивиду-

Сажина Наталья Николаевна – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник, e-mail: Natnik48s@yandex.ru

альных биоантиоксидантов и их бинарных смесей амперометрическим методом и анализ полученных результатов.

Экспериментальная часть

В качестве объектов исследования были выбраны: мочевая кислота (МК), глутатион восстановленный (Гл.) и окисленный (Гл.ок.), тролокс (водорастворимый аналог витамина Е), аскорбиновая кислота (АК), галловая кислота (ГК), присутствующие во многих продуктах питания, синтетические АО: мексидол (Мкс.) и фенозан калия (ФК), используемые как ингибиторы окисления в различных биологических системах.

Измерения проводились на приборе «Цвет-Яуза-01-АА», в котором реализован амперометрический метод. Сущность этого метода заключается в измерении тока, возникающего при электрохимическом окислении исследуемого вещества на поверхности стеклоуглеродного анода с потенциалом +1,3 В [8]. При таких значениях потенциала происходит окисление фенольных (R–OH), тиоловых (R–SH) и других соединений, протекающее по схеме $R-OH \rightarrow R-O^{\cdot} + e^{-} + H^{+}$, и может быть использовано как модельное при измерении активности поглощения свободных радикалов [9–11]. При прохождении пробы через ячейку регистрируется ток электрохимического окисления АО в зависимости от времени. Межэлектродное расстояние составляет 0,5 мм, размер анода ≈ 5 мм, скорость прокачки элюента (слабый раствор ортофосфорной кислоты) $\sim 1,25$ мл/мин. Сигнал амперометрического детектора фиксируется как интеграл по времени кривой окисления (площади под кривой тока $S = \int i \cdot dt$ в нА·с). Для индивидуальных соединений $i = k \cdot C$, где k и C – константа окисления и концентрация, соответственно. Для бинарных смесей АО с концентрациями C_1 и C_2 , k_1 и k_2 ток окисления $i = k_1 \cdot C_1 + k_2 \cdot C_2$. Время интегрирования примерно одинаково для различных АО и определяется временем прохождения пробы через ячейку. Измерив константы окисляемости для индивидуальных АО (K_i) и зная их концентрации, можно рассчитать площади под кривой тока для бинарных смесей $S_p = K_1 C_1 + K_2 C_2$ и провести сравнение их с экспериментально измеренными (S_3). Погрешность измеренных значений S_3 (СКО – среднеквадратичное отклонение 5–6 идентичных показаний прибора регистрируется на приборе) составила не более 5% [8]. Погрешность измерения концентрации АО $\sim 0,5\%$. Погрешность S_p вычислялась как ошибка суммы двух величин [25].

Результаты и обсуждение

На рисунке 1 представлены зависимости отклика прибора S от концентрации C для шести различных АО (для фенозана прямая $S(C)$ практически совпала с прямой для мексидола, поэтому не приводится), из которых были получены константы окисляемости $K = S/C$, нА·с/мкМ. Самым активным АО оказалась галловая кислота с $K = (384 \pm 16)$ нА·с/мкМ, далее тролокс – 228 ± 8 , мочевая кислота – 219 ± 9 , аскорбиновая кислота – 187 ± 8 , мексидол – 158 ± 8 и глутатион восстановленный – 97 ± 5 нА·с/мкМ. Окисленный глутатион (Гл.ок.) с концентрациями, на порядок большими, дает отклик на уровне шумов (~ 5 нА), поэтому его окисляемость была принята равной нулю.

