

УДК 641.12:66.014

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ ПИЩЕВЫХ ВЕЩЕСТВ

¹Паничкин А.В., ¹Большакова Л.С., ²Милентьев В.Н., ³Санников Д.П., ²Казьмин В.М.

¹ФГБОУ ВПО «Орловский государственный институт экономики и торговли»,
Орел, e-mail: ogietif@yandex.ru;

²ФГБУ «Центр химизации и сельскохозяйственной радиологии «Орловский»;

³ФГБОУ ВПО «Государственный университет – учебно-научно-производственный комплекс»

Исследована возможность использования хемилюминесценции для оценки антиоксидантной активности пищевых веществ. Предлагаемый способ основан на хемилюминесценции люминола в щелочной среде, интенсивность которой зависит от количества пероксидов в хемилюминесцентной пробе. Хемилюминесценцию регистрировали с помощью разработанной установки, содержащей насос-дозатор, светонепроницаемую камеру, стеклянный вакуумный фотоумножитель, компьютерную систему. Для усиления хемилюминесценции к люминолу добавляли раствор железосинеродистого калия. Изменения интенсивности хемилюминесценции фиксировали в момент введения анализируемой пробы в раствор люминола. В качестве анализируемой пробы использовали экстракт одуванчика, полученный путем сухой низкотемпературной перегонки. В его состав входят фенольные соединения, известные своей высокой антиоксидантной активностью. Установлено, что метод хемилюминесценции может быть использован для определения антиоксидантных свойств различных пищевых соединений.

Ключевые слова: хемилюминесценция, антиоксидантная активность, пероксиды, пищевые вещества

THE USE OF CHEMILUMINESCENCE FOR EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF NUTRIENTS

¹Panichkin A.V., ¹Bolshakova L.S., ²Milentev V. N., ³Sannikov D.P., ²Kazmin V.M.

¹Orel State Institute of Economy and Trade, Orel, e-mail: ogietif@yandex.ru;

²Center of chemicals and agricultural radiology «Orlovsky», Orel, e-mail: v.milentev@yandex.ru;

³State University education-science-production complex, Orel, e-mail: sannikov@ostu.ru

Explore the feasibility of using the chemiluminescence for the evaluation of the antioxidant activity of nutrients. The proposed method is based on chemiluminescence of luminol in the alkaline environment, the intensity of which depends on the number of peroxides in sample. Chemiluminescence recorded with the help of the developed installation containing the dosing pump, light-tight chamber, glass vacuum photomultiplier tube, a computer system. To strengthen chemiluminescence to luminol solution was added potassium ferricyanide. Changes in the intensity of chemiluminescence recorded at the time of the introduction of the sample solution in luminol. As the sample used dandelion extract, obtained by dry low-temperature distillation. It consists of phenolic compounds, known for their high antioxidant activity. It is established that the method of chemiluminescence can be used to determine the antioxidant properties of various food compounds.

Keywords: chemiluminescence, antioxidant activity, peroxides, food substances

На сегодняшний день хемилюминесценция представляет большую область науки, находящуюся на стыке между химией, физикой и биологией. При хемилюминесценции происходит прямое преобразование химической энергии в энергию электромагнитных колебаний, т.е. в свет. Используя хемилюминесценцию, можно узнать о том, как протекает реакция, каков ее механизм, что необходимо для эффективного и рационального проведения технологических процессов. Если технологический процесс получения какого-либо химического продукта сопровождается хемилюминесценцией, то ее интенсивность может служить мерой скорости процесса: чем быстрее идет реакция, тем ярче свечение. В ходе реакции хемилюминесценции получают богатые энергией продукты, которые затем отдают энергию, излучая свет, т. е. химическая энергия превращается в энергию электромагнитного излучения [6].

Цель исследования – изучить возможность использования хемилюминесценции для оценки антиоксидантной активности пищевых веществ.

