

УДК 615.272.014.425.07
©Коллектив авторов

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ВЕЩЕСТВ ПРИ ОКИСЛЕНИИ ЛИПОПРОТЕИНОВ ЯИЧНОГО ЖЕЛТКА ГАЗОВОЛУОМОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

А.Н. Николаевский, Т.А. Филиппенко, О.П. Книга, В.В. Левкина

Донецкий национальный университет, 83055 г. Донецк - 55,
ул. Университетская, 24 ДонНУ, химический факультет; тел.: (062)3051648;
факс: (062)3051648; эл. почта: alim @ dongu. donetsk. ua

Предложен газоволуометрический метод для определения антиоксидантной активности соединений, в основе которого лежит инициированное ионами железа окисление молекулярным кислородом липопротеинов яичного желтка. Подобраны оптимальные условия, обеспечивающие воспроизводимые результаты по кинетике процесса окисления. Параметром, характеризующим антиоксидантную активность изученных соединений, выбрана концентрация антиоксиданта ($C_{50\%}$), вызывающая снижение в два раза объема поглощенного кислорода. Проанализировано влияние различных факторов на эффективность ингибирования процесса пероксидного окисления липидов фенольными антиоксидантами.

Ключевые слова: липопротеины яичного желтка; пероксидное окисление; антиоксиданты; газоволуометрический метод.

ВВЕДЕНИЕ. Вопросу биологической значимости окислительных процессов в липидах мембран уделяется в последние годы все больше внимания. Пероксидное окисление липидов (ПОЛ), протекающее по свободнорадикальному механизму, является естественным физиологическим процессом [1]. В нормально функционирующем организме образование и расходование пероксидов хорошо сбалансировано, а окисление липидов протекает на определенном стационарном уровне, который поддерживается как структурной организацией липидов, так и различными регуляторными антиоксидантными системами. Нарушение этого равновесия приводит к усилению окисления липидов и других органических веществ, вызывая серьезные негативные изменения в организме. Для поддержания сбалансированности окислительных процессов применяются антиоксиданты (АО), восполняющие недостаток эндогенных АО либо активирующие ферменты антиперекисной защиты. Поиск новых безопасных для человека биоантиоксидантов, а также разработка способов повышения эффективности и избирательности действия ранее известных препаратов представляется весьма актуальной и важной научной и практической проблемой.

Имеющиеся в литературе данные по антиоксидантной активности (АОА) соединений в процессе ПОЛ часто противоречивы даже для такого широко применяемого АО как ионол. Их трудно интерпретировать вследствие разнообразия систем, методов и условий исследований [2]. Выбранные модели исследования далеко не всегда воспроизводят условия окисления в биологических системах. Идентификация природных компонентов клеток, ответственных за протекание химических реакций с участием радикалов, показала, что основное количество радикалов образуется во фракции фосфолипидов. Затрагиваются

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ

прежде всего фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин - важнейшие фосфолипиды клеточных мембран [3]. В водной среде фосфолипиды самопроизвольно формируют бислои за счёт гидрофобных взаимодействий, поэтому биологические системы гетерогенны. С этой точки зрения одной из наиболее удачных тестовых моделей для изучения АОА препаратов является водная эмульсия яичного желтка (ЯЖ) - гетерогенная система, содержащая мембранные структуры клеток (при разведении в фосфатном буфере фосфолипиды ЯЖ образуют бислойные мицеллы - липосомы) и соответствующая по липидно-белковому составу липопротеинам низкой плотности плазмы крови [4]. По сравнению с гомогенатами тканей она доступна, стабильна при хранении и, вместе с тем, отличается высокой окисляемостью кислородом, позволяющей использовать обычные лабораторные методики и аппаратуру для определения уровня ПОЛ и дает возможность качественной оценки АОА различных соединений.

Общепринятыми методами исследования процессов ПОЛ в настоящее время являются хемилюминесцентный (ХЛ) и по измерению продуктов пероксидации, таких как диеновые конъюгаты, малоновый диальдегид, гексаналь, пероксиды [5]. В то же время газовольнометрический метод изучения радикально-цепных процессов окисления (ГВ), широко используемый на практике для других систем, при исследовании ПОЛ применяется редко. Целью данной работы явилось изучение влияния АО на окисление липопротеинов ЯЖ, инициированное солями двухвалентного железа, при газовольнометрическом контроле за процессом.

