

УДК 543.426:543.42.062:543.641

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИДРОПЕРОКСИДОВ ЛИПИДОВ МЕТОДОМ АКТИВИРОВАННОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

П.О. Волкова, А.В. Алексеев, А.А. Джатдоева, Е.В. Проскурнина,
Ю.А. Владимиров

(кафедра медицинской биофизики факультета фундаментальной медицины;
e-mail: proskurnina@gmail.com)

Разработана методика определения гидропероксидов липидов хемилюминесцентным методом в системе липидный субстрат – Fe(II) – кумарин С-525 (активатор хемилюминесценции). Гидропероксиды липидов определяли методом добавок с помощью стандартного соединения *трет*-бутилгидропероксида. Предел обнаружения по *трет*-бутилгидропероксиду $c_{\text{мин}} = 164$ нМ. Проверка правильности осуществлена методом иодометрического титрования. Проведено определение гидропероксидов липидов в пищевом продукте.

Ключевые слова: гидропероксиды липидов, перекисное окисление липидов, активированная хемилюминесценция, кумарин С-525.

Гидропероксиды липидов образуются в липидных системах в процессе перекисного окисления – сложного многостадийного цепного процесса окисления кислородом липидных субстратов (главным образом полиненасыщенных жирных кислот), включающего стадии с участием и образованием свободных радикалов [1]. В настоящее время существует много методов определения гидропероксидов липидов, главным образом в пищевых продуктах (растительных маслах). Одним из самых точных методов является определение перекисного числа иодометрическим титрованием [2]. Преимущества титрования – высокая точность, хорошая чувствительность, отсутствие необходимости использования индикаторов, возможность использования неводных растворителей. Основные ошибки в иодометрии возникают по следующим причинам:

- потеря иода вследствие его летучести;
- окисление Γ^- -ионов кислородом воздуха;
- мешающее влияние веществ, индуцирующих окисление иодида (Cu^{2+} , NO_3^- , NO и др.);
- щелочная среда;
- адсорбция молекул иода;
- нарушение методики определения в отношении концентраций применяемых растворов, порядка приливания растворов и других условий протекания реакций.

Для получения точных и хорошо воспроизводимых результатов необходимо строго придерживаться рекомендуемых методик определения. Основным недостатком иодометрического титро-

вания при определении гидропероксидов липидов в биологических объектах является относительно невысокий предел обнаружения, а следовательно, и необходимость использовать большое количество образца.

Из инструментальных методов для определения гидроперекисей липидов в растительных маслах активно используют ИК-спектроскопию с Фурье-преобразованием [3, 4]. Калибровочные стандарты для количественного определения готовят добавлением *трет*-бутилгидропероксида, олеиновой кислоты и воды. Разработан спектрофотометрический метод для определения гидропероксидов на основе сильно поглощающих ионов (Γ_3^-) при 360 нм в видимой области [5]. Описана методика определения гидропероксидов липидов, основанная на их взаимодействии с ионами Fe(II) с образованием Fe(III), которые реагируют с ксиленоловым оранжевым с образованием окрашенного соединения. Продукт реакции фотометрируют при 560 нм [6].

Для определения перекисных соединений используются также электрохимические методы. Биосенсоры для обнаружения перекиси водорода и перекисных соединений разработаны на основе иммобилизированной каталазы на электроде с клиноптилолитом и углеродной пастой с использованием бычьего сывороточного альбумина и глутаральдегида. Подобный биосенсор был успешно применен для определения пероксидов в образцах молока [7]. Существует аналогичный вольтамперометрический способ с использованием вращающегося дискового электрода [8].

Поскольку процесс перекисного окисления липидов сопровождается хемилюминесценцией (ХЛ), весьма перспективными являются хемилюминесцентные методики, которые характеризуются высокой чувствительностью, простотой и дешевизной. Тем не менее в литературе имеется мало сведений об аналитических хемилюминесцентных методиках определения гидропероксидов липидов в биологических объектах. Предложен хемилюминесцентный метод определения содержания LOOH в сыворотке (плазме) крови при взаимодействии гидропероксидов с системой микропероксидаза–изолюминол [9, 10]. Этот метод предлагается использовать после разделения липидов сыворотки методом ВЭЖХ, что делает анализы дорогостоящими, длительными и трудоемкими.

Цель настоящей работы – разработка методики определения гидропероксидов липидов хемилюминесцентным методом. В рамках поставленной цели были решены следующие задачи:

исследованы различные аналитические системы,

подобраны оптимальные условия для определения гидропероксидов,

оценены метрологические характеристики,

методика апробирована на реальном объекте.