Результаты исследования и их обсуждение

Проблема оценки антиоксидантной активности пищевых веществ является весьма актуальной. Использование термина «антиоксидантная активность» для того, чтобы показать полезность того или иного продукта, зачастую делается без всякой химической и биохимической аргументации. Как правило, под антиоксидантной активностью любого вещества подразумевается эффективность снижения величины перекисного числа. Само же понятие перекисного числа также не совсем раскрывает свою химическую суть, поскольку не вполне соответствует кинетике и термодинамике стадий метаболизма того или иного пищевого

продукта. К тому же эта величина используется для характеристики липидов в форме жиров [4]. Однако процессы окисления и формирования перекисей в организме происходят не только при употреблении жиров, но и других продуктов. Другими словами, содержание перекиси в том или ином продукте можно сказать «взвешивается» на своеобразных весах, где «эталонным весом» является единица концентрации в кислой среде иодид иона, окисленного перекисями, вследствие чего образуется молекулярный иод:



При титровании молекулярного иода раствором, содержащим тиосульфат натрия, устанавливается его концентрация и, следовательно, определяется количество окислителей иодид ионов, т.е. перекисных соединений, что собственно и называется перекисным числом [1]. Определение перекисного числа с помощью такого рода «взвешивания» основано на реакции, приведенной на рис. 1.

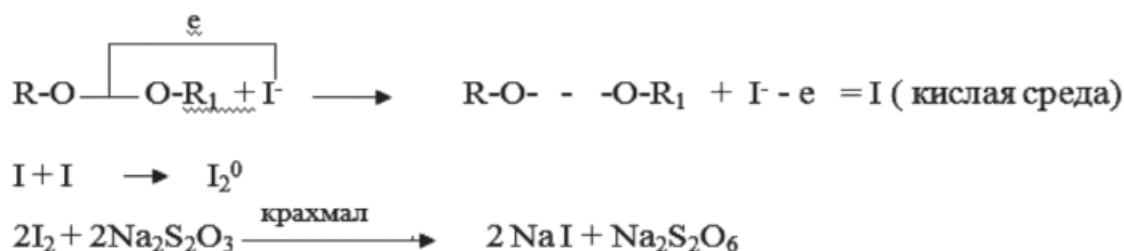


Рис. 1. Определение перекисного числа с помощью тиосульфата натрия

Таким образом, концентрация пероксидов определяется из уравнения

$$C(I_2) = Y(C[-O-O-]), \quad (3)$$

где Y – коэффициент корреляции между концентрацией молекулярного иода и концентрацией пероксидов.

Предлагаемый нами способ определения пероксидов в продуктах основан на хемилюминесценции люминола ($C_{[лм]}$) в щелочной среде, интенсивность ($I_{хл}$) которой зависит от концентрации пероксидов ($C_{[-O-O-]}$), в хемилюминесцентной пробе [2]:

$$I_{хл} = H_{хл} \omega, \quad (4)$$

где $H_{хл}$ – квантовый выход хемилюминесценции; ω – скорость реакции с участием пероксидов:

$$k_{хл} C_{[-O-O-]} C_{[лм]} = \omega, \quad (5)$$

где $k_{хл}$ – константа скорости реакции или при:

$$C_{[лм]} k_{хл} H_{хл} = K, \quad (6)$$

имеем:

$$I_{хл} = K C_{[-O-O-]}. \quad (7)$$

Количество пероксидов ($-O-O-$) определяется светосуммой (S):

$$S = \int_0^t I_{хл} d(t). \quad (8)$$

Величина S зависит от степени полноты расходования перекиси в хемилюминесцентной реакции.

Для определения константы K строится калибровочная кривая зависимости светосуммы S от концентрации перекиси, которую устанавливают титрованием:

$$S = f(C[-O-O-]). \quad (9)$$

В качестве пероксидов используется перекись водорода H_2O_2 .

Затем сравниваются данные, полученные из уравнения (3) и (9). На основании сравнения Y и K делается вывод о согласовании механизмов реакций, лежащих в основе определения пероксидов указанными способами. Выявлено, что в этом интервале концентраций пероксидов Y и K действительно согласуются друг с другом и поэтому их можно использовать для определения перекисного числа [2].

Хемилюминесценцию наблюдали в щелочной среде, содержащей люминол (5-амино-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-фталазиндион, гидразид 3-аминофталевой к-ты, H_2L). Регистрировали ее с помощью хемилюминесцентной установки, включающей стеклянный вакуумный фотоумножитель. Питание фотоумножителя осуществляется с помощью высоковольтного выпрямителя (7), сопряженного с блоком (9), усиливающим сигнал фотоумножителя, который регистрируется на дисплее монитора компьютера (5).