МЕТОДИКА. Окисление липопротеинов ЯЖ изучали на газовольнометрической установке "Кулон-1" (Завод Института химической физики РАН, датчик измерения давления - фотоэлектронный) в следующих условиях [6]: 37°C, 9% (по массе) дисперсия желтка в фосфатном буфере (рН=7,4; 0,04 М $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 0,14 М NaCl); концентрация Fe^{2+} - $2,5 \cdot 10^{-3}$ М. Из кинетических кривых поглощения кислорода (рис. 1) видно, что окисление идёт с небольшим периодом индукции (τ), обусловленным, по-видимому, действием эндогенных АО желтка, величина которого зависит от продолжительности вымораживания ЯЖ для разрушения природной эмульсии. Из рисунка 1 также видно, что τ слабо зависит от времени инкубации, в то же время начальная скорость поглощения кислорода зависит от времени инкубации и ее максимальное значение в случае вымороженного желтка соответствует 24 часам. Инкубация способствует, по-видимому, накоплению некоторого количества пероксидов, обеспечивающих начальное инициирование цепного процесса. Ряд исследователей для этих целей используют предварительное УФ-облучение растворов [7].

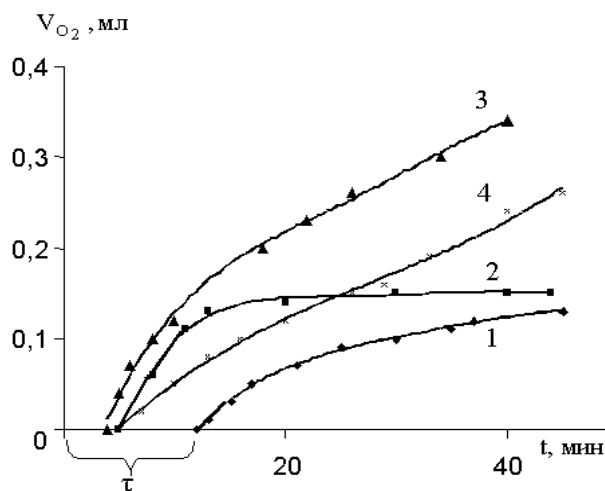


Рисунок 1.

Влияние условий инкубации яичного желтка (1 - без вымораживания, 2 - 4 - вымороженного) на окисляемость его 9% дисперсии в фосфатном буфере в присутствии $[\text{Fe}^{2+}] = 2,5 \cdot 10^{-3}$ М. Продолжительность инкубации: 2 - 4,5 час.; 1,3 - 24 час.; 4 - 48 час.

Для выбора оптимальных условий окисления липопротеинов ЯЖ изучено влияние на скорость процесса температуры, концентраций субстрата и инициатора. Установлено, что выше 40°C скорость окисления (в условиях её независимости от парциального давления кислорода и скорости перемешивания) заметно снижается, а при 50°C поглощение кислорода отсутствует. Это согласуется с представлениями [1] о ферментативном пути инициированного ионами железа окисления биологических систем.

С увеличением содержания в растворе ЯЖ поглощение кислорода возрастает и достигает максимума при концентрации 3,2%, что соответствует соотношению в системе ЯЖ и буфера 1:30 по массе. Дальнейшее повышение концентрации ЯЖ приводит к уменьшению количества поглощенного кислорода. Это может быть следствием как увеличения содержания в системе эндогенных АО, так и повышения роли структурного ингибирования [1] при окислении.