Экспериментальная часть

Объекты исследования, реагенты и аппаратура. Работу выполняли на хемилюминометре «SmartLum-5773» («ДИСофт», Россия), позволяющем регистрировать развитие хемилюминесценции во времени. Пробирки с растворами перемешивали на встряхивателе типа «Vortex».

Буферный раствор концентрацией 20 ммоль/л готовили растворением навески *трис*-HCl (оксиметиламинметан хлорид) («Reanal», Венгрия) в дистиллированной воде. Для установления необходимого значения pH 7,4 использовали конц. HCl, контролируя кислотность с помощью pH-метра «HANNA pH 211» (США). Буферный раствор перед экспериментом нагревали в термостате при 37°C. Раствор соевого лецитина (ICN Biochemicals, 102147) готовили растворением навески в 20 mM буферном растворе. Раствор FeSO₄·7H₂O («ч.д.а.», «Реахим») готовили растворением навески в 0,1 M HCl. К полученному раствору добавляли 1–2 гранулы цинка («ч.д.а.», «Реахим»).

Исходный раствор (1 ммоль/л) кумарина C-525 (ООО НПФ «Альфа-Аконис») готовили растворением навески в метаноле. Рабочие растворы го-

товили разбавлением исходного раствора 20 mM *трис*-буферным раствором. Новые потенциальные активаторы хемилюминесценции, в том числе и класса кумаринов, были приобретены в ОАО ПО «ТОС» (таблица), растворы указанных соединений готовили аналогичным образом.

В работе использованы следующие поверхностно-активные вещества: додецилсульфат натрия («Sigma-Aldrich»), тритон X-100 («Sigma-Aldrich») и Твин-60 («Sigma»). Для иодометрического титрования применяли хлороформ, ледяную уксусную кислоту, KI, Na₂S₂O₃, крахмал (все реактивы «Sigma-Aldrich»).

Результаты и их обсуждение

Для моделирования перекисного окисления липидов ранее использовали либо липосомы яичного желтка [11, 12], либо митохондрии [13]. Методики приготовления липосом и выделения митохондрий трудоемки и требуют специального оборудования. В нашей работе в качестве модельной была выбрана система на основе соевого лецитина.

Соевый лецитин (азо-лектин) – препарат, содержащий 98% фосфолипидов, в том числе 20–24% фосфатидилхолина и 18–22% фосфатидилсерина; в структуре фосфолипидов содержатся линолевая (28–30%) и линоленовая кислоты (всего более 60%), средняя молекулярная масса 760 Да. Это вещество стабильно при хранении, недорого, не требует специальной пробоподготовки и хорошо растворяется в дистиллированной воде. Кроме соевого лецитина модельная ХЛ-система содержала Fe(II) и активатор хемилюминесценции. Общий объем системы составлял 1 мл.

