



УКРАЇНА

(19) UA (11) 40767 (13) U
(51) МПК (2009)
G01N 21/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК (БАС)

1

(21) u200813216

(22) 14.11.2008

(24) 27.04.2009

(46) 27.04.2009, Бюл. № 8, 2009 р.

(72) ШАПОВАЛ ГАЛИНА СЕРГІЇВНА, UA, ГРОМОВА
ВА ВАЛЕНТИНА ПИЛИПІВНА, UA(73) ІНСТИТУТ БІООРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ ТА НАФТО-
ХІМІЇ НАН УКРАЇНИ, UA

(57) Спосіб визначення антиоксидантної активності біологічно активних сполук (БАС) шляхом їх впливу на електрохімічний процес відновлення кисню, який **відрізняється** тим, що застосовують метод імпульсної вольтамперометрії, що дозволяє реєструвати активні інтермедіати поетапного відновлення кисню - гідроксильні радикали - та пероксид водню, одночасно оцінюють антирадикальну і антиокиснювальну активність БАС по змінам в морфології

2

та кількісних показниках вольтамперної кривої відновлення гідроксильних радикалів та пероксиду водню в присутності БАС:

антирадикальну активність A_p обчислюють за формулою:

$$A_p = (h_{op} - h_p) / h_{op} = \Delta h / h_{op},$$

де h_{op} - висота хвилі відновлення гідроксильних радикалів у відсутності досліджуваних сполук;

h_p - висота хвилі відновлення гідроксильних радикалів у присутності БАС,

антиокиснювальну активність A_a обчислюють за формулою:

$$A_a = (h_{op} - h_n) / h_{op} = \Delta h / h_{op},$$

де h_{op} - висота хвилі відновлення пероксиду водню у відсутності досліджуваних сполук;

h_n - висота хвилі відновлення пероксиду водню у присутності БАС.

Корисна модель має відношення до способів визначення антиоксидантної активності БАС, що конкретно може застосовуватися для оцінки ефективності фармакологічних препаратів - відомих та потенційних антиоксидантів.

Для гальмування вільнорадикальних процесів, що виникають в організмі під впливом різних екстремальних факторів (в умовах погіршення екологічної обстановки, під впливом різних видів опромінення та інш.) широко застосовують біологічно активні сполуки, що проявляють антиоксидантну активність. До них відносяться препарати як синтетичного, так і природного походження. Використання останніх є особливо перспективним, оскільки вони легко й органічно вступають у метаболічні процеси в організмі і практично не дають побічних ефектів, що властиве синтетичним препаратам [1, 2, 3].

Вибір ефективних антиоксидантів, здатних впливати на певні стадії вільнорадикальних процесів за участю кисню, визначення антиокиснювальної активності фармпрепаратів - відомих і потенційних антиоксидантів - представляє досить складну задачу. Нестабільність - головна причина методологічних ускладнень в процесі вивчення

утворення та дії радикальних продуктів в присутності біологічно активних сполук (БАС). Методи, що застосовуються в даний час для оцінки антиокиснювальної активності *in vitro*, в основному передбачають визначення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів по інгібуванню накопичування малонового діальдегіду (МДА) [1, 4], чи по реакційній здатності лікарських препаратів вступати в реакції зі стабільними радикалами, зокрема, по зв'язуванню з діфенілпікрілгідразилом (ДФПГ), про яке судять по спектрах поглинання, характерним для ДФПГ [5, 6].

Однак молекула ДФПГ не є досить коректною моделлю радикальних конструкцій живих систем і, крім того, при взаємодії ДФПГ із гідропероксидами і вільними радикалами утворюється надзвичайно складна суміш продуктів. Іншою особливістю, що утруднює дослідження, є його помітна чутливість до дії світла - у кристалічному стані і у розчинах при опроміненні світлом з довжинами хвиль 313 і 520 нм ДФПГ швидко руйнується.

Ці методи досить довготривалі, і як ряд інших (ЕПР-спектроскопія, хемілюмінесцентний метод) [7, 8, 9, 10] в основному полягають в ідентифікації і кількісному визначенні кінцевих продуктів реакції,

(13) U

(11) 40767

(19) UA

тоді як у живих системах найбільш важливою є регуляція вільно-радикальних процесів на стадії ініціювання (пригнічення токсичної дії супероксидного чи гідроксильного радикалів).