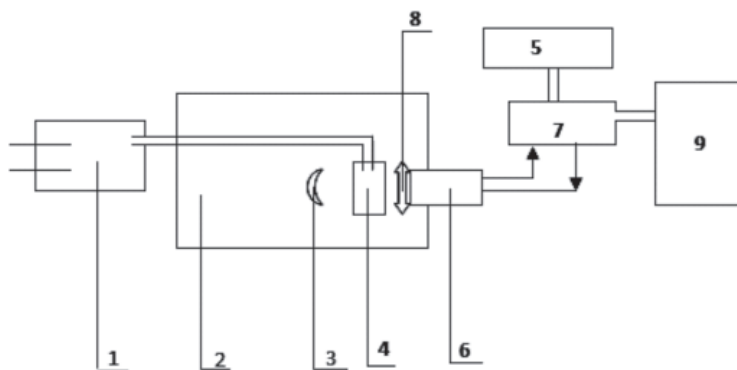


Рис. 2. Регистрация хемилюминесценции анализируемого продукта:
 1 – насос-дозатор; 2 – светонепроницаемая камера; 3 – зеркало; 4 – кювета; 5 – компьютерная система; 6 – фотоумножитель; 7 – высоковольтный выпрямитель; 8 – устройство, позволяющее определять спектральную область хемиллюминесцентного излучения;
 9 – блок, усиливающий сигнал фотоумножителя

Насос-дозатор (1) необходим для ввода анализируемой пробы в кювету (4), содержащую хемиллюминесцирующий раствор люминола. Данный дозатор выполняет роль перемешивателя вводимой пробы с хемиллюминесцирующим раствором. Для усиления скорости реакции и интенсивности хемиллюминесценции к люминолу добавляли раствор железосинеродистого калия. Перемешивание производится пузырьками воздуха, полученными при прокачивании насосом воздуха через жидкость раствора. Зеркало (3), находящееся в светонепроницаемой камере (2), служит для лучшего светосбора хемиллюминесцентного излучения, падающего на фотокатод фотоумножителя (6), вмонтированного в светонепроницаемую камеру. Дозатор позволяет вводить нужные компоненты жидкости в кювету, не открывая светонепроницаемой камеры (2) во время опытов. При этом указанные жидкости поступают в кювету (4) по стеклянным либо пластмассовым трубкам. Компьютерная система позволяет регистрировать зависимость интенсивности свечения I от времени t , то есть кинетику хемиллюминесценции:

$$I = f(t). \quad (10)$$

Компьютерная система отражает константы нарастания и спада в функции $I = f(t)$, которые сопрягаются с константами скоростей реакций, обуславливающих хемиллюминесценцию, то есть с их кинетиками [5]. В хемиллюминесцентную камеру включается устройство (8), позволяющее определять спектральную область хемиллюминесцентного излучения, то есть зависимость:

$$I = f_1(\lambda). \quad (11)$$

Этот блок представляет собой кассету в виде диска, в которую вмонтированы гра-

ничные светофильтры. Смена светофильтров осуществляется поворотом кассеты диска относительно горизонтальной оси, соединяющей центры плоскости светофильтров и плоскости фотокатода фотоумножителя.

Процесс измерения осуществляется следующим образом:

1. Устанавливается реакция фотоумножителя на изменения напряжения его питания и на изменение интенсивности эталонного источника света, который падает на его катод.

2. Производится заполнение кюветы раствором люминола в щелочной среде.

3. Осуществляется заполнение дозатора анализируемой пробой.

4. Регистрируется зависимость интенсивности хемиллюминесценции от времени t . Наблюдения за хемиллюминесценцией осуществляется до момента времени t^1 , при котором изменение I^1 от времени t минимально: $I^1 = f^1(t)$.

5. Подается с помощью дозатора порция анализируемого раствора.

6. Наблюдается хемиллюминесценция анализируемой пробы, кинетика которой $I = f(t)$.

На рис. 3 представлен график зависимости функций ($I^1 = f^1(t)$), сопряженный с графиком ($I = f(t)$), после введения анализируемого раствора.

Как видно из рис. 3, интенсивность хемиллюминесценции люминола меняется: за резким подъемом следует резкий спад свечения после добавления анализируемой пробы.

Поскольку усиление хемиллюминесценции при окислении люминола связано с образованием пероксидов, то снижение интенсивности хемиллюминесценции после введения анализируемой пробы свидетельствует об уменьшении их количества [6].

Следовательно, можно говорить о наличии антиоксидантной активности у соединений, входящих в состав анализируемой пробы.