Влияние концентрации инициатора на окисление дисперсии представлено на рисунке 2. Соли двухвалентного железа, как известно [1], в малых концентрациях служат инициаторами окисления, а в больших концентрациях могут и ингибировать ПОЛ. Результаты (рис. 2) подтверждают это, а максимальная скорость окисления достигается при концентрации Fe^{2+} - $5 \cdot 10^{-3}$ М. Окисление дисперсии яичного желтка в оптимальных условиях (37°C, концентрация ЯЖ - 3,2% по массе, суточная инкубация, концентрация Fe^{2+} - $5 \cdot 10^{-3}$ М) позволило получить в параллельных опытах воспроизводимые результаты. Окисление проводили следующим образом: в “нулевом” опыте в реактор помещали 4,9 мл дисперсии ЯЖ, добавляли 0,1 мл 0,025 М водного раствора $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; при исследовании АОА препаратов вводили 0,1 мл раствора ингибитора необходимой концентрации. Реактор соединяли с газовольюметрической установкой. Измеряли объем поглощенного кислорода с течением времени, сравнивая количество O_2 , поглощенное за 20 минут от начала эксперимента в опытах без ингибитора (V_0) и в его присутствии (V). Рассчитывали величину относительного изменения объема поглощенного кислорода $((V_0 - V)/V_0)$. Чем меньше эта величина, тем эффективнее АО в заданных условиях тормозит процесс окисления. Изучая зависимость $(V_0 - V)/V_0$ от концентрации АО, определяли $C_{50\%}$ - концентрацию ингибитора, вызывающую снижение объема поглощенного кислорода на 50%. Этот параметр ($C_{50\%}$) использовали для сравнения активности различных антиоксидантов.

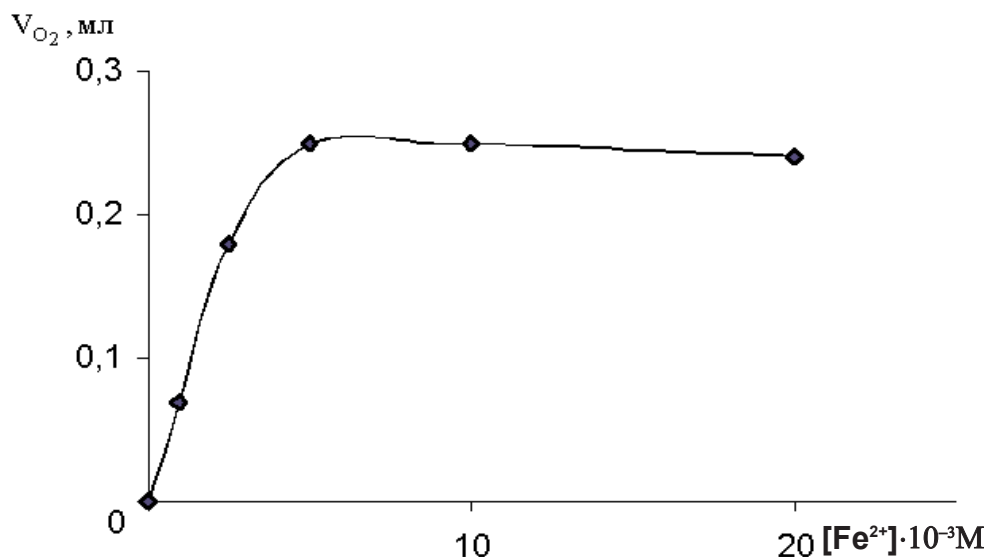


Рисунок 2.

Зависимость объема поглощенного кислорода за 15 минут окисления дисперсии ЯЖ (3,2% по массе) от концентрации инициатора, $t = 37^\circ\text{C}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Результаты исследования влияния АО на процесс окисления липидов в дисперсии ЯЖ представлены на рисунке 3. Из кинетических кривых поглощения кислорода видно, что исследуемые АО тормозят процесс окисления раствора с определенным периодом индукции. Начальные скорости поглощения кислорода слабо зависят от структуры АО, однако, с увеличением глубины процесса возрастает различие в скоростях окисления, которое достигает максимального значения через 20 минут.