Серед методів виявлення гідроксильних радикалів слід визначити три основні групи: 1) метод ЕПР; 2) хроматографічні методи, що дозволяють виявляти продукти гідроксильовання органічних сполук, які утворились за участю гідроксильних радикалів; 3) хімічні методи, засновані, наприклад, на визначенні етилену, що утворюється з метионалем в присутності гідроксильних радикалів.

Метод ЕПР дозволяє безпосередньо виявляти вільні радикали, якщо їхня концентрація підтримується на рівні 10^{-6} - 10^{-7} М під час виміру. Оскільки звичайно радикали нестабільні, реєстрація їх можлива тільки за допомогою спеціальних методик. Одне з рішень - використання струйних методів, у яких постійна і притому висока концентрація радикалів підтримується в результаті безперервного змішування реагентів [11]. Однак струйні методи вимагають великих обсягів при високих концентраціях реагентів і практично непридатні, коли мова йде про вивчення біохімічних об'єктів.

Часто використовуваними методами виявлення гідроксильних радикалів є визначення кількості етилену в реакції $\cdot\text{OH}$ радикалів з метионалем чи 4-метилтіо-2-оксимасляною кислотою [12]. Утворення етилену з метионаля протікає відповідно до сумарної реакції:

Однак ця реакція може протікати не тільки в присутності $\cdot\text{OH}$ радикалів, але й інших сильних окиснювачів, таких, як алкоксильні і перекисні радикали [13].

Крім того, у цих реакціях бере участь ряд побічних продуктів, здатних реагувати з досліджуваними препаратами, що ускладнює визначення. Можливо, що саме цим можна пояснити відсутність кореляції інгібіруючої активності досліджуваних БАС відносно гідроксильних радикалів, на що звертають увагу автори [14].

Вищенаведені методи не дозволяють чітко реєструвати активні інтермедіати кисню (АІК) в водних, зокрема, фізіологічних середовищах, що особливо важливо для дослідження БАС. Проведення таких досліджень пов'язане зі значними методологічними труднощами, які викликані необхідністю одночасного генерування гідроксильних радикалів, пероксиду водню і реєстрації зміни їх кількості під впливом досліджуваних сполук.

Найбільш близьким є спосіб електрохімічного визначення активності антиоксидантів на базі вимірів вольтамперометричних характеристик катодного відновлення кисню в присутності досліджуваних сполук [15, 16, 17]

Однак, даний метод дозволяє оцінювати сумарну антиоксидантну активність по зміні концентрації молекулярного кисню в присутності БАС.

Задачею даної корисної моделі є спосіб визначення антирадикальної та антиокиснювальної активності БАС експрес-методом, шляхом одночасної реєстрації активних інтермедіатів поетапного відновлення кисню - гідроксильних радикалів та пероксиду водню в присутності досліджуваних сполук.

Поставлена задача досягається через спосіб визначення антиоксидантної активності біологічно активних сполук (БАС) шляхом їх впливу на електрохімічний процес відновлення молекулярного кисню, згідно з корисною моделлю, застосовують метод імпульсної вольтамперометрії, що дозволяє реєструвати активні інтермедіати поетапного відновлення кисню - гідроксильні радикали та пероксид водню, одночасно оцінюють антирадикальну і антиокиснювальну активність БАС по змінах в морфології та кількісних показниках вольтамперної кривої відновлення гідроксильних радикалів та пероксиду водню в присутності БАС:

Антирадикальну активність - A_p обчислюють за формулою:

$$A_p = (h_{op} - h_p) / h_{op} = \Delta h / h_{op}$$

Де - h_{op} - висота хвилі відновлення гідроксильних радикалів у відсутності досліджуваних сполук, h_p - висота хвилі відновлення гідроксильних радикалів у присутності БАС.

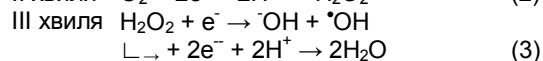
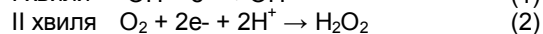
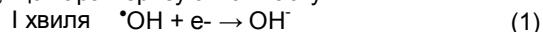
Антиокиснювальну активність - A_a обчислюють за формулою:

$$A_a = (h_{op} - h_n) / h_{op} = \Delta h / h_{op}$$

де - h_{op} - висота хвилі відновлення пероксиду водню у відсутності досліджуваних сполук, h_n - висота хвилі відновлення пероксиду водню у присутності БАС.

