

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЕМКОСТИ В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Г. К. Владимиров¹✉, Е. В. Сергунова², Д. Ю. Измайлов¹, Ю. А. Владимиров¹

¹ Кафедра медицинской биофизики, факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

² Кафедра фармакогнозии, фармацевтический факультет, Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова, Москва

Лекарственное растительное сырье является одним из источников антиоксидантов для организма человека. Среди методов определения содержания антиоксидантов в растительных объектах распространен метод хемилюминесцентного анализа. В настоящей работе он был использован для оценки общей антиоксидантной емкости (ОАЕ) отваров плодов рябины, шиповника и боярышника и настоя плодов малины. В опыте регистрировали кинетику хемилюминесценции в системе, состоящей из пероксидазы хрена, перекиси водорода и люминола. Концентрации и объем компонентов системы в пробе были подобраны так, чтобы сильные антиоксиданты (аскорбиновая кислота) и антиоксиданты средней силы (кверцетин) полностью окислялись за время измерения (10 мин). Предложен и обоснован способ расчета ОАЕ на основе изменения светосуммы хемилюминесценции в присутствии растительных образцов. Анализ кинетики хемилюминесценции показал, что в изученных объектах преобладают антиоксиданты средней силы, в том числе флавоноиды, и слабые антиоксиданты (токоферол и др.). Сопоставление рассчитанных значений ОАЕ для изучаемых объектов и данных их химического анализа показало, что продукты, содержащие одно и то же количество антиоксидантов с разным их соотношением по типам, могут различаться по способности защищать организм от вредного воздействия свободных радикалов. Описанная методика перспективна для изучения растительных объектов, содержащих смесь антиоксидантов различных типов.

Ключевые слова: свободный радикал, антиоксидант, антиоксидантная активность, общая антиоксидантная емкость, хемилюминесценция, люминол

Финансирование: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 14-15-00375.

Благодарности: авторы благодарят Андрея Алексева из Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова за помощь в проведении эксперимента.

✉ **Для корреспонденции:** Георгий Константинович Владимиров
119192, г. Москва, Ломоносовский пр-т, д. 31, к. 5; ura-vladimirov@yandex.ru

Статья получена: 10.03.2016 **Статья принята в печать:** 18.03.2016

CHEMILUMINESCENT DETERMINATION OF TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY IN MEDICINAL PLANT MATERIAL

Vladimirov GK¹✉, Sergunova EV², Izmaylov DY¹, Vladimirov YuA¹

¹ Department of Medical Biophysics, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, The First Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Medicinal plant material is one of the sources of antioxidants for the human body. Chemiluminescence analysis is one of the common methods of determining the content of antioxidants in plant materials. In our work, chemiluminescence analysis was used to determine the total antioxidant capacity (TAC) of fruit decoctions of mountain-ash, rose and hawthorn, as well as raspberry fruit infusion. Experiments established the kinetics of the chemiluminescence of a system consisting of horseradish peroxidase, hydrogen peroxide and luminol. Concentrations and volumes of components of the system were chosen such that strong antioxidants (ascorbic acid) and antioxidants of average force (quercetin) were completely oxidized during measurement (10 minutes). A method for TAC calculation based on changes in chemiluminescence light sum in the presence of plant samples was proposed and substantiated. Analysis of chemiluminescence kinetics showed that antioxidants of average force dominate in the objects studied, including flavonoids and weak antioxidants (tocopherol and others). Comparison of the calculated TAC values for the objects under study and their chemical analysis data showed that products containing the same amount of antioxidants with different ratios of antioxidants by types might vary in their ability to protect the body against the harmful effects of free radicals. The technique described is a promising one for the study of plant objects containing a mixture of different types of antioxidants.

Keywords: free radical, antioxidant, antioxidant activity, total antioxidant capacity, chemiluminescence, luminol

Funding: this work was supported by the Russian Science Foundation, grant no. 14-15-00375.

Acknowledgments: authors thank Andrey Alekseev from Lomonosov Moscow State University for his assistance in conducting the experiment.

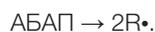
✉ **Correspondence should be addressed:** Georgiy Vladimirov
Lomonosovskiy prospekt, d. 31, k. 5, Moscow, Russia, 119192; ura-vladimirov@yandex.ru

Received: 10.03.2016 **Accepted:** 18.03.2016

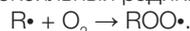
Свободные радикалы, образующиеся в организме, нарушают структуру мембран клеток, что, в свою очередь, ведет к развитию различных патологических состояний [1]. Разрушающее окислительное воздействие радикалов предупреждает система антиоксидантной защиты организма, в которой важную роль играют низкомолекулярные соединения — перехватчики (ловушки) радикалов. Одним из источников антиоксидантов является лекарственное растительное сырье [2], а также препараты на его основе, изучение антиоксидантного потенциала которых помогает повысить их профилактико-терапевтический эффект.

Основные методики определения антиоксидантов рассмотрены в работах [3–8], однако определение антиоксидантов как химических соединений не дает полного представления о защитных свойствах изучаемого объекта: они обуславливаются не только количеством того или иного антиоксиданта, но также активностью каждого из них. Активность антиоксиданта, или антиоксидантная активность, АОА, — это константа скорости реакции антиоксиданта со свободным радикалом ($k_{\text{инт}}$). Метод хемилюминесценции (ХЛ) позволяет определять общее количество радикалов, которое связывают антиоксиданты в образце (общую антиоксидантную емкость, ОАЕ), а при использовании метода математического моделирования кинетики ХЛ — также скорость образования и реакции радикалов с антиоксидантами, то есть АОА [9–11].

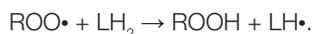
Наиболее распространенная модификация хемилюминесцентного метода определения общей антиоксидантной емкости основана на применении люминола в качестве активатора хемилюминесценции [12–15]. В кювету хемилюминометра помещают образец с добавлением люминола, пероксида водорода и соединения, способного образовывать радикалы в результате спонтанного распада (термолиза), например 2,2'-азобис-(2-амидинопропан) дигидрохлорида (АБАП):



В присутствии молекулярного кислорода алкильный радикал $\text{R}\cdot$ образует пероксильный радикал $\text{ROO}\cdot$:



Далее пероксильный радикал окисляет хемилюминесцентный зонд люминол (LH_2), и образуется радикал люминола ($\text{LH}\cdot$):



Из $\text{LH}\cdot$ через образование промежуточных веществ (гидропероксида люминола и эндопероксида люминола) образуется молекула конечного продукта окисления люминола, аминокеталевого кислоты, в электронно-возбужденном состоянии, которая высвечивает фотон, и в результате наблюдается хемилюминесценция [9]. Интенсивность ХЛ пропорциональна скорости образования фотонов, а она, в свою очередь, пропорциональна стационарной концентрации $\text{LH}\cdot$ в системе. Взаимодействуя с радикалами, антиоксиданты прерывают описанную цепочку превращений и препятствуют образованию фотона.