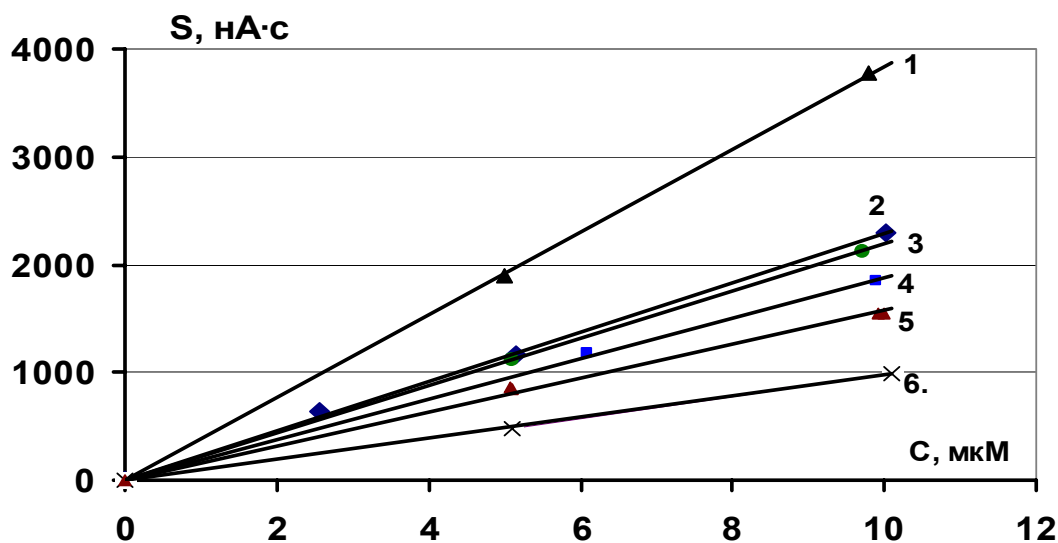


Рис. 1. Зависимости площади под кривой тока окисления S от концентрации C индивидуальных АО: 1 – ГК, 2 – Тр., 3 – МК, 4 – АК, 5 – Мкс., 6 – Гл.

АОА, или электрохимическая окисляемость этих соединений, зависит от структуры их молекул [10] (рис. 2). В частности, для фенольных АО от степени экранирования гидроксильных групп в бензольном кольце, от *орто*-эффекта двух гидроксильных групп или гидроксильной и карбонильной групп. Экранирование ОН-группы приводит к существенному повышению эффективности АО по сравнению с неэкранированным фенолом. *Трет*-бутильные заместители в *орто*-положении повышают электронную плотность на ОН-группе, снижая энергию ее диссоциации [14, 15]. Высокая АОА (окисляемость) галловой кислоты связана с наличием в ее молекуле трех электронодонорных ОН-заместителей, прочность ОН-связи, или энергия диссоциации, $D_{\text{ОН}}=347$ кДж/моль [15], электрохимический потенциал окисления на стеклоуглеродном аноде $\approx 0,4$ В [16]. Для тролокса энергия диссоциации наиболее слабой О-Н связи выше [15], поэтому окисляемость при одних и тех же условиях меньше. В литературе очень мало информации об энергии диссоциации нефенольных АО, а также их параметрах окисления на стеклоуглеродных электродах. Мочевая кислота не относится к фенольным соединениям, но имеет достаточно низкий потенциал окисления. На графитовом электроде в водных средах МК окисляется при потенциале $\approx 0,65$ В, и продуктом двухэлектронного окисления является аллантион [17]. Аскорбиновая кислота является производным моносахарида и сильным восстановителем, и в присутствии кислорода она быстро окисляется с образованием дегидроаскорбиновой кислоты. При электрохимическом окислении происходит разрыв ОН-связей в молекуле АК, при этом молекула теряет два атома водорода. Потенциал окисления АК на графитовом электроде, измеренный в [18], составил $\approx 0,384$ В, а при использовании различных модификаторов поверхности электродов добиваются значительного понижения потенциала ЭХ-окисления [19]. Что касается мексидола и фенозана калия, то они относятся к пространственно затрудненным фенолам и являются, как большинство монофенолов, слабыми ингибиторами и восстановителями. Глутатион – важный ко-фермент для активности глутатионпероксидазы и обеспечивает защиту сульфгидрильных групп протеинов от окисления, сам при этом окисляясь до дисульфида. Отношение восстановленного к окисленному глутатиону есть показатель окислительного стресса [20–22]. На химически модифицированных электродах, функционирующих на принципах электрокатализа, добиваются уменьшения потенциала окисления глутатиона до 0,6 В [21]. Для стеклоуглеродных же электродов окисление происходит с большим перенапряжением, при котором окисляемость глутатиона и чувствительность прибора уменьшаются [20, 22].