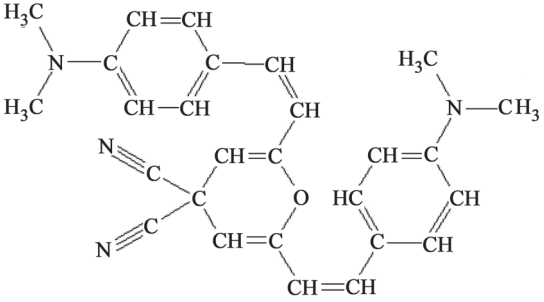
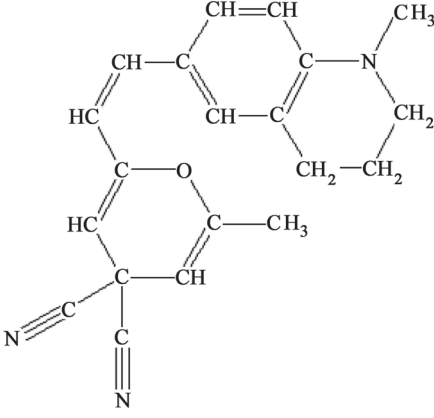
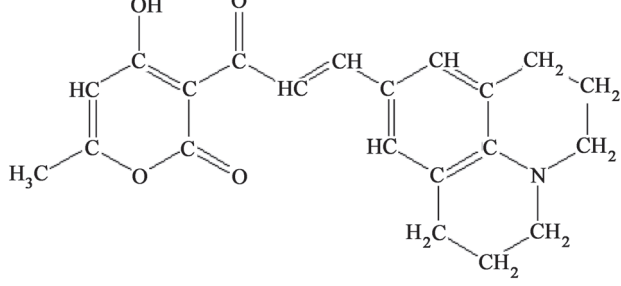
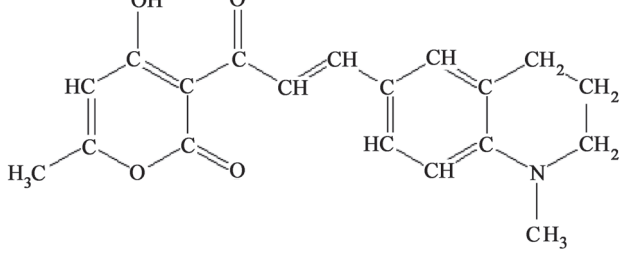
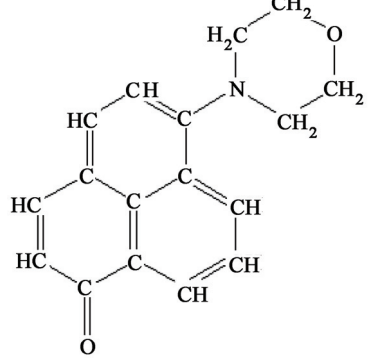
Регистрацию кинетических кривых проводили по следующей схеме: в кювету помещали необходимый объем раствора Fe (II) и в течение 1 мин регистрировали фоновый сигнал. Затем при помощи шприца в режиме *online* добавляли рассчитанное количество 20 mM *трис*-буферного раствора, раствора соевого лецитина, активатора, раствора ПАВ (в опытах по изучению влияния ПАВ) и *трет*-бутилгидропероксида (при построении градуировочной зависимости). Все эти компоненты предварительно смешивали в пробирке. Во время измерения раствор в кювете перемешивали механической мешалкой со скоростью 16 об/с.

Типичный вид кинетической кривой (рис. 1) соответствует классической кинетике перекисного окисления в липидных системах [14, 15] с

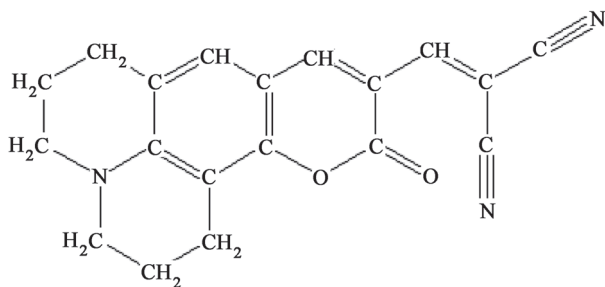
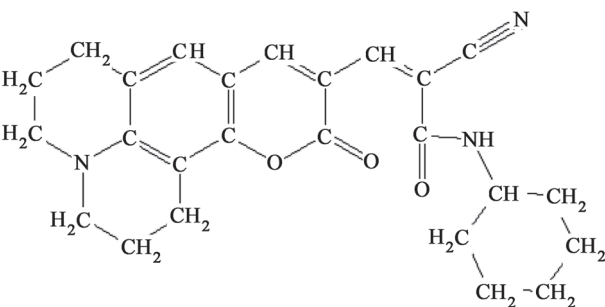
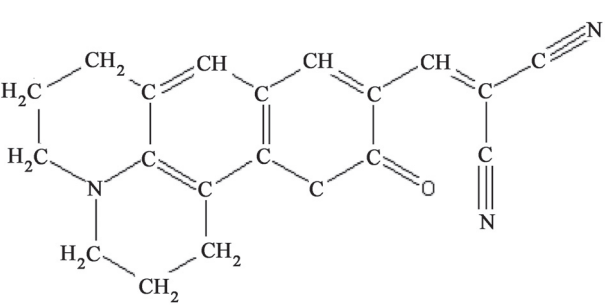
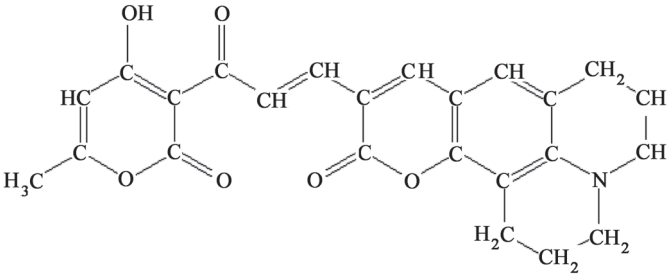
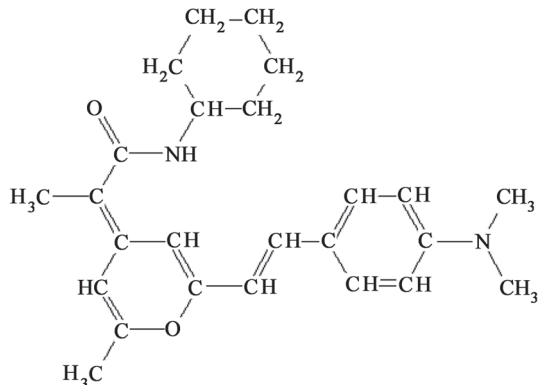
Структурные формулы и коэффициенты усиления исследованных соединений