Соединения, подверженные термолузу, — не единственный возможный источник радикалов при анализе антиоксидантной емкости образца хемилюминесцентным методом. Альтернативами являются системы пероксидазы хрена–перекись водорода [13, 16], гемин–пероксид водорода [8], цитохром с–кардиолипин–пероксид водорода [11] и др. Схема реакций окисления люминола пероксидазами рассмотрена в работе Cormier и соавт. [17].

Кинетические кривые ХЛ для этих систем отражают две стадии реакции: стадию увеличения интенсивности ХЛ и стадию плато или постепенного спада свечения, когда

интенсивность ХЛ либо постоянна, либо медленно снижается. В работе [15] описаны два подхода к измерению общей антиоксидантной емкости, учитывающие эту особенность кривых. Метод TRAP (Total Reactive Antioxidant Potential) основан на измерении латентного периода ХЛ τ и может быть использован для определения таких антиоксидантов, как тролокс или аскорбиновая кислота: они характеризуются высоким значением константы скорости реакции с радикалами и по этой причине могут быть названы сильными антиоксидантами [11]. В течение латентного периода происходит их полное окисление. Методом TAR (Total Antioxidant Reactivity) измеряют степень тушения хемилюминесценции q на плато или в максимуме хемилюминесцентной кривой:

$$q = \frac{(I - I_1)}{I},$$

где I — интенсивность хемилюминесценции без антиоксиданта, а I_1 — интенсивность ХЛ в присутствии антиоксиданта. Этот метод используется, если в системе присутствуют преимущественно слабые антиоксиданты с низкими константами скорости взаимодействия с радикалами — намного более низкими в сравнении с константой люминола [11].

Действие антиоксидантов характеризуют не только показателями τ и q . Как видно из работ [8, 11], действие таких антиоксидантов, как мочевиная кислота в системе гемин– H_2O_2 –люминол или токоферол, рутин и кверцетин в системе цитохром с–кардиолипин– H_2O_2 –люминол, характеризуется изменением максимальной скорости нарастания ХЛ (v_{max}). Как показывают результаты математического моделирования кинетики, значения констант скорости взаимодействия этих антиоксидантов с радикалами близки к значению константы люминола, поэтому такие антиоксиданты могут быть названы антиоксидантами средней силы [11].

Если бы изучаемый материал, в частности растительное сырье, содержал только один тип антиоксидантов, то их содержание можно было бы характеризовать одним из трех перечисленных выше показателей (τ , q или v_{max}). Но в растительном сырье содержится смесь антиоксидантов разной силы. Чтобы решить эту проблему, некоторые авторы [8, 18–20] использовали изменение светосуммы хемилюминесценции за определенное время ΔS , рассчитанное по формуле

$$\Delta S = \Delta S_0 - \Delta S_s,$$

где ΔS_0 и ΔS_s — светосуммы ХЛ за заданное время t в контрольном и исследуемом образцах соответственно. Время должно быть достаточным для окисления всех антиоксидантов в системе, то есть для выхода кривой ХЛ исследуемого образца на уровень кривой ХЛ контрольного образца. Последнее предполагает, что исследователи должны не только регистрировать светосумму свечения, но и записывать кривую кинетики ХЛ в течение достаточно длительного времени, что делают далеко не всегда.

Поскольку все измеряемые показатели зависят от прибора и условий измерения, антиоксидантный эффект вещества в исследуемой системе обычно сравнивают с эффектом антиоксиданта, принятого за стандарт, например тролокса [8, 21].

Система пероксидазы хрена–пероксид водорода применялась для анализа общей антиоксидантной емкости растительного сырья многими авторами. В работах [22, 23] для оценки количества антиоксидантов в образцах использовали латентный период ХЛ (метод TRAP), а в работах [18–20] — площадь под кривой развития ХЛ. Однако в перечисленных работах не дано четкого обосно-

вания выбора того или иного параметра для оценки ОАЕ.

Целью исследования было определить, как соотношение антиоксидантов различного типа влияет на ОАЕ, и модифицировать метод хемилюминесценции таким образом, чтобы иметь возможность точнее определять ОАЕ в растительном сырье. Для этого мы поставили перед собой несколько задач. Во-первых, сравнить кинетику ХЛ исследуемых объектов с кинетикой стандартных антиоксидантов трех типов (сильного, среднего и слабого), чтобы понять, антиоксиданты какого типа вносят основной вклад в ОАЕ исследуемых объектов. Во-вторых, рассчитать ОАЕ исследуемых объектов, измерив уменьшение светосуммы ХЛ под действием этих объектов в сравнении с действием антиоксиданта, обеспечивающего наибольший вклад в ОАЕ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были промышленные образцы плодов боярышника, рябины и шиповника производства АО «Красногорсклексредства» (Россия), а также плоды малины, собранные авторами на территории Московской области в условиях естественного произрастания и высушенные при температуре 60–80 °С до прекращения выделения ими сока и деформации при надавливании.

Реактивами для анализа антиоксидантной емкости хемилюминесцентным методом служили: KH_2PO_4 , 20 мМ буферный раствор (рН 7,4); пероксидаза из корней хрена (активность 112 ед./мг, $M = 44\,173,9$), 1 мМ водный раствор; люминол (5-амино-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-фталазиндион, гидразид 3-аминофталево́й кислоты, $M = 177,11$), 1 мМ водный раствор; пероксид водорода (H_2O_2 , $M = 34,01$), 1 мМ водный раствор; растворы антиоксидантов (аскорбиновой кислоты, кверцетина, токоферола). Все реагенты — производства фирмы Sigma Aldrich (США).

Отвары плодов боярышника, рябины и шиповника и настоек плодов малины готовили по методике Государственной фармакопеи СССР, изложенной в общей фармакопейной статье «Настои и отвары» [24].