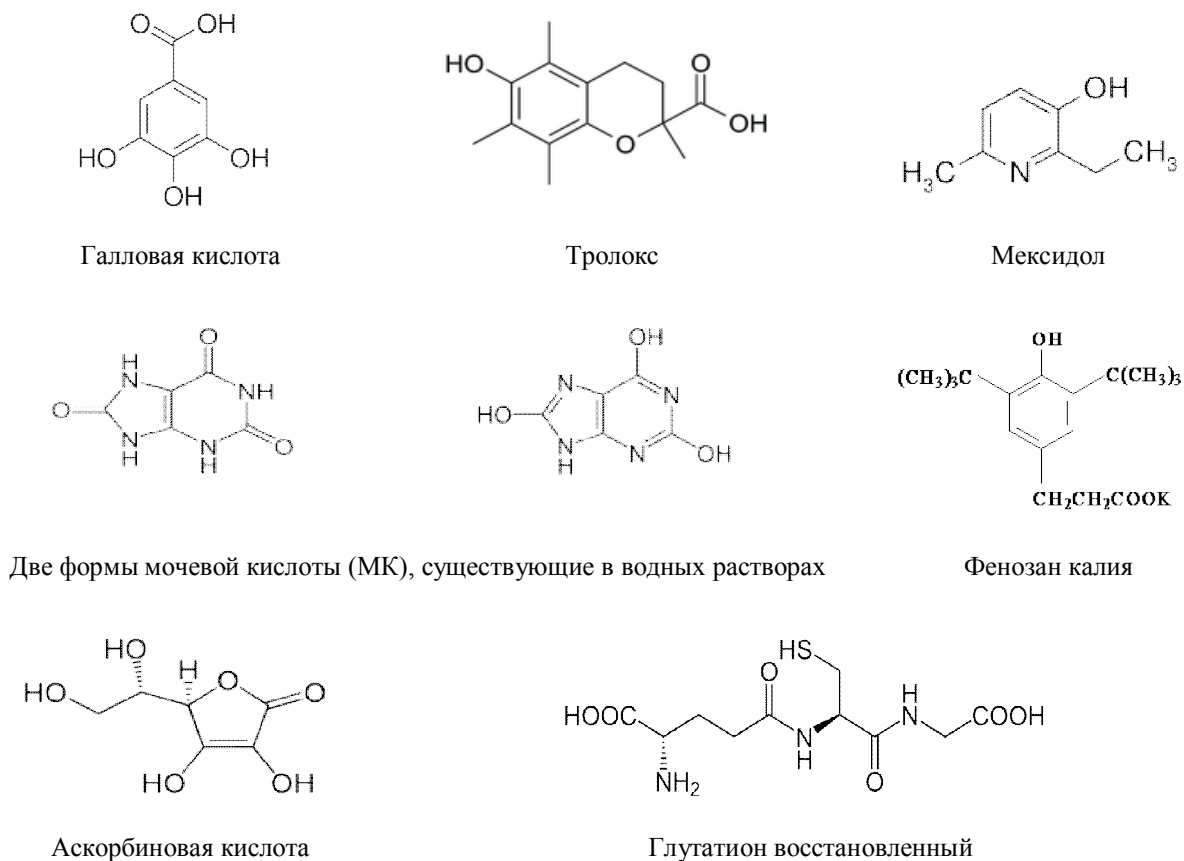


Рис. 2. Структурные формулы использованных соединений

Полученные в настоящей работе значения коэффициентов окисляемости хорошо коррелируют с антиокислительными параметрами этих же соединений, измеренными другими методами [23, 24]. Например, при сравнении окисляемости и антирадикальной активности, определенной хемилюминесцентным методом, коэффициент корреляции составил $r=0,98$ [23]. Для других методов, в которых использовались некоторые из наших АО, также наблюдается неплохая корреляция их окисляемости с АОА [24].