Цей спосіб - один із перспективних підходів до дослідження активних інтермедіатів відновлення кисню, що дозволяє реєструвати радикальні продукти його відновлення в присутності БАС. Так як кисень та реактивні форми його відновлення приймають активну участь в ініціюванні ланцюгових вільнорадикальних процесів в організмі, а вода - один із найважливіших біологічних розчинників, то змога фіксувати реактивні форми кисню в водних (в тому числі фізіологічних розчинах) відкриває можливість моделювати *in vitro* ці процеси та досліджувати вплив різних БАС - відомих та потенційних антиоксидантів на певні стадії відновлення кисню.

Авторами розроблено принципово нові підходи до дослідження антиоксидантної та антирадикальної активності ряду фармпрепаратів. Використовуючи метод імпульсної вольтамперометрії, при певних умовах поляризації електродів з життєво важливих металів, зокрема мідного електроду, у розчині 0,1М хлориду натрію нам вдалось реєструвати радикальні продукти відновлення кисню, зокрема гідроксильні радикали, що утворюються в процесі одноелектронного відновлення пероксиду водню, тобто виділити три стадії відновлення кисню, що характеризуються наступними хвилями:



До деякої міри вдається моделювати звичайний шлях утворення гідроксильних радикалів, що протікає в організмі за участю іонів металів змінної валентності (Fe, Cu), які і є каталізаторами процесу їхнього утворення в організмі (реакції Фентона і Хабера-Вайса).

Проведені дослідження і лягли в основу розробленого експрес-методу, що дозволяє судити

про ефективність як антиоксидантної, так антирадикальної дії досліджуваних БАС та про механізм їх дії по змінах у морфології і кількісних показниках вольтамперної кривої відновлення кисню в присутності цих сполук.

Антирадикальну активність - A_p оцінюють по величині інгібування хвилі гідроксильних радикалів (I) по формулі:

$$A_p = (h_{op} - h_p) / h_{op} = \Delta h / h_{op}$$

де - h_{op} - висота хвилі відновлення гідроксильних радикалів у відсутності досліджуваних сполук,
 h_p - висота хвилі відновлення гідроксильних радикалів у присутності БАС

Антиокиснювальну активність - A_a оцінюють по величині інгібування хвилі пероксиду водню (III) в присутності досліджуваних препаратів:

$$A_a = (h_{on} - h_n) / h_{on} = \Delta h / h_{on}$$

h_{on} - висота хвилі відновлення пероксиду водню у відсутності досліджуваних сполук,

h_n - висота хвилі відновлення пероксиду водню у присутності БАС.

Можливості методу продемонстровано на дослідженнях ряду БАС, які відносяться до різних фармакологічних класів - відомих та потенційних антиоксидантів.

В Таблиці 1 представлені дані впливу досліджуваних препаратів на хвилі відновлення гідроксильних радикалів (I)) та пероксиду водню (III). Представлені концентрації їх максимальної ефективності. Збільшення значень A по хвилі гідроксильних радикалів та пероксиду водню відповідає збільшенню антирадикальної та антиоксидантної активності відповідно.

Використання електрохімічного методу дозволяє проводити ефективний скринінг реакційної здатності БАС, значно скоротити час та затрати на оцінку антирадикальної та антиоксидантної активності фармпрепаратів і, можливо, розширити спектр показань до їх застосувань як антиоксидантів, досліджувати ефективність сумісної дії препаратів, можливість їх комбінованого використання.

Даний спосіб є перспективним для таких робіт як з наукової, так і з практичної точки зору.