Номер	Структурная формула	Коэффициент усиления
1		1,21
2		0,66
3		1,61
4		0,89
5		1,08

Продолжение таблицы

6		1,07
7		1,10
8		1,01
9		0,76
10		0,97

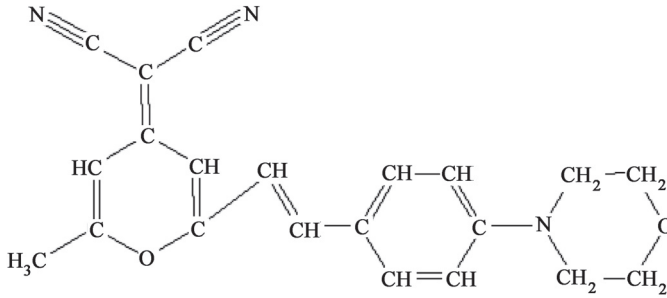
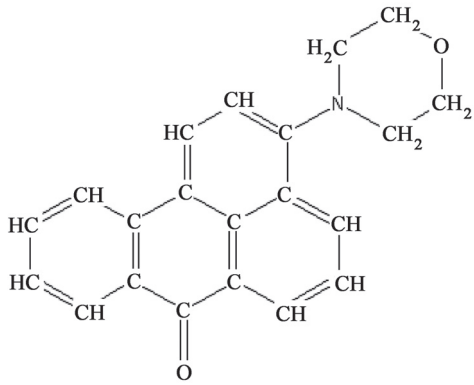
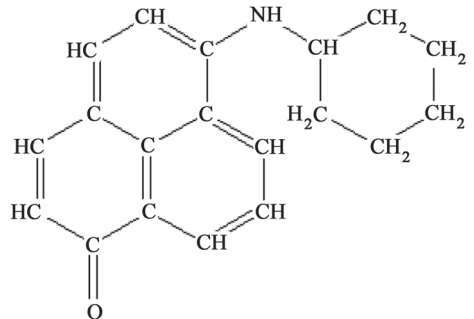
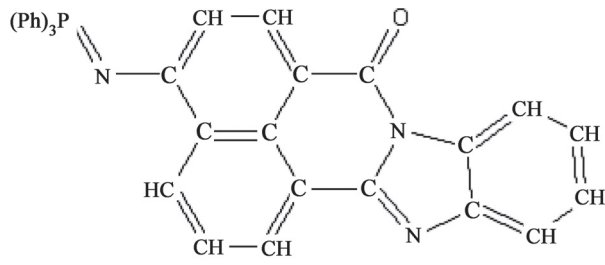
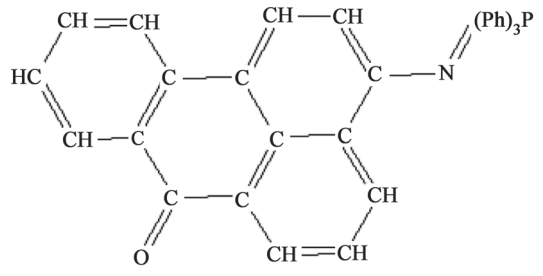
Продолжение таблицы

