

# МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ НА ОСНОВЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ

Шпигун Л.К., Замятина Н.Н., Шушеначев Я.В., Камилова П.М.  
(Лаборатория проблем аналитической химии)

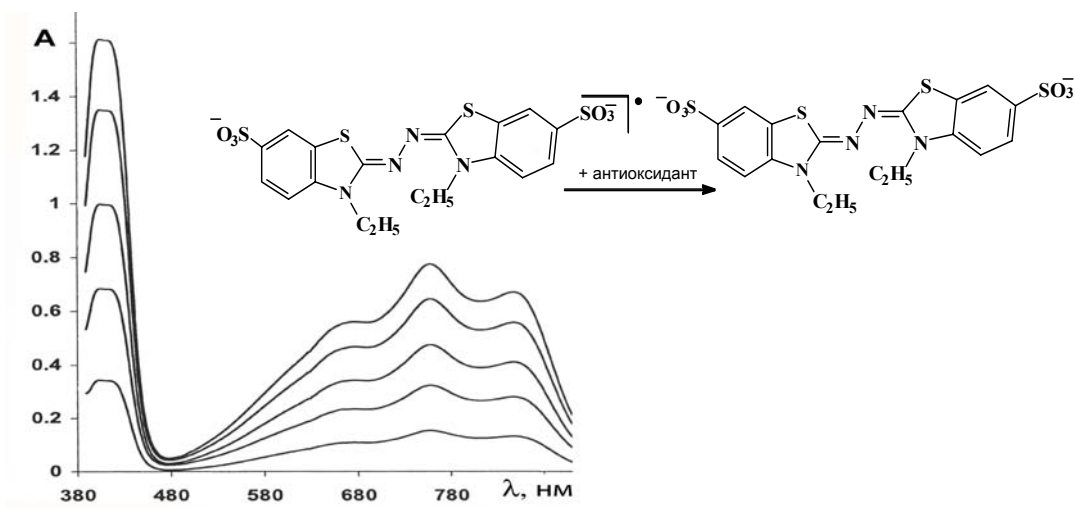
В процессе эволюции природа создала защиту против разрушительного действия свободных радикалов (СР). Этой защитой являются природные и синтетические соединения – антиоксиданты. Антиоксиданты (АОх) – понятие фармакологически собирательное и не подразумевает принадлежности к какой-либо определенной химической группе веществ, но характеризующихся специфической способностью прямо или опосредованно снижать концентрацию свободных радикалов в организме. Поскольку в исследовании роли, которую могут играть антиоксиданты в физиологии и медицине, преобладает токсикологический и патофизиологический уклоны, исследование антиоксидантов приобретает в настоящее время приоритетное значение. Препараты с антиоксидантным действием все шире используются в медицине для коррекции избыточной интенсивности процессов свободнорадикального окисления (СРО) при различных заболеваниях. При этом перспективы разработки новых, более эффективных средств и развития антиоксидантной терапии связаны с целенаправленным поиском и изучением антиоксидантов различной химической природы.

Среди разнообразных подходов к определению антиоксидантной активности веществ, которую можно обнаружить в тестах *in vitro*, мы выделили известную способность АОх вступать в реакции со свободными органическими радикалами: чем больше противорадикальная эффективность объекта, тем выше его антиоксидантная активность. Анализ в этом случае основывается на использовании некоей модельной системы, которая включает в себя, как правило, генерирование определенного сорта СР в водной или липофильной фазе и их последующее определение. Введение в такую модельную систему перехватчика СР приводит к уменьшению их концентрации. Однако реализация такого подхода – дело непростое, так как требуется обеспечить постоянство условий генерирования СР и их реакции с тестируемой пробой. Проведенные нами исследования показали, что широкие возможности для развития подходов, связанных с применением СР и других термодинамически неустойчивых интермедиатов в качестве аналитических реагентов, открывает методология проточно-инжекционного анализа (ПИА). Помимо непрерывного контроля за получением и детектированием СВ в единой закрытой системе, в этом случае удастся автоматизировать весь процесс анализа и сократить количества пробы и потребляемых реагентов.

В задачу наших исследований входило создание проточно-инжекционных (ПИ) методов для количественной оценки антиоксидантной активности различных лекарственных веществ на основе фотометрирования жидкофазных реакций с участием двух хромофорных радикалов – 2,2'-азинобис(3-этил-бензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) и 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразила. Степень «радикального захвата» Р рассчитывали по уравнению:  $P (\%) = [N_0 - N_{AOx}] / N_0 \times 100$ , где  $N_0$  и  $N_{AOx}$  – высота фотометрического сигнала в отсутствие и в присутствии антиоксиданта, соответственно.