Определение общей антиоксидантной емкости проводили путем регистрации хемилюминесценции на хемилюминометре Lum-100 («ДИСофт», Россия) с использованием программного обеспечения PowerGraph 3.3. Для определения ОАЕ в растительном сырье в кювету прибора помещали 40 мкл люминола в концентрации 1 мМ, 40 мкл пероксидазы хрена в концентрации 0,1 мкМ, от 10 до 50 мкл отвара или настоя (в зависимости от концентрации) и фосфатный буфер в количестве, необходимом для доведения общего объема пробы до 1 мл. Кювету устанавливали в прибор и регистрировали ХЛ, наблюдая фоновый сигнал. По истечении 48 с регистрации фонового сигнала в кювету вносили 100 мкл H_2O_2 в концентрации 1 мМ и продолжали регистрацию ХЛ в течение 10 мин. Готовили по четыре пробы с различной концентрацией каждого из растительных объектов. Регистрировали также ХЛ для растворов аскорбиновой кислоты, кверцетина и токоферола в пяти различных концентрациях для каждого из антиоксидантов. В дальнейшем ОАЕ образцов отваров и настоев пересчитывали на кверцетин.

Концентрации люминола, пероксидазы хрена и перекиси водорода были подобраны так, чтобы определять антиоксидантную емкость водных извлечений из лекарственного растительного сырья за приемлемое время (не более 10 мин). За это время кривые хемилюминесценции для антиоксидантов аскорбата и флавоноида кверцетина (основные антиоксиданты растительного сырья)

выходили на плато, что указывало на полное разрушение антиоксидантов в системе. Разведения исследуемых образцов и концентрации растворов стандартных антиоксидантов (указаны в подписях к рисункам) подбирали таким образом, чтобы все кинетические кривые ХЛ были измерены при одной и той же чувствительности прибора.

Антиоксидантную емкость рассчитывали по изменению площади (ΔS) под кинетической кривой хемилюминесценции (светосуммы) при добавлении вещества, содержащего антиоксидант. Для этого подсчитывали S_0 для системы без антиоксиданта и вычитали из нее площадь S_1 , характеризующую систему, в которую был добавлен антиоксидант. Величина ΔS зависит от чувствительности хемилюминометра и условий измерения. Отношение $\Delta S/C \cdot V$ (где C — концентрация исследуемого биологического материала в кювете, г/л, и V — объем кюветы, л) выражает антиоксидантную емкость 1 г изучаемого материала, т. е. растительного сырья.

Аналогичным образом рассчитывали антиоксидантную емкость ΔS_A раствора стандартного антиоксиданта, например кверцетина, помещенного в тот же объем реакционной смеси. Отношение $\Delta S_A/C_A \cdot V$ (где C_A — весовая концентрация антиоксиданта в кювете, г/л) выражает антиоксидантную емкость 1 г антиоксиданта.

Для каждого из стандартных антиоксидантов регистрировали сигнал от растворов нескольких концентраций, чтобы убедиться в том, что расчеты ведутся в пределах линейной зависимости, а полученные результаты воспроизводимы. Действительно, была получена линейная зависимость ($\Delta S_A = k_A \cdot C_A$) сигнала от концентрации, по которой рассчитали стехиометрический коэффициент k_A . По критерию Фишера полученные для стандартных антиоксидантов значения k_A статистически значимы с вероятностью 0,975. Далее регистрировали сигнал от четырех концентраций для каждого из четырех растительных образцов, и для всех образцов получили линейную зависимость сигнала от концентрации ($\Delta S = k \cdot C$), по которой рассчитали стехиометрический коэффициент k . С вероятностью 0,975 (критерий Фишера) полученные для растительных образцов значения k статистически значимы. Общую антиоксидантную емкость растительного материала в пересчете на массу стандартного антиоксиданта (мг%) находили по формуле

$$\text{ОАЕ} = \frac{k}{k_A} \cdot 10^5.$$

Значения были представлены как среднее арифметическое \pm среднеквадратическое отклонение ($M \pm \delta$) при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение кинетики хемилюминесценции в присутствии аскорбата натрия (рис. 1) показало, что для этого антиоксиданта характерен латентный период, когда ХЛ практически полностью подавлена. Его продолжительность пропорциональна количеству антиоксиданта в системе. При этом не изменяется ни наклон кривых ХЛ, ни интенсивность ХЛ на плато. Это объясняется тем, что аскорбиновая кислота — сильный антиоксидант, перехватывающий все радикалы, образующиеся в системе, в том числе радикалы люминола, и ХЛ не развивается до тех пор, пока не окислится весь аскорбат.

Действие токоферола (рис. 2) проявлялось снижением интенсивности ХЛ на плато, что характерно для слабых антиоксидантов, хотя токоферол считается одним из самых

мощных антиоксидантов. Возможно, такое несоответствие связано с тем, что в нашем опыте свободные радикалы находились в водном растворе, тогда как обычно действие токоферола изучают в неполярных средах. В работе [11], где источником радикалов служил комплекс цитохрома с с кардиолипином и реакция с люминолом протекала в пределах этого комплекса, токоферол имел свойства антиоксиданта средней силы.

Изучив действие различных концентраций кверцетина на нашу систему (рис. 3) и сравнив кинетические кривые для него и аскорбата натрия и токоферола, можно отметить, что основное действие кверцетина проявляется в изменении угла наклона кривых, т. е. скорости развития ХЛ, что типично для антиоксидантов средней силы.

Кривые ХЛ для всех изучаемых отваров (рис. 4) напоминают кривые для кверцетина с незначительным снижением интенсивности ХЛ в конце, т. е. при выходе на

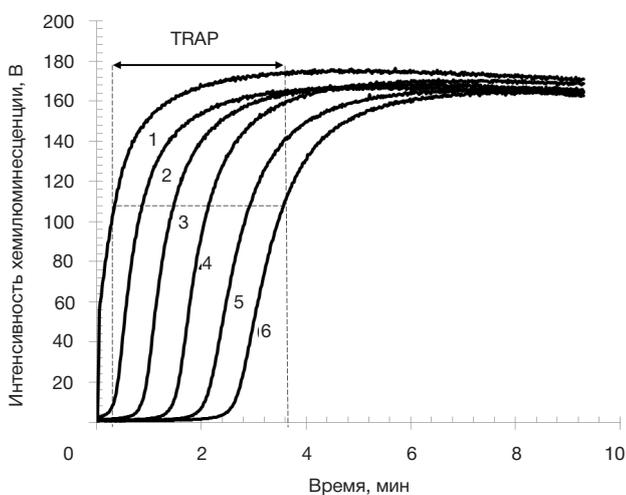


Рис. 1. Влияние аскорбата натрия на кинетику хемилюминесценции
Концентрации компонентов системы: люминол — 40 мкМ, пероксидаза хрена — 4 нМ, пероксид водорода — 100 мкМ. Кривые: 1 — контрольный образец; 2 — 0,05 мкМ; 3 — 0,10 мкМ; 4 — 0,15 мкМ; 5 — 0,2 мкМ; 6 — 0,25 мкМ аскорбата натрия.