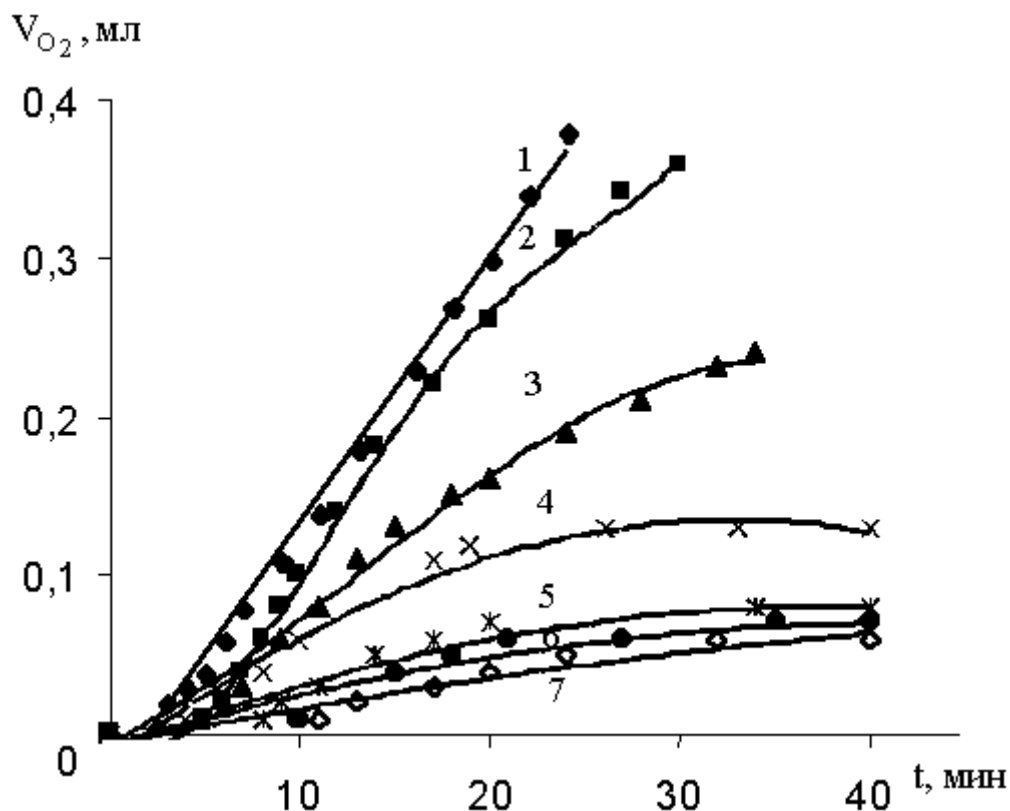
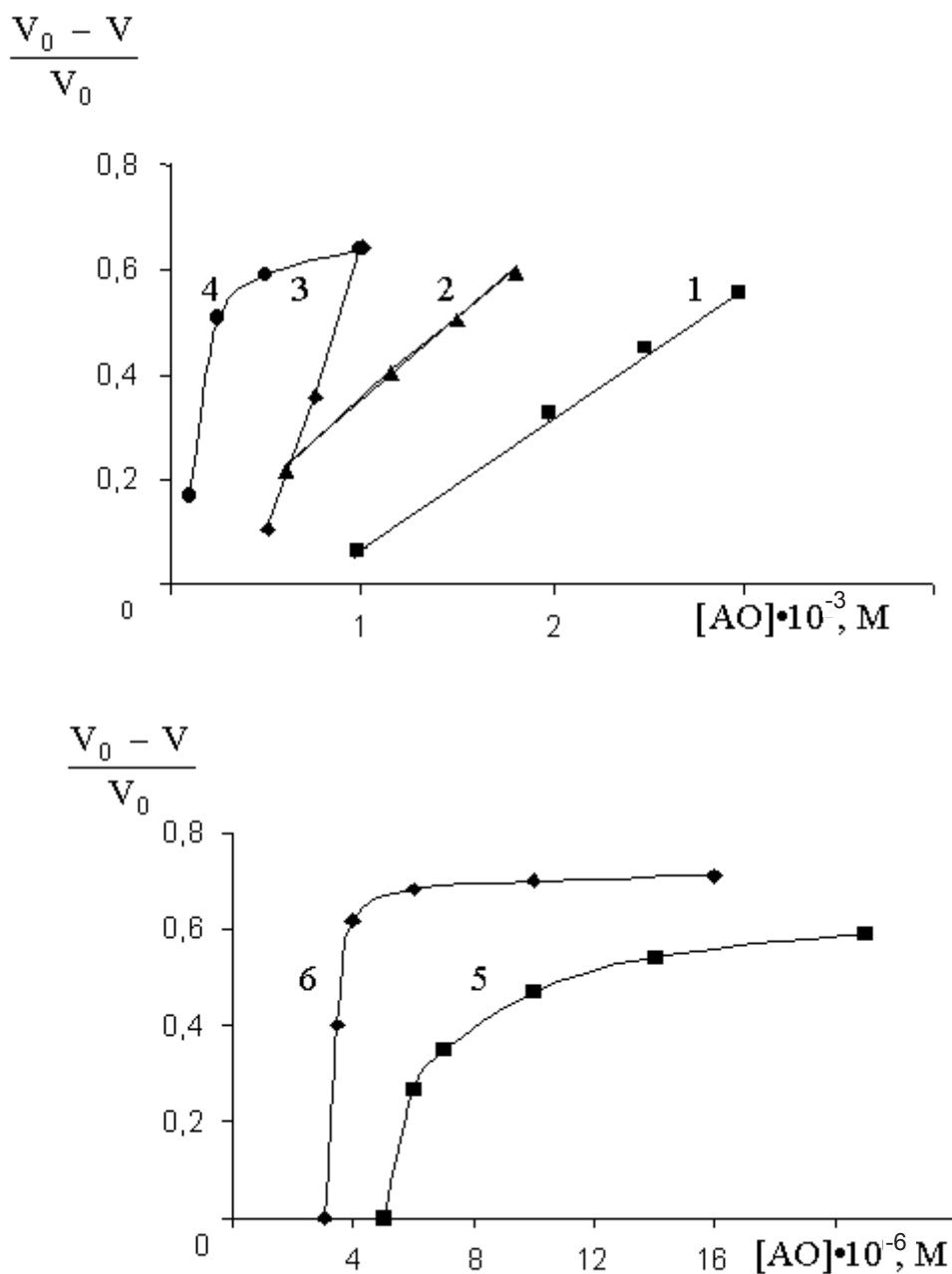