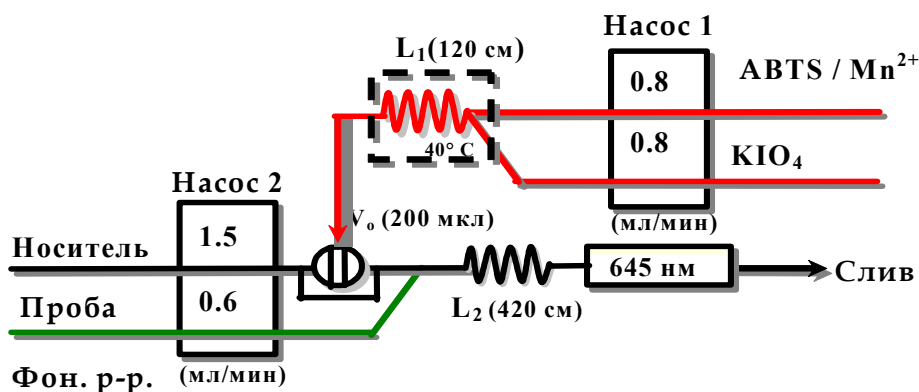
## ПИ-метод на основе детектирования катион-радикала 2,2'-азинобис(3-этил-бензотиазолин-6-сульфоновой кислоты)

В основу создания этого ПИ-метода исследования антиоксидантов была положена известная реакция их взаимодействия с окрашенным метастабильным катион-радикалом 2,2'-азинобис(3-этил-бензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) ( $ABTS^{+\bullet}$ ):

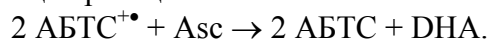


Для получения  $ABTS^{+\bullet}$  в режиме *on-line* использована реакция жидкофазного окисления диаммонийной соли 2,2'-азинобис(3-этил-бензотиазолин-6-сульфоновой кислоты), которая обычно занимает несколько часов. Экспериментально установлено, что в этом случае решающее значение имеет выбор реагента-окислителя, pH и температура реакционной смеси. Найдено, что наибольшая скорость образования катион-радикала происходит под действием периодат-ионов в присутствии марганца(II) как катализатора (pH 7.4) при  $40^\circ C$ . В оптимальных экспериментальных условиях (pH 7.4) зависимость высоты регистрируемого пика, характеризующего концентрацию генерируемого радикала, от начальной концентрации субстрата ( $c^0_R$ ) в пределах от 10 – 100 мкМ при постоянном соотношении субстрат/окислитель = 2:1 подчиняется следующему линейному уравнению ( $r = 0.9998$ ):  $H$  (ед.А) =  $1.086 c^0_R - 0.002$ .

Для исследования противорадикального действия АОх была разработана схема ПИА, включающая генерирование  $ABTS^{+\bullet}$ , его реакцию с антиоксидантом и фотометрическое детектирование оставшегося радикала в реакционной зоне:



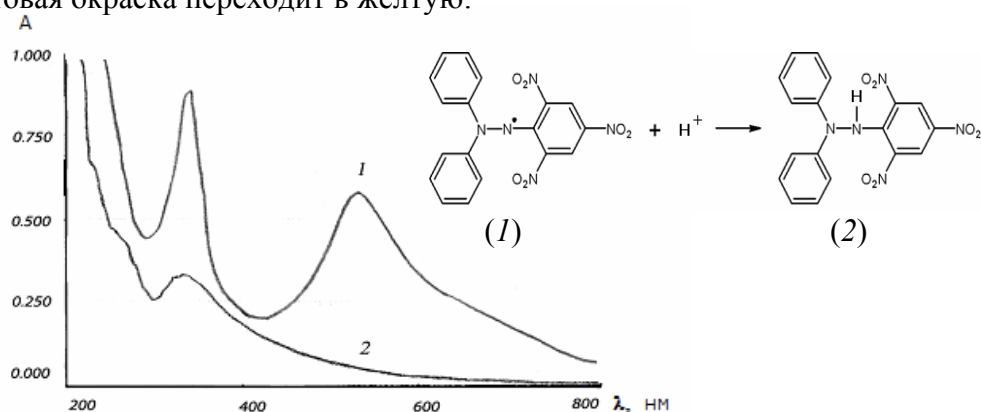
Установлено, что реакция  $ABTS^{+\bullet}$  с АОх протекает с переносом электрона и ее скорость существенно зависит от природы антиоксиданта. В частности, окисление аскорбиновой кислоты (Asc) до дигидроаскорбиновой кислоты (ДНА) может быть представлено следующей реакционной схемой:



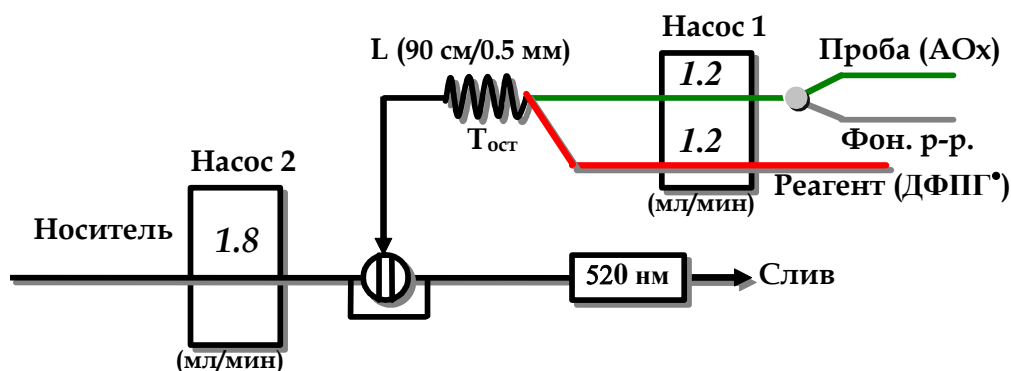
Исходя из кинетических данных, характеризующих различную скорость взаимодействия ряда известных антиоксидантов с  $ABTS^{+\bullet}$ , были выбраны условия, позволяющие количественно оценить антирадикальную эффективность лекарственных препаратов в единицах «тролокс.экв», а также по степени «радикального захвата».

## ПИ-метод на основе детектирования 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразил радикала

В основу другого ПИ-метода положено спектрофотометрическое детектирование триарилгидразильного радикала 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ<sup>•</sup>) в водно-этанольной среде. Молекула ДФПГ<sup>•</sup> представляет собой СР, характеризующийся стабильностью в различных средах и в широком интервале температур, что объясняется максимальной делокализацией свободного электрона по всей молекуле и пространственным экранированием атомов, несущих наибольшую спиновую плотность, а также отсутствием атомов водорода в тех положениях, где может происходить изомеризация или диспропорционирование. Кроме того, делокализация является причиной интенсивной фиолетовой окраски этого радикала в водно-спиртовых средах ( $\lambda_{\text{макс}} = 520 \text{ нм}$ ,  $\epsilon_{520} = 6.5 \times 10^3 \text{ см}^2/\text{моль}$ ). При взаимодействии с антиоксидантом, способным отдавать протон, происходит восстановление этого радикала, в результате чего его фиолетовая окраска переходит в желтую:



На основе данных, характеризующих оптические и окислительно-восстановительные свойства ДФПГ<sup>•</sup> в водно-этанольных средах в отсутствие и в присутствии антиоксидантов разработана следующая схема ПИА, функционирующая в режиме «остановленного потока»:



Поток пробы сливался с потоком раствора ДФПГ<sup>•</sup> и поступал в термостатируемую инъекционную спираль, в которой имела место индикаторная реакция между ДФПГ<sup>•</sup> и АОx. Далее микрообъемы реакционной смеси вводились в непрерывный поток носителя (50 % раствор этанола), который прокачивался через кювету спектрофотометрического детектора. Последний непрерывно регистрировал оптическую плотность проточного раствора при предварительно выбранном значении  $\lambda = \text{const}$ . Аналитическим сигналом служил скачок оптической плотности в инжектируемой (реакционной) зоне относительно оптической плотности потока носителя («нулевая линия»). Сигнал имел форму асимметричного пика, высота H которого обусловлена концентрацией оставшегося СР.

Возможности новых ПИ-методов были продемонстрированы на примере определения антирадикальной активности и степени радикального захвата ряда низкомолекулярных эндогенных антиоксидантов (аскорбиновой кислоты, мочевой кислоты, глутатиона и цистеина), тролокса (синтетического аналога  $\alpha$ -токоферола) и растительных антиоксидантов (галловой и кофейной кислот). Методы были также успешно использованы для оценки интегральной антиоксидантной активности противовоспалительных лекарственных препаратов и пищевых добавок.

Преимущества разработанных методов:

- высокая чувствительность и широкий диапазон определяемых значений;
- улучшенная воспроизводимость результатов;
- высокая производительность (100 -200 опр./час);
- малый объем пробы (менее 1 мл).

*Работа выполнена при финансовой поддержке Программ фундаментальных исследований Президиума РАН и РФФИ 09-03-00240.*