Для выяснения существования взаимодействия между отдельными АО (синергизма или антагонизма) в процессе окисления смеси были проведены измерения АОА (окисляемости) для 15 различных комбинаций бинарных смесей АО (1 : 1). Концентрация всех АО в смесях была одинаковой $C_1=(2,50 \pm 0,01)$ мкМ. На рисунке 3 представлены сравнительные диаграммы расчетных S_p и экспериментальных значений S_3 с соответствующими фактическими погрешностями расчетов и измерений.

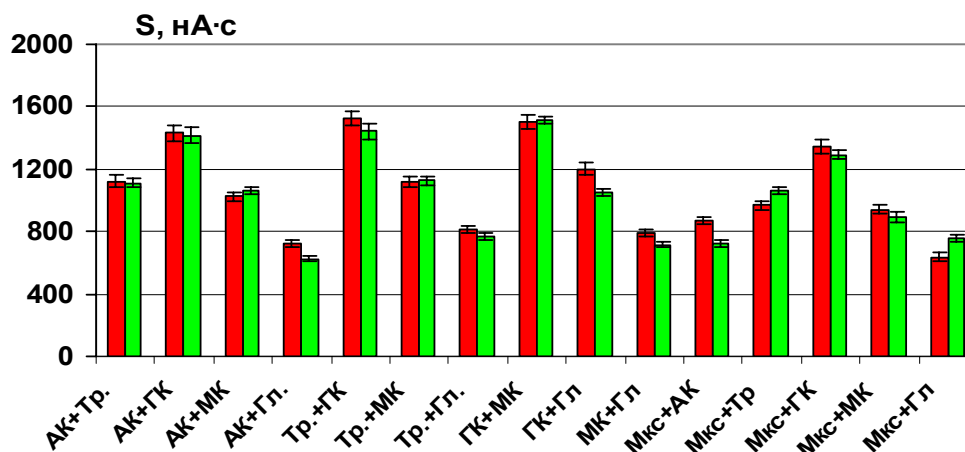


Рис. 3. Диаграммы значений расчетных S_p (левые столбики) и измеренных S_3 (правые столбики) для бинарных смесей (1 : 1) использованных АО: $C_1=C_2 = 2,5$ мкМ

Как видно из рисунка 3, для большинства смесей в пределах ошибок измерений расчетные и экспериментальные значения S совпадают. Это свидетельствует о независимости электрохимического окисления этих АО и отсутствии взаимодействия между ними (синергизма или антагонизма) в процессе окисления. Исключение составляют смеси ГК+Гл., МК+Гл., Мкс+АК, Гл.+АК, для которых измеренные значения S заметно меньше расчетных. Возможно, это связано с химическим антагонизмом этих пар АО, когда при их взаимодействии образуются менее окисляемые соединения. Для смеси с АК, возможно, это объясняется разложением аскорбиновой кислоты при хранении в течение измерений. Смеси Мкс+Гл., Мкс+Тр. демонстрируют превышение измеренного значения S над расчетным, что связано, по-видимому, с усилением окисляемости этих компонент в присутствии друг друга (синергизм). Аналогичные результаты были получены для смесей с удвоенной концентрацией отдельных АО $C_1=5,0$ мкМ. Для смесей использованных соединений с окисленным глутатионом ($K=0$) только у пары Гл.ок.+АК наблюдалось небольшое ($\sim 8-10\%$) превышение S_3 над S_p , что, по-видимому, можно объяснить частичным восстановлением окисленного глутатиона аскорбиновой кислотой.

Выводы

В настоящей работе проведено сравнение АОА (окисляемости) некоторых индивидуальных АО и определены коэффициенты их окисляемости на амперометрическом приборе. Для большинства бинарных смесей этих соединений наблюдается совпадение полученных значений АОА и расчетных с использованием измеренных коэффициентов окисляемости для каждого компонента, что свидетельствует об отсутствии взаимодействия между ними в процессе окисления. В четырех бинарных смесях АО с меньшим значением измеренной АОА по сравнению с расчетной, возможно, имеет место химический антагонизм. При электрохимическом окислении смеси Гл.ок.+АК, вероятно, происходит частичное восстановление Гл.ок. аскорбиновой кислотой, что приводит к превышению измеренного значения АОА над расчетным.