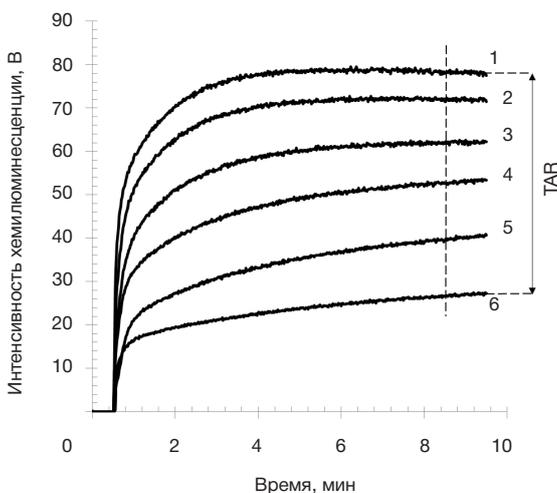


Рис. 2. Влияние токоферола на кинетику хемилюминесценции
Концентрации компонентов системы: люминол — 40 мкМ, пероксидаза хрена — 4 нМ, пероксид водорода — 100 мкМ. Кривые: 1 — контрольный образец; 2 — 0,01 мкМ; 3 — 0,025 мкМ; 4 — 0,06 мкМ; 5 — 0,1 мкМ; 6 — 0,2 мкМ токоферола.

плато. Как показано в работе [11], такое поведение характерно для антиоксидантов средней силы, к которым в нашем случае можно отнести полифенолы — флавоноиды и дубильные вещества. Для настоя из плодов малины (рис. 4, Г) заметно снижение хемилюминесценции на уровне плато, что характерно для слабых антиоксидантов [11], каким в данном случае является токоферол. В пересчете на кверцетин и токоферол в настое плодов малины содержится $4,7 \pm 0,9$ мкмоль/г кверцетина и $11,9 \pm 0,8$ мкмоль/г токоферола.

При сравнении кривых хемилюминесценции, полученных для различных концентраций четырех исследуемых водных извлечений из растительного сырья, показано, что вклад средних и слабых антиоксидантов в общую антиоксидантную емкость образцов снижался в ряду: настой плодов малины (рис. 4, Г), отвар плодов шиповника (рис. 4, В), отвар плодов рябины (рис. 4, А), отвар плодов боярышника (рис. 4, Б). Значения ΔS в расчете на концентрацию C изучаемого вещества в кювете и значения общей антиоксидантной емкости в пересчете на кверцетин приведены в таблице.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в ходе экспериментов данные и рассчитанные на их основе величины ОАЕ изучаемых объектов были сопоставлены с содержанием в них основных антиоксидантов, определенных с помощью химических методов анализа [25–29]. Несмотря на то, что положительная корреляция между суммарным количеством антиоксидантов и ОАЕ в разных объектах несомненна, все же между этими показателями имеются заметные различия. Например, если взять сумму содержания флавоноидов, дубильных веществ и аскорбиновой кислоты, то она оказывается больше рассчитанной ОАЕ для всех изучаемых объектов, кроме отвара плодов боярышника (таблица).

Другими исследователями также показано, что результаты химического анализа и значение ОАЕ, определенное хемилюминесцентным методом, часто не совпадают. В работе [19] общая антиоксидантная емкость, определенная

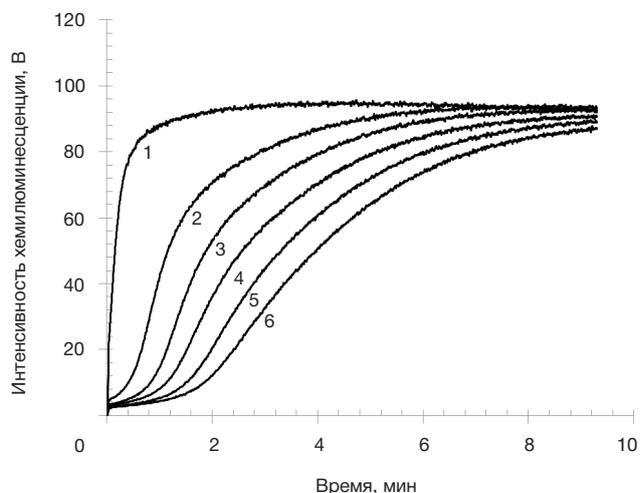


Рис. 3. Влияние кверцетина на кинетику хемилюминесценции
Концентрации компонентов системы: люминол — 40 мкМ, пероксидаза хрена — 4 нМ, пероксид водорода — 100 мкМ. Кривые: 1 — контрольный образец; 2 — 0,02 мкМ; 3 — 0,03 мкМ; 4 — 0,04 мкМ; 5 — 0,05 мкМ; 6 — 0,06 мкМ кверцетина.