Необходимо отметить, что в качестве анализируемой пробы использовался полу-

ченный путем сухой низкотемпературной перегонки экстракт одуванчика, в состав которого входят фенольные соединения, известные своей высокой антиоксидантной активностью.

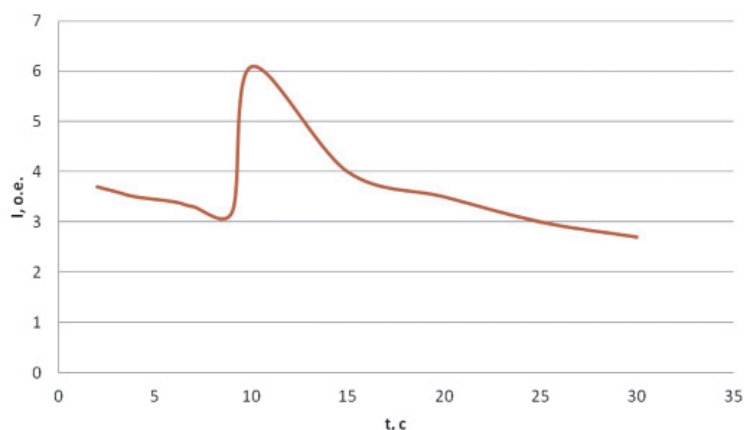


Рис. 3. График зависимости функций ($I^1 = f^1(t)$), сопряженный с графиком ($I = f(t)$), после введения анализируемого раствора

Кроме того, в ходе эксперимента установлено, что при помощи хемиллюминесценции можно определять количество пероксидов в сверхразбавленных системах, что важно для оценки начала окисления продуктов, например, в процессе их хранения [3].

Таким образом, проведенные исследования показали, что способ определения пероксидов в продуктах, основанный на хемиллюминесценции люминола в щелочной среде, позволяет оценить антиоксидантную активность пищевых веществ и может быть использован для установления антиоксидантных свойств различных пищевых соединений.

Список литературы

1. Васильев Р.Ф. Химическое свечение // Химия и химика, 21.01.10. – URL: <http://chemistry-chemists.com>. (дата обращения: 22.08.13).
2. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты // Вестн. РАМН. – 1998. – № 7. – С. 43–51.
3. Кондрашова Е.А. Хемиллюминесценция как наиболее чувствительный метод иммуноферментного анализа и его применение // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – № 9. – С. 32.
4. Любимов, Г.Ю. Хемиллюминесцентный анализ // Иммунология. – 1991. – № 1. – С. 40–49.
5. Маянский А.Н., Невмятуллин А.Л., Чеботарь И.В. Реактивная хемиллюминесценция в системе фагоцитоза // Микробиология. – 1987. – № 1. – С. 109–115.

6. Шерстнев М.П. Кальцийзависимый и кальцийнезависимый пути генерации хемиллюминесценции клеток // Вопросы хемиллюминесценции. – 1991. – № 2. – С. 1–4.

References

1. Vasiliev R.F. Chemical glow, Chemistry and chemists, 21.01.10. Available at: URL: <http://chemistry-chemists.com>. (date of access: 22.08.13).
2. Vladimirov, Y.A., Free radicals and antioxidants. Vestn. Russian Academy of medical Sciences, 1998, no. 7, pp. 43–51.
3. Kondrashova, E.A., Chemiluminescence as the most sensitive method for immune-enzyme analysis and its application. Clinical laboratory diagnostics, 1999, no. 9, pp. 32.
4. Lyubimov, G.Y., Chemiluminescent analysis. Immunology, 1991, no. 1, pp. 40–49.
5. Mayansky A.N., Nevmyatullin A.L., Chebotar I.V., Century Reactive chemiluminescence in the system of phagocytosis. Microbiology, 1987, no. 1, pp.109-115.
6. Sherstnev M.P., Calcium dependent and Calcium independent path generation chemiluminescence cells. Questions of chemiluminescence, 1991, no. 2, pp. 1–4.

Рецензенты:

Литвинова Е.В., д.т.н., профессор кафедры технологии, организации и гигиены питания, ФГБОУ ВПО «ОрелГИЭТ», г. Орел;
Ковалева О.А., д.б.н., директор ИНИИЦ, ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный университет», г. Орел.
Работа поступила в редакцию 08.11.2013.