Список литературы

1. Хасанов В.В., Рыжова Г.Л., Мальцева Е.В. Методы исследования антиоксидантов // Химия растительного сырья. 2004. №3. С. 63–95.
2. Абдуллин И.Ф., Турова Е.Н., Будников Г.К. Кулонометрическая оценка антиоксидантной способности экстрактов чая электрогенерированным бромом // Журнал аналитической химии. 2001. Т. 56. №6. С. 627–629.
3. Брайнина Х.З., Иванова А.В., Шарафутдинова Е.Н. Оценка антиоксидантной активности пищевых продуктов методом потенциометрии // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 2004. №4. С. 73–75.
4. Короткова Е.И., Аврамчик О.А., Юсубов М.С., Белоусов М.В., Андреева Т.И. Определение антиоксидантной активности экстрактов растительного сырья методом катодной вольтамперометрии // Химико-фармацевтический журнал. 2003. Т. 37. №9. С. 63–65.
5. Яшин А.Я., Яшин Я.И., Черноусова Н.И., Пахомов В.П. Экспрессный электрохимический метод определения антиоксидантной активности пищевых продуктов. // Пиво и напитки. 2004. №6. С. 44–46.
6. Яшин А.Я., Рыжнев В.Ю., Яшин Я.И., Черноусова Н.И. Природные антиоксиданты. Содержание в пищевых продуктах и их влияние на здоровье и старение человека. М., 2009. С. 124.
7. Федина П.А., Яшин А.Я., Черноусова Н.И. Определение антиоксидантов в продуктах растительного происхождения амперометрическим методом // Химия растительного сырья. 2010. №2. С. 91–97.
8. Яшин А.Я. Инжекционно-проточная система с амперометрическим детектором для селективного определения антиоксидантов в пищевых продуктах и напитках // Российский химический журнал. 2008. Т. LII. №2. С. 130–135.
9. Peyrat-Maillard M.N., Bonnely S., Berset C. Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection // Talanta. 2000. Vol. 51. Pp. 709–715.
10. Van Acker S.A., van Den Berg D.J., Tromp M.N., Griffioen D.H., van Bennekom W.P., van der Vijgh W.J., Bast A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids // Free Radic. Biol. Med. 1996. Vol. 20. Pp. 331–342.
11. Buratti S., Benedetti S., Cosio M.S. Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis // Talanta. 2006. Vol. 10. Pp. 1016–1022.
12. Sazhina N.N., Korotkova E.I., Misin V.M. Electrochemical Methods for the Estimation of Antioxidant Activity of Various Biological Objects // ЛХК. 2012. Vol. 5. N1. Pp. 1–14.
13. Бирюков В.В. Особенности определения концентрации антиоксидантов амперометрическим методом // Химия растительного сырья. 2013. №3. С. 169–172.
14. Рогинский В.А. Фенольные антиоксиданты. Реакционная способность и эффективность. М., 1988. 124 с.
15. Денисов Е.Т., Денисова Т.Г. Реакционная способность природных фенолов // Успехи химии. 2009. Т. 78. №11. С. 1129–1155.
16. Яшин А.Я. ВЭЖХ фенольных кислот – антиоксидантов с амперометрическим детектированием // Сорбционные и хроматографические процессы. 2014. Т. 14, вып. 3. С. 419–427.
17. Troy R.J., Purdy W.C. The coulometric determination of uric acid in serum and urine // Clin. Chim. Acta. 1970. Vol. 27. Pp. 401–408.
18. Jeromerajan Premkumar, Soo Beng Khoo. Electrocatalytic oxidations of biological molecules (ascorbic acid and uric acid) at highly oxidized electrodes // J. Electroanal. Chem. 2005. Vol. 576. N1. Pp. 105–112.
19. Ambrasi Andriano, Morrin Aoife, Smyth Malcolm R., Killarard Antohony. The application of conducting polymers nanoparticle electrodes to sensing of ascorbic acid // J. Anal. chim. acta. 2008. Vol. 609. N1. Pp. 37–43.
20. Шайдарова Л.Г., Гедмина А.В., Жалдак Э.Р., Челнокова И.А., Будников Г.К. Вольтамперометрическое определение тиол-дисульфидного коэффициента по электрокаталитическому отклику электрода, модифицированного гексахлорплатинатом кобальта // Аналитика и контроль. 2015. Т. 19. №1. С. 85–93.
21. Afzal M., Afzal A., Jones A., Armstrong D. A Rapid Method for the Quantification of GSH and GSSG in Biological Samples. In: "Oxidative stress. Biomarkers and antioxidant protocols". N. J.: Humana Press. Totowa. 2002. Pp. 117–122.
22. Яшин А., Яшин Я. Высокоэффективная жидкостная хроматография маркеров окислительного стресса // Аналитика. 2011. Т. 1. С. 34–43.
23. Сажина Н.Н., Попов И.Н., Волков В.А. Исследование антиоксидантных свойств и стехиометрии некоторых биоантиоксидантов двумя хемиллюминесцентными методами // Труды международной научно-практической конференции Евразийского союза ученых. Москва. 2015. С. 165–169.
24. Schlesier K., Harwat M., Bohm V., Bitsch R. Assessment of Antioxidant Activity by Using Different in Vitro Methods // Free Radical Research. 2002. Vol. 36 (2). Pp. 177–187.
25. Зайдель А.Н. Погрешности измерений физических величин. М., 1985. С. 112.