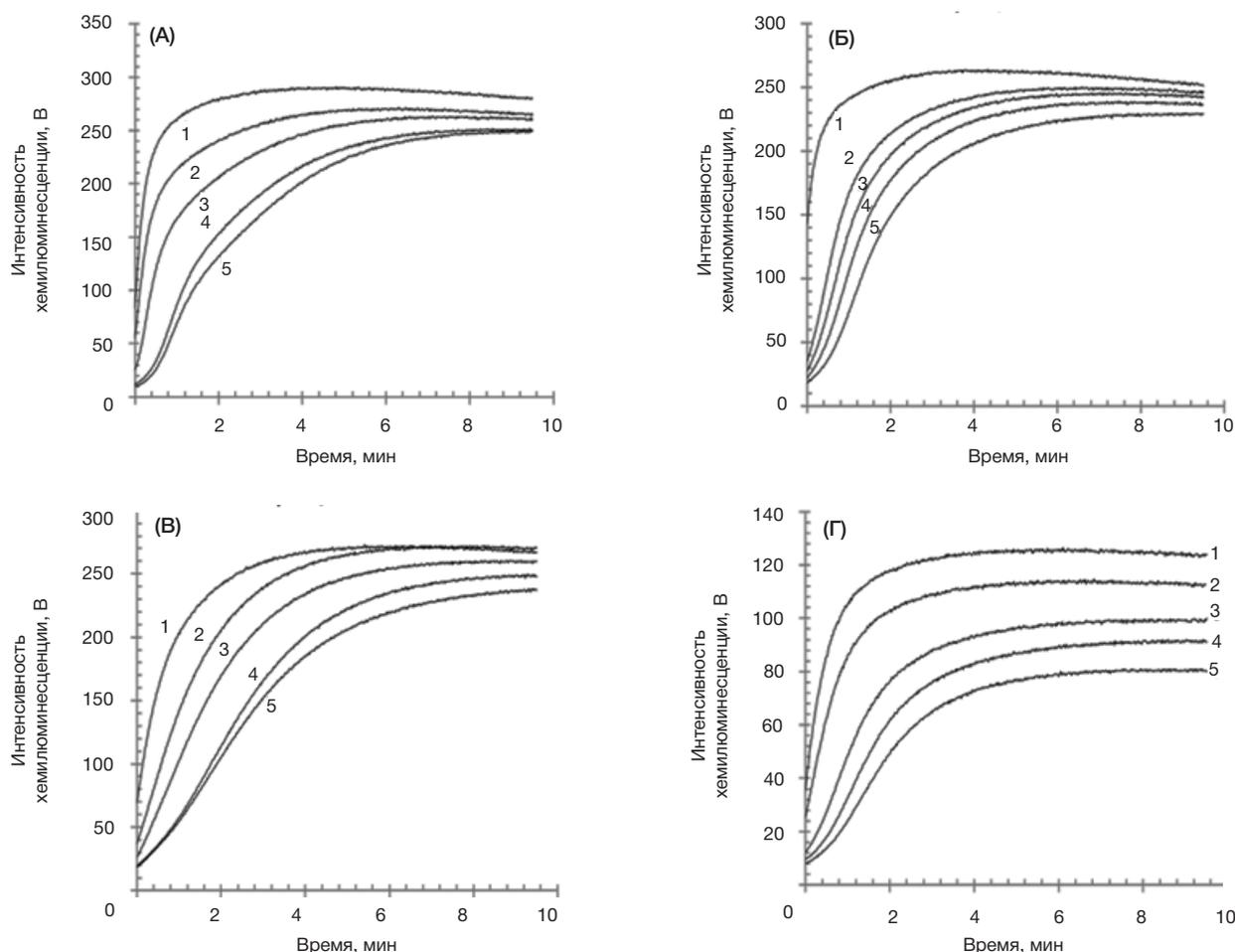


Рис. 4. Влияние отваров плодов рябины (А), боярышника (Б), шиповника (В) и настоя из плодов малины (Г) на кинетику хемилюминесценции

Концентрации компонентов системы: люминол — 40 мкМ, пероксидаза хрена — 4 нМ, пероксид водорода — 100 мкМ. (А) Кривые: 1 — контрольный образец; 2 — 0,002 г/л; 3 — 0,004 г/л; 4 — 0,006 г/л; 5 — 0,008 г/л отвара плодов рябины. (Б) Кривые: 1 — контрольный образец; 2 — 0,005 г/л; 3 — 0,0075 г/л; 4 — 0,01 г/л; 5 — 0,0125 г/л отвара плодов боярышника. (В) Кривые: 1 — контрольный образец; 2 — 0,001 г/л; 3 — 0,0015 г/л; 4 — 0,002 г/л; 5 — 0,0025 г/л отвара плодов шиповника. (Г) Кривые: 1 — контрольный образец; 2 — 0,001 г/л; 3 — 0,003 г/л; 4 — 0,004 г/л; 5 — 0,005 г/л настоя плодов малины.

в системе пероксидаза–люминол–перекись водорода коррелировала с содержанием тритерпеновых соединений. Однако в работе тех же авторов [18], в которой объектом исследования было другое растение, не наблюдали корреляции ОАЕ с содержанием какой-либо группы веществ, в том числе флавоноидов.

Подобные расхождения связаны по меньшей мере с тремя факторами. Во-первых, имеет значение активность антиоксидантов, т. е. скорость их взаимодействия с радикалами, которая различна для разных антиоксидантов, входящих в состав растительного образца. По данным Измайлова [11], константы скорости соответствующих реакций для мексидола, токоферола и кверцетина соотносятся как 0,04 : 2 : 60. Во-вторых, каждая молекула антиоксиданта, вступая в химическую реакцию, может перехватить различное количество радикалов. По данным работы [8], кверцетин, мочевиная и аскорбиновая кислоты перехватывали 3,6 ± 0,1, 1,4 ± 0,1 и 0,5 ± 0,2 радикалов на одну прореагировавшую молекулу антиоксиданта соответственно (использовалась система гемин–Н₂O₂–люминол). В-третьих, на результаты исследования могло оказать влияние наличие пероксидазной активности у самих растительных образцов, как в работе [23], а также наличие в образцах кальция, который, как это показано в работе [30], способен в определенных условиях повышать активность пероксидазы хрена. Обычно это обуславливает более вы-

сокую интенсивность ХЛ на плато, чем на контрольных кривых, чего мы, однако, не наблюдали.

Первый фактор резко ограничивает применение такого параметра, как изменение светосуммы, так как время измерения хемилюминесценции должно быть больше времени расходования всех антиоксидантов в исследуемом образце. О наступлении этого момента можно судить, только измеряя кинетику хемилюминесценции. Кроме того, вклад слабых антиоксидантов в ОАЕ резко занижен, поскольку время их полного окисления во много раз превышает приемлемую продолжительность измерения (10–20 мин).

Еще большее значение имеет стехиометрический коэффициент антиоксиданта. Количество радикалов *n*, перехватываемое им, равно

$$n = \rho \cdot \Delta t,$$

где ρ — стехиометрический коэффициент, а Δt — изменение концентрации антиоксиданта за время измерения, в нашем случае — исходная концентрация исследуемого вещества в опытной пробе.