Рисунок 3.

Кинетические кривые поглощения кислорода при железоинициированном окислении липопротеинов ЯЖ без добавок (1) и в присутствии [АО] = $1 \cdot 10^{-3}$ М: 2. феруловой кислоты; 3. эмоксипина; 4. 7-гидрокси-4-метилкумарина; 5. феникаберана; 6. арбидола; 7. ионола.

Влияние концентрации АО на относительное снижение объема поглощенного кислорода различно в зависимости от эффективности антиоксиданта (рис. 4). Более эффективные соединения тормозят окисление при меньших концентрациях. Для них зависимость относительного изменения поглощенного кислорода от концентрации АО имеет запределивающийся характер. Для менее эффективных АО зависимость линейная. Значения $S_{50\%}$ для изученных веществ, расположенные в порядке снижения этого показателя, а значит увеличения АОА соединений, приведены в таблице и сопоставлены с известными из литературы [7-11], полученными на разных моделях ПОЛ методом ХЛ. Видно, что они согласуются в пределах ошибки эксперимента.

**Рисунок 4.**

Влияние концентрации антиоксидантов на относительное снижение объема поглощенного кислорода при окислении ЯЖ в присутствии: 1. феруловой кислоты; 2. эмоксипина; 3. 7-гидрокси-4-метилкумарина; 4. феникаберана; 5. арбидола; 6. ионола

Анализ экспериментальных данных (таблица) показывает, что в изученной системе антиоксидантная активность фенолов, как и в процессах гомогенного радикально-цепного окисления углеводородов, определяется прочностью О--Н-связи реакционного центра и активностью феноксильного радикала, зависящей от возможности делокализации электрона в двойных связях [12], а также наличия объемных заместителей в орто-положении к гидроксогруппе.

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ

Таблица. АО свойства препаратов в экспериментальных моделях инициированного перекисного окисления липидов.

№	Ингибитор	Название	C _{50%} моль/л	Метод	Литературный источник
1		феруλικая кислота	2,7·10 ⁻³	ГВ	
2		этоксинин	1,5·10 ⁻³ 0,9·10 ⁻³ 1,0·10 ⁻³	ГВ ХЛ ХЛ	[11] [13]
3		7-гидрокси-4- метилкумарин	8,5·10 ⁻⁴	ГВ	
4		феникберан	2,5·10 ⁻⁴	ГВ	
5		оснивание арбидола	4,5·10 ⁻⁵	ГВ	
6		арбидол	1,1·10 ⁻⁵ 0,9·10 ⁻⁵ 0,5·10 ⁻⁵	ГВ ХЛ ХЛ	[11] [12]
7		хинон	3,3·10 ⁻⁶ 4,0·10 ⁻⁶ 3,3·10 ⁻⁶ 8,5·10 ⁻⁶	ГВ ХЛ ХЛ ХЛ	[7] [9] [10]

В процессе пероксидации липидов эти факторы очень важны, но в гомогенно-гетерофазной системе существенное влияние на эффективность антиоксидантов оказывает, кроме того, их гидрофобность, определяющая как распределение в системе и содержание в масляной фазе, так и адсорбцию АО на поверхности этой фазы [2, 13]. Эти факторы определяют локальную концентрацию АО в поверхностном слое липосом, а, следовательно, уровень ингибирования процесса ПОЛ.