Поступило в редакцию 5 июля 2016 г.

После переработки 30 сентября 2016 г.

Sazhina N.N. DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF VARIOUS BIOANTIOXIDANTS AND THEIR MIXES BY AMMETRIC METHOD

Emanuel Institute of Biochemical Physics Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina, 4, 119334, Moscow (Russia), e-mail: Natnik48s@yandex.ru

For studying of antioxidant properties of various biological objects simple and operative electrochemical methods are widely used now. One of them is the ammetric method which is applied in the different field of science, technology and medicine for antioxidant activity determination of various drinks, herb extracts and biological liquids, and also the total content of the present antioxidants (AOs) in them.

In the present work measurements of AOA (electrochemical oxidizability) of some known individual AO and their mixes are taken by an ammetric method. Coefficients of their oxidizability are defined. The received AOA values well correlate with AOA of the same compounds measured by other methods. For various combinations of binary mixes of the used AOs coincidence of AOA experimental values and calculated values with use of the received oxidizability coefficients for each formulation constituent is observed. It testifies to absence of interaction between them (a synergism or antagonism) in the course of oxidation. An exception several mixes with smaller value of the measured AOA in comparison with calculated made (antagonism). At electrochemical oxidation of the mix "glutathione oxidized+ ascorbic acid " there is, apparently, a partial reduction of glutathione by ascorbic acid that leads to excess of the measured AOA value over calculated. The received results can be useful during the work with devices based on an ammetric method.

Keywords: antioxidant, antioxidant activity, oxidation, ammetric method.