Разница в светосумме свечения в отсутствие антиоксиданта и в его присутствии пропорциональна *n*. Суммарное число перехваченных радикалов равно

$$n = \sum_i \rho_i \cdot m_i,$$

где ρ_i — стехиометрический коэффициент конкретного антиоксиданта, а m_i — его концентрация во время изме-

Содержание антиоксидантов в растительном сырье по данным химического анализа и общая антиоксидантная емкость тех же объектов, $M \pm \delta$

Объект исследования	Флавоноиды, мг%*	Дубильные вещества, мг%*	Аскорбиновая кислота, мг%*	$\Delta S/C \cdot 10^{-8}$, усл. ед.	ОАЕ, мг% кверцетина
Отвар плодов рябины	8,87 ± 0,01	210,00 ± 10,00	0,67 ± 0,02	7,13 ± 0,96	56,53 ± 7,61
Отвар плодов шиповника	4,66 ± 0,04	850,00 ± 20,00	3,70 ± 0,12	16,60 ± 3,40	131,63 ± 27,26
Отвар плодов боярышника	3,01 ± 0,06	12,00 ± 3,00	0,23 ± 0,002	3,18 ± 0,29	25,20 ± 2,32
Настой высушенных плодов малины	90,00 ± 4,00	40,00 ± 20,00	3,91 ± 0,08	6,65 ± 1,21	52,69 ± 9,56

Примечание: * — литературные данные, [25–29]. ΔS — изменение светосуммы для образца, отн. ед., C — концентрация образца в кювете, г/л. Рассчитанные значения достоверны при $p < 0,05$. Число измерений для каждого образца — четыре.

рения. Суммарное число перехваченных радикалов заведомо не равно суммарному количеству антиоксидантов, поскольку коэффициенты p_i не только не равны единице, но и существенно отличаются для разных антиоксидантов.

Величина n пропорциональна разнице светосумм, измеренных за определенное время между образцом, содержащим антиоксидант, и контрольным образцом, не содержащим антиоксидантов:

$$S = k \cdot n,$$

где k — коэффициент, постоянный при одинаковых условиях измерения.

Рассмотренный в статье метод позволяет определить общую антиоксидантную емкость, тогда как химический анализ позволяет определить суммарное содержание антиоксидантов в продукте. Поэтому метод хемилюминесценции представляется информативнее химических анализов.

ВЫВОДЫ

Подобранные нами условия оценки общей антиоксидантной емкости растительного сырья методом регистрации кинетики хемилюминесценции в системе, состоящей из пероксида водорода и люминола (концентрации компонентов — 4 нМ, 100 мкМ и 40 мкМ соответственно; 20 мМ фосфатный буфер, pH 7,4),

обеспечили окисление сильных антиоксидантов (аскорбиновая кислота) и антиоксидантов средней силы (кверцетин) за 10 мин. Такая продолжительность измерения удобна и обеспечивает требуемое качество измерений.

Анализ кинетики хемилюминесценции показал, что в изученных объектах (отварах плодов рябины, шиповника, боярышника и настое плодов малины) основными антиоксидантами являются антиоксиданты средней силы, в том числе флавоноиды, и слабой силы (токоферол и др.). На основе уменьшения светосуммы хемилюминесценции была рассчитана общая антиоксидантная емкость для изученных объектов. Сравнение полученных значений ОАЕ с результатами химического анализа показало, что продукты, содержащие одно и то же количество антиоксидантов с разным их соотношением, могут различаться по своей способности эффективно защищать организм от вредного воздействия свободных радикалов. Описанная методика перспективна для изучения растительных объектов, в которых содержится смесь различных антиоксидантов. При этом она отличается простотой и невысокой стоимостью исследования. Сочетание измерения кинетики хемилюминесценции с математическим моделированием реакций позволит не только автоматизировать процесс определения ОАЕ, но и определять вклад отдельных групп антиоксидантов в показатель.

Литература

1. Проскурнина Е. В., Владимиров Ю. А. Свободные радикалы как участники регуляторных и патологических процессов. В сб.: Григорьев А. И., Владимиров Ю. А., редакторы. Фундаментальные науки — медицине. Биофиз. мед. технол. М.: МАКС Пресс; 2015. т. 1. с. 38–71.
2. Chanda S, Dave R. In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *Afr J Microbiol Res.* 2009 Dec; 3 (13): 981–96.
3. Хасанов В. В., Рыжова Г. Л., Мальцева Е. В. Методы исследования антиоксидантов. *Хим. раст. сырья.* 2004; (3): 63–75.
4. Васильев Р. Ф., Кънчева В. Д., Федорова Г. Ф., Бътовска Д. И., Трофимов А. В. Антиоксидантная активность халконов. Хемилюминесцентное определение реакционной способности и квантово-химический расчет энергий и строения реагентов и интермедиатов. *Кинетика и катализ.* 2010; 51 (4): 533–41.
5. Slavova-Kazakova AK, Angelova SE, Vepintsev TL, Denev P, Fabbri D, Dettori MA, et al. Antioxidant potential of curcumin-related compounds studied by chemiluminescence kinetics, chain-breaking efficiencies, scavenging activity (ORAC) and DFT calculations. *Beilstein J Org Chem.* 2015 Aug 11; 11: 1398–411.
6. Fedorova GF, Trofimov AV, Vasil'ev RF, Vepintsev TL. Peroxy-radical-mediated chemiluminescence: mechanistic diversity and fundamentals for antioxidant assay. *Arkivoc.* 2007; 8: 163–215.
7. Fedorova GF, Menshov VA, Trofimov AV, Vasil'ev RF. Facile chemiluminescence assay for antioxidative properties of vegetable lipids: fundamentals and illustrative examples. *Analyst.* 2009 Oct; 134 (10): 2128–34.
8. Bastos EL, Romoff P, Eckert CR, Baader WJ. Evaluation of antiradical capacity by H₂O₂-hemin-induced luminol chemiluminescence. *J Agric Food Chem.* 2003 Dec 3; 51 (25): 7481–8.
9. Владимиров Ю. А., Проскурнина Е. В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция. *Успехи биол. хим.* 2009; 49: 341–88.
10. Владимиров Ю. А., Проскурнина Е. В., Измайлов Д. Ю. Кинетическая хемилюминесценция как метод изучения реакций свободных радикалов. *Биофизика.* 2011; 56 (6): 1081–90.
11. Измайлов Д. Ю., Демин Е. М., Владимиров Ю. А. Определение активности антиоксидантов методом измерения кинетики хемилюминесценции. *Фотобиология и фотомедицина.* 2011; 7 (2): 70–6.
12. Lissi EA, Pascual C, Del Castillo MD. Luminol luminescence induced by 2,2'-Azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free*