Таблиця 1

Порівняння антиоксидантної активності відомих та потенційних антиоксидантів

Досліджувані препарати	Концентрація їх максимальної ефективності ммоль/дм ³	Антиоксидантна активність $A = \Delta h / h_0$	
		По хвилі гідроксильних радикалів	По хвилі пероксиду водню
Аскорбінова кислота	2,6	0,80	0,73
Саліцилова кислота	0,58	0,24	0,1
Ацетилсаліцилова к-та	0,76	0,22	0,12
Лимонна кислота	0,45	0,66	0,85
Нікотинова кислота	0,78	0,0	0,33
Нікотинамід	0,99	0,04	0,35
Змоксипін	1,6	0,18	0,32
Кверцетин	0,03	0,12	-0,17
Аскорбінова к-та + кверцетин	1,04+ 4.0·10 ⁻³	0,71	0,63
Цистеїн	0,38	0,19	0,27
Ацетил цистеїн	0,38	0,25	0,38
Бемітил	0,023	0,82	0,78
Томерзол	0,128	0,73	0,81
Аспарагінова кислота	0,9	0,19	0,56
Глутамінова кислота	1,07	0,10	0,32
Аспарагін	1,07	-0,41	0,38
Глютамін	1,23	-0,11	0,17
Глутатіон	0,48	0,29	0,75

Перелік посилань

1. Губский Ю.И., Юрженко Н.Н., Шаповал Г.С., Громовая В.Ф. и др. Антирадикальная и антиокислительная активность некоторых мембранотропных препаратов синтетического и растительного происхождения // Укр. биохим. журн. - 1998. - 70, №3. - С.124-130.

2. Зоров Д.Б., Банникова С.Ю., Белоусов В.В. и др. Друзья или враги. Активные формы кислорода и азота // Биохимия. - 2005. - 70, вып. 2. - С.265-272.

3. Ковтун Г.А., Плужников В.А., Москаленко О.В., Цыганков С.А. Антирадикальная активность природного фенола - карвакрола в окисляющемся

моделях липидов // Доп. НАНУ. - 2002. - №10. - С.138-140.

4. Стальная И.Д. Метод определения диеновых конъюгаций ненасыщенных жирных кислот / Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н.Ореховича. - М.: Медицина, 1977. - С.63-64.

5. Благородов С.Г., Шепелев А.П., Дмитриева И.А. и др. Определение антиокислительной активности химических соединений //Хим.-фарм. журнал. - 1987. - №3. - С.292-294.

6. Богатырева С.Г., Бучаченко А.Л. Реакции электронно-возбужденных радикалов и тушение возбужденных состояний радикалов // Успехи химии. - 1975. - 44, №12. - С.2171-2204.

7. Афанасьев В.А., Заиков Г.Е. Физические методы в химии. - М.: Наука, 1984. - 174с.

8. Карнаух И.М., Урысон Б.В. Установки для измерения спонтанного сверхслабого свечения биологических и клинических объектов и вопросы метрологического обеспечения измерений // Биохемилюминисценция / Под ред. А.И. Журавлева. - М.: Наука, 1983. - С.118-134

9. Courtois M., Maupoil V., Fantini E. et al. Correlation between direct ESR spectroscopic measurements and electrochemical and biochemical assessments of exogenous free radical injury in isolated rat cardiac myocytes // Free Rad. Biol. Med. - 1998. - 24, №1. - P.121-131.

10. Greenwald R.A. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. - CRC Press, Boca Raton, FL, 1985. - P.150-169.

11. Чанс Б. Методы исследования быстрых реакций. - М.: Мир, 1977. - С.15-78.

12. Bors W., Michel C, Saran M. Handbook of methods of oxygen radical research. - Boca Raton (Fla), 1986. - P.181-188.

13. Oturan M.A., Pinson J. Reaction of inflammation inhibitors with chemically and electrochemically generated hydroxyl radicals // J. Electroanal. Chem. - 1992. - 334. - P.103-109.

14. Oturan M.A., Pinson J. Reaction of inflammation inhibitors with chemically and electrochemically generated hydroxyl radicals // J. Electroanal. Chem. - 1992. - 334. - P.103-109.

15. Короткова Е.И. Новый способ определения активности антиоксидантов. // Журнал физической химии. 2000, Т 74, №9, С.1533-1546.

16. E.I. Korotkova, Y.A.Karbainov, A.V. Shevchuk Study of antioxidant properties by voltammetry // J. Electroanalytical Chemistry. 2002.V.518 №. P.56-60.

17. Хасанов В.В., Рыжов Г.Л., Мальцева Е.В. Методы исследования антиоксидантов. // Химия растительного сырья. 2004. №3, С.63-75.