References

1. Hasanov V.V., Rizhova G.L., Malzeva E.V. *Khimia rastitel'nogo syr'ia*, 2004, no. 3, pp. 63–95. (in Russ.).
2. Abdullin I.F., Turova E.N., Budnikov G.K. *Zhurnal analiticheskoy khimii*, 2001, vol. 56, no. 6, pp. 627–629. (in Russ.).
3. Brajnina H.Z., Ivanova A.V., Scharafutdinova E.N. *Izvestia vjizschih uchebnich zavedenij. Pischevaja tehnoljgia*, 2004, no. 4, pp. 73–75. (in Russ.).
4. Korotkova E.I., Avramchik O.A., Jusubov M.S., Belousov M.V., Andreeva T.I. *Khimiko-Farmazevticheskii zhurnal*, 2003, vol. 37, no. 9, pp. 63–65. (in Russ.).
5. Jashin A.Ja., Jashin Ja.I., Chernousova N.I., Pahomov V.P. *Pivo I napitki*, 2004, no. 6, pp. 44–46. (in Russ.).
6. Jashin A.Ja., Rizhnev V.Ju., Jashin Ja.I., Chernousova N.I. *Prirodnie antioksidanti. Soderzhanie v pischevih produktah i ih vlijanie na zdorovie i starenie cheloveka*. [Natural antioxidants. The content in foods and their impact on health and human aging]. Moscow, 2009, pp. 124. (in Russ.).
7. Fedina P.A., Jashin A.Ja., Chernousova N.I. *Khimia rastitel'nogo syr'ia*, 2010, no. 2, pp. 91–97. (in Russ.).
8. Jashin A.Ja. *Rosijiskij khimicheskij zhurnal*, 2008, vol. LII, no. 2, pp. 130–135. (in Russ.).
9. Peyrat-Maillard M.N., Bonnely S., Berset C. *Talanta*, 2000, vol. 51, pp. 709–715.
10. Van Acker S.A., van Den Berg D.J., Tromp M.N., Griffioen D.H., van Bennekom W.P., van der Vijgh W.J., Bast A. *Free Radic. Biol. Med.*, 1996, vol. 20, pp. 331–342.
11. Buratti S., Benedetti S. & Cosio M. S. *Talanta*, 2006, vol. 10, pp. 1016–1022.
12. Sazhina N.N., Korotkova E. I., Misin V.M. *JIK*, 2012, vol. 5, no. 1, pp. 1–14.
13. Biryukov V.V. *Khimia rastitel'nogo syr'ia*, 2013, no. 3, pp. 169–172. (in Russ.).
14. Roginskij V.A. *Fenolnie antioksidanti. Reakcionnaja sposobnostj i effektivnostj*. [Phenolic antioxidants. Reactivity and efficiency]. Moscow, 1988, 124 pp. (in Russ.).
15. Denisov E.T., Denisova T.G. *Uspehi khimii*, 2009, vol. 78, no. 11, pp. 1129–1155. (in Russ.).
16. Jashin A.Ja. *Sorbzionnie i chromatograficheskie prozessi*, 2014, vol. 14, no. 3, pp. 419–427. (in Russ.).
17. Troy R.J., Purdy W.C. *Clin. Chim. Acta.*, 1970, Vol. 27, pp. 401–408.
18. Jeromerajan Premkumar, Soo Beng Khoo. *J. Electroanal. Chem.*, 2005, vol. 576, no. 1, pp. 105–112.
19. Ambrasi Andriano, Morrin Aoife, Smyth Malcolm R., Killarard Antohony. *J. Anal. chim. acta.*, 2008, vol. 609, no. 1, pp. 37–43.
20. Shajdarova L.G., Gedmina A.V., Zhaldak E.R., Chelnokova I.A., Budnikov G.K. *Analitika I control*, 2015, vol. 19, no. 1, pp. 85–93. (in Russ.).
21. Afzal M., Afzal A., Jones A., Armstrong D. A Rapid Method for the Quantification of GSH and GSSG in Biological Samples. In: "Oxidative stress. Biomarkers and antioxidant protocols". N. J.: Humana Press. Totowa, 2002, pp. 117–122.
22. Jashin A., Jashin Ja. *Analitika*, 2011, vol. 1, pp. 34–43. (in Russ.).
23. Sazhina N.N., Popov I.N., Volkov V.A. *Trudi mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferenzii Evrazyskogo sojuza uchenich*. [Proceedings of the International scientific-practical conference of the Eurasian Union scientists]. Moscow, 2015, pp. 165–169. (in Russ.).
24. Schlesier K., Harwat M., Bohm V., Bitsch R. *Free Radical Research*, 2002, vol. 36 (2), pp. 177–187.
25. Zaydel A.N. *Pogreshnosti izmereniy fizicheskikh velichin*. [Errors in measurement of physical quantities]. Moscow, 1985, pp. 112. (in Russ.).

Received July 5, 2016

Revised September 30, 2016