- Radic Res Commun. 1992; 17 (5): 299–311.
13. Lissi EA, Pascual C, Del Castillo MD. On the use of the quenching of luminol luminescence to evaluate SOD activity. *Free Radic Biol Med.* 1994 Jun; 16 (6): 833–7.
 14. Lissi EA, Escobar J, Pascual C, Del Castillo MD, Schmitt TH, Di Mascio P. Visible chemiluminescence associated with the reaction between methemoglobin or oxyhemoglobin with hydrogen peroxide. *Photochem Photobiol.* 1994 Nov; 60 (5): 405–11.
 15. Lissi EA, Salim-Hanna M, Pascual C, Del Castillo MD. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic Biol Med.* 1995 Feb; 18 (2): 153–8.
 16. Landi-Librandi AP, de Oliveira CA, Azzolini AE, Kabeya LM, Del Ciampo JO, Bentley MV, et al. In vitro evaluation of the antioxidant activity of liposomal flavonols by the HRP-H₂O₂-luminol system. *J Microencapsul.* 2011; 28 (4): 258–67.
 17. Cormier MJ, Prichard PM. An investigation of the mechanism of the luminescent peroxidation of luminol by stopped flow techniques. *J Biol Chem.* 1968 Sep 25; 243 (18): 4706–14.
 18. Chang CL, Lin CS, Lai GH. Phytochemical characteristics, free radical scavenging activities, and neuroprotection of five medicinal plant extracts. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012; 2012: 984295. doi: 10.1155/2012/984295. Epub 2011 Aug 10.
 19. Chang CL, Lin CS. Phytochemical composition, antioxidant activity, and neuroprotective effect of Terminalia chebula Retzius extracts. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012; 2012: 125247. doi: 10.1155/2012/125247. Epub 2011 Jul 5.
 20. Georgetti SR, Casagrande R, Di Mambro VM, Azzolini AE, Fonseca MJ. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. *AAPS PharmSci.* 2003; 5 (2): 111–5.
 21. Алексеев А. В., Проскурнина Е. В., Владимиров Ю. А. Определение антиоксидантов методом активированной хемилуминесценции с использованием 2,2'-азо-бис(2-амидинопропана). *Вестн. МГУ. Сер. 2. Хим.* 2012; 53 (3): 187–93.
 22. Pogačnik L, Ulrich NP. Application of optimized chemiluminescence assay for determination of the antioxidant capacity of herbal extracts. *Luminescence.* 2012 Nov–Dec; 27 (6): 505–10.
 23. Saleh L, Plieth C. Total low-molecular-weight antioxidants as a summary parameter, quantified in biological samples by a chemiluminescence inhibition assay. *Nat Protoc.* 2010 Sep; 5 (10): 1627–34.
 24. Министерство здравоохранения СССР. Государственная фармакопея СССР. XI изд. Вып. 2 «Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье». М.: Медицина; 1987. с. 147–8.
 25. Сергунова Е. В., Сорокина А. А., Корнюшина М. А. Изучение экстракционных препаратов шиповника. *Фармация.* 2012; (2): 14–6.
 26. Сергунова Е. В., Сорокина А. А., Аврач А. С. Изучение плодов боярышника различными способами консервации и водных извлечений. *Фармация.* 2010; (5): 16–8.
 27. Аврач А. С., Сергунова Е. В., Куксова Я. В. Биологически активные вещества плодов и водных извлечений малины обыкновенной. *Фармация.* 2014; (1): 8–10.
 28. Аврач А. С., Самылина И. А., Сергунова Е. В. Изучение биологически активных веществ плодов боярышника — сырья для приготовления настоек гомеопатических матричных. В сб. науч. тр. по материалам XXIV Моск. междунар. гомеопат. конф. «Развитие гомеопатического метода в современной медицине»; 24–25 января 2014 г.; Москва. М.; 2014. с. 146–7.
 29. Сергунова Е. В., Сорокина А. А. Изучение состава биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье различными способами консервации. В сб. тезисов по материалам XX Росс. нац. конгр. «Человек и лекарство»; 15–19 апреля 2013 г.; Москва. М.: ЭкОонис; 2013. с. 184–90.
 30. Александрова Е. Ю., Орлова М. А., Нейман П. Л. Изучение пероксидазной активности в экстрактах из корневища и корней хрена и ее стабильности к различным воздействиям. *Вестн. МГУ. Сер. 2. Хим.* 2006; 47 (5): 350–2.