В изученной тестовой системе окисление происходит на поверхности липосом, состоящей из несущих заряды полярных головок фосфолипидов - фрагментов эфиров фосфорной кислоты и этаноламина. На заряженной поверхности липосом, по-видимому, лучше адсорбируются более полярные молекулы фенолов за счет ориентационного взаимодействия, а также фенолы с π -электронной сопряженной системой за счет дисперсионных взаимодействий. Этим, вероятно, и объясняется выраженная АОА арбидола и феникаберана при достаточно высокой по сравнению с другими фенолами прочности связи реакционного центра в их молекулах. Причем, арбидол, являющийся гидрохлоридом, эффективнее своего основания (см. таблицу), тогда как при жидкофазном окислении этилбензола арбидол не проявляет антиоксидантного действия.

Таким образом, воспроизводимость получаемых кинетических результатов окисления липопротеинов ЯЖ, согласованность их с литературными данными по ингибированию процесса показывает возможность использования газовольюмометрической методики для тестирования в данной системе соединений на антиоксидантную активность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимирова Ю.А., Арчаков А.И. (1972) Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, Наука, М.
2. Frankel E.N. (1999) *Fett/Lipid.*, **101**(12), 450-455.
3. Козлов Ю.П. (1975) в сб.: Биоантиокислители, Наука, М., с.5-14.
4. Клебанов Г.И., Бабенкова И.В., Теселкин Ю.О., Комаров О.С., Владимирова Ю.А. (1988) *Лабор. дело*, №1, 59-62.
5. Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., Mc Donald S., Robards K. (2002) *Analyst*, **127**, 183-198.
6. Клебанов Г.И., Теселкин Ю.О., Владимирова Ю.А. (1988) *Биофизика*, **33**, 512-516.
7. Ли Х., Владимирова Ю.А., Деев А.И. (1990) *Биофизика*, **35**, 82-85.
8. Герчиков А.Я., Гарифуллина Г.Г., Ахметишина А.Н., Галеев Ф.С. (2000) *Хим.-фарм. ж.*, **34**(12), 3-4.
9. Владимирова Ю.А., Шерстнев М.П., Азимбаев Т.К. (1992) *Биофизика*, **37**, 1041-1047.
10. Глушков Р.Г., Гуськова Т.А., Голиков П.П., Давыдов Б.В., Клычникова Е.В. (1996) *Хим.-фарм. ж.*, **30**(1), 3-5.
11. Губский Ю.И., Горюшко А.Г., Вастунова И.Е., Курапова Т.И., Саченко Л.Г., Даниленко В.Ф. (1999) *Укр. біохім. ж.*, **71**(5), 85-89.
12. Mili B.L.G., Dgilas S.M., Brunet G.M. (1998) *Food Chem.*, **62**, 443-447.
13. Gadow A., Joubert E., Hansmann G.F. (1997) *J. Arg. and Food Chem.*, **45**, 1370-1374.

Поступила: 08. 10. 2004.

ANTIOXIDANT ACTIVITY TESTING OF SUBSTANCES AT EGG YOLK
LIPOPROTEINS OXIDATION BY GASOMETRIC METHOD

A.N. Nikolayevsky, T.A. Philippenko, O.P. Kniga, V.V. Lyovkina

Donetsk National University, Universitetskaya ul., 24, Donetsk, 83055 Ukraine;
tel.: (062)3051648; fax: (062)3051648; e-mail: alim@dongu.donetsk.ua

The gasometric method of iron-initiated oxidation of egg yolk lipoproteins has been employed for analysis of antioxidant activity. The optimal conditions of oxidation providing reproducible results on the kinetics process have been chosen. The antioxidant concentration required for 50% decrease of oxygen consumption is proposed as the parameter characterizing antioxidant activity of the compounds studied. The influence of different factors on effectiveness of inhibition of lipid peroxidation by phenolic antioxidants was analyzed.

Key words: egg yolk lipoproteins, peroxidation, antioxidants, gasometric method.