References

1. Proskurnina EV, Vladimirov YuA. Svobodnye radikaly kak uchastniki regulatorynykh i patologicheskikh protsessov. In: Grigor'ev AI, Vladimirov YuA, editors. *Fundamental'nye nauki — meditsine. Biofizicheskie meditsinskie tekhnologii.* Moscow: MAKSPress; 2015. v. 1. p. 38–71. Russian.
2. Chanda S, Dave R. In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *Afr J Microbiol Res.* 2009 Dec; 3 (13): 981–96.
3. Khasanov VV, Ryzhova GL, Mal'tseva EV. Metody issledovaniya antioksidantov. *Khimija Rastitel'nogo Syr'ja.* 2004; (3): 63–75. Russian.
4. Vasil'ev RF, K"ncheva VD, Fedorova GF, B"tovska DI, Trofimov AV. Antioksidantnaya aktivnost' khalkonov. *Khemilyuminestsentnoe opredelenie reaktsionnoi sposobnosti i kvantovo-khimicheskii raschet energii i stroeniya reagentov i intermediatov.* Kinetics and catalysis. 2010; 51 (4): 533–41. Russian.
5. Slavova-Kazakova AK, Angelova SE, Veprintsev TL, Denev P, Fabbri D, Dettori MA, et al. Antioxidant potential of curcumin-related compounds studied by chemiluminescence kinetics, chain-breaking efficiencies, scavenging activity (ORAC) and DFT calculations. *Beilstein J Org Chem.* 2015 Aug 11; 11: 1398–411.
6. Fedorova GF, Trofimov AV, Vasil'ev RF, Veprintsev TL. Peroxy-radical-mediated chemiluminescence: mechanistic diversity and fundamentals for antioxidant assay. *Arkivoc.* 2007; 8: 163–215.
7. Fedorova GF, Menshov VA, Trofimov AV, Vasil'ev RF. Facile chemiluminescence assay for antioxidative properties of vegetable lipids: fundamentals and illustrative examples. *Analyst.* 2009 Oct; 134 (10): 2128–34.
8. Bastos EL, Romoff P, Eckert CR, Baader WJ. Evaluation of antiradical capacity by H₂O₂-hemin-induced luminol chemiluminescence. *J Agric Food Chem.* 2003 Dec 3; 51 (25): 7481–8.
9. Vladimirov YuA, Proskurnina EV. Svobodnye radikaly i kletochnaya khemilyuminestsentsiya. *Usp Biol Khim.* 2009; 49: 341–88. Russian.
10. Vladimirov YuA, Proskurnina EV, Izmailov DYU. Kineticheskaya khemilyuminestsentsiya kak metod izucheniya reaktsii svobodnykh radikalov. *Biophysics.* 2011; 56 (6): 1081–90. Russian.
11. Izmailov DYU, Demin EM, Vladimirov YuA. Opredelenie aktivnosti antioksidantov metodom izmereniya kinetiki khemilyuminestsentsii. *Fotobiologiya i fotomeditsina.* 2011; 7 (2): 70–6. Russian.
12. Lissi EA, Pascual C, Del Castillo MD. Luminol luminescence induced by 2,2'-Azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Radic Res Commun.* 1992; 17 (5): 299–311.
13. Lissi EA, Pascual C, Del Castillo MD. On the use of the quenching of luminol luminescence to evaluate SOD activity. *Free Radic Biol Med.* 1994 Jun; 16 (6): 833–7.
14. Lissi EA, Escobar J, Pascual C, Del Castillo MD, Schmitt TH, Di Mascio P. Visible chemiluminescence associated with the reaction between methemoglobin or oxyhemoglobin with hydrogen peroxide. *Photochem Photobiol.* 1994 Nov; 60 (5): 405–11.
15. Lissi EA, Salim-Hanna M, Pascual C, Del Castillo MD. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic Biol Med.* 1995 Feb; 18 (2): 153–8.
16. Landi-Librandi AP, de Oliveira CA, Azzolini AE, Kabeya LM, Del Ciampo JO, Bentley MV, et al. In vitro evaluation of the antioxidant activity of liposomal flavonols by the HRP-H₂O₂-luminol system. *J Microencapsul.* 2011; 28 (4): 258–67.
17. Cormier MJ, Prichard PM. An investigation of the mechanism

- of the luminescent peroxidation of luminol by stopped flow techniques. *J Biol Chem.* 1968 Sep 25; 243 (18): 4706–14.
18. Chang CL, Lin CS, Lai GH. Phytochemical characteristics, free radical scavenging activities, and neuroprotection of five medicinal plant extracts. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012; 2012: 984295. doi: 10.1155/2012/984295. Epub 2011 Aug 10.
 19. Chang CL, Lin CS. Phytochemical composition, antioxidant activity, and neuroprotective effect of *Terminalia chebula* Retzius extracts. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012; 2012: 125247. doi: 10.1155/2012/125247. Epub 2011 Jul 5.
 20. Georgetti SR, Casagrande R, Di Mambro VM, Azzolini AE, Fonseca MJ. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. *AAPS PharmSci.* 2003; 5 (2): 111–5.
 21. Alekseev AV, Proskurnina EV, Vladimirov YuA. Opredelenie antioksidantov metodom aktivirovannoi khemilyuminestsentsii s ispol'zovaniem 2,2'-azo-bis(2-amidinopropana). *Moscow University Chemistry Bulletin.* 2012; 53 (3): 187–93. Russian.
 22. Pogačnik L, Ulrih NP. Application of optimized chemiluminescence assay for determination of the antioxidant capacity of herbal extracts. *Luminescence.* 2012 Nov–Dec; 27 (6): 505–10.
 23. Saleh L, Plieth C. Total low-molecular-weight antioxidants as a summary parameter, quantified in biological samples by a chemiluminescence inhibition assay. *Nat Protoc.* 2010 Sep; 5 (10): 1627–34.
 24. Ministerstvo zdravookhraneniya SSSR. Gosudarsvennaya farmakopeya SSSR. 11th ed. Iss. 2. "Obshchie metody analiza. Lekarstvennoe rastitel'noe syr'e". Moscow: Meditsina; 1987. p. 147–8. Russian.
 25. Sergunova EV, Sorokina AA, Korniyushina MA. Izuchenie ekstraktsionnykh preparatov shipovnika. *Pharmacy.* 2012; (2): 14–6. Russian.
 26. Sergunova EV, Sorokina AA, Avrach AS. Izuchenie plodov boyaryshnika razlichnykh sposobov konservatsii i vodnykh izvlechenii. *Farmatsiya.* 2010; (5): 16–8. Russian.
 27. Avrach AS, Sergunova EV, Kuksova YaV. Biologicheski aktivnye veshchestva plodov i vodnykh izvlechenii maliny obyknovnoy. *Farmatsiya.* 2014; (1): 8–10. Russian.
 28. Avrach AS, Samylyina IA, Sergunova EV. Izuchenie biologicheski aktivnykh veshchestv plodov boyaryshnika — syr'ya dlya prigotovleniya nastoek gomeopaticheskikh matrichnykh. Proceedings of the 14th Moscow International Homeopathic Conference "Razvitie gomeopaticeskogo metoda v sovremennoi meditsine"; 2014 Jan 24–25; Moscow. M.; 2014. p. 146–7. Russian.
 29. Sergunova EV, Sorokina AA. Izuchenie sostava biologicheski aktivnykh veshchestv v lekarstvennom rastitel'nom syr'e razlichnykh sposobov konservatsii. Proceedings of the 20th Russian National Congress "Chelovek i lekarstvo"; 2013 Apr 15–19; Moscow. Moscow: EkOOnis; 2013. p. 184–90. Russian.
 30. Aleksandrova EYu, Orlova MA, Neiman PL. Izuchenie peroksidaznoi aktivnosti v ekstraktakh iz kornevishcha i kornei khrena i ee stabil'nosti k razlichnym vozdeistviyam. *Moscow University Chemistry Bulletin.* 2006; 47 (5): 350–2. Russian.