11		4,60
12		1,84
13		1,18
14		1,37
15		1,21

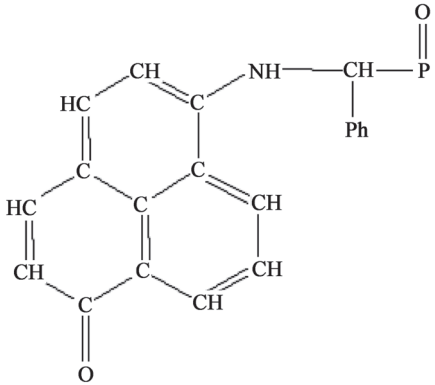
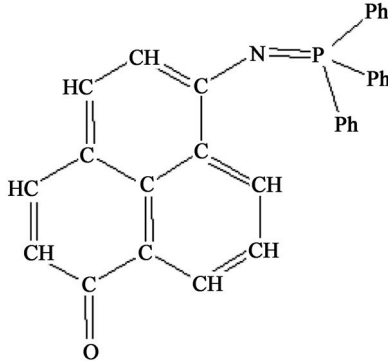
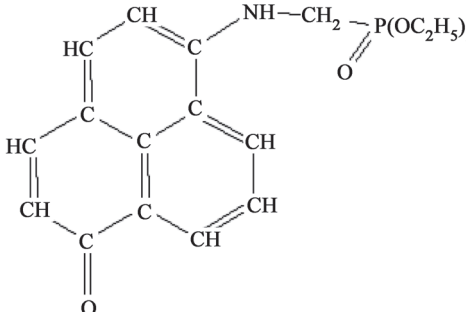
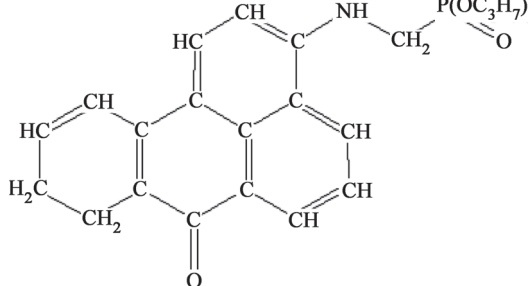
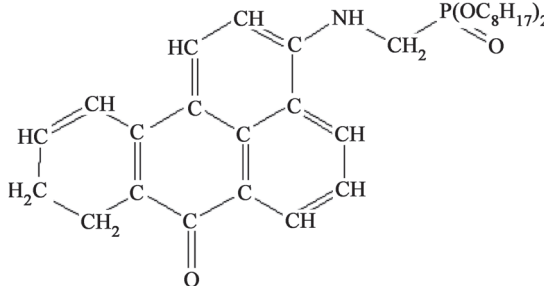
Продолжение таблицы

16		0,89
17		2,44
18		1,71
19		1,14
20		0,84

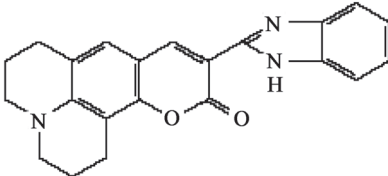
Продолжение таблицы

21		1,06
22		0,95
23		0,99
24		1,13
25		0,81

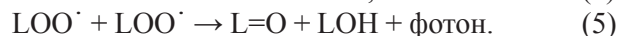
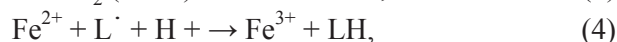
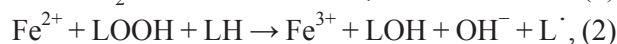
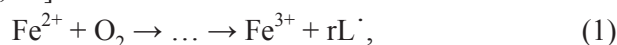
Продолжение таблицы

26		1,05
27		1,17
28		0,84
29		1,10
30		0,67

Окончание таблицы

C-525		4,65
-------	---	------

осуществлением следующих основных реакций [1, 15]:



Кинетическая кривая состоит из следующих фаз:

быстрая вспышка, которая определяется реакцией гидропероксида с ионами двухвалентного железа (реакция 2), ее амплитуда может служить аналитическим сигналом латентного периода, обусловленного антиоксидантным действием ионов железа (реакция 4);

медленная вспышка, протекание которой определяют в основном реакции 2, 3 и 5.

Изучение влияния ПАВ и активаторов

Раствор лецитина в воде при высокой концентрации представляет собой гетерогенную систему, что ухудшает воспроизводимость и чувствительность ХЛ-определения. Было сде-

лано предположение, что присутствие поверхностно-активных веществ (ПАВ) в системе будет гомогенизировать систему и увеличивать амплитуду быстрой вспышки, однако оно не подтвердилось. Изученные ПАВ либо не влияли на амплитуду быстрой вспышки хемилюминесценции (додецилсульфат натрия, Тритон X-100), либо содержали компоненты, реагирующие с ионами железа, что сопровождалось хемилюминесценцией в отсутствие липидного субстрата (Твин-60).

Для повышения чувствительности ХЛ, сопровождающей перекисное окисление липидов, ранее был предложен физический активатор – кумарин С-525. Добавление этого соединения увеличивает квантовый выход ХЛ-реакции [16] и позволяет измерять хемилюминесценцию в малых количествах биологического материала. Вторым достоинством является селективность усиления [16]. Важно и то, что физические сенсибилизаторы не участвуют в реакциях, а следовательно, их применение не сказывается на ходе процессов ни в химических, ни в биологических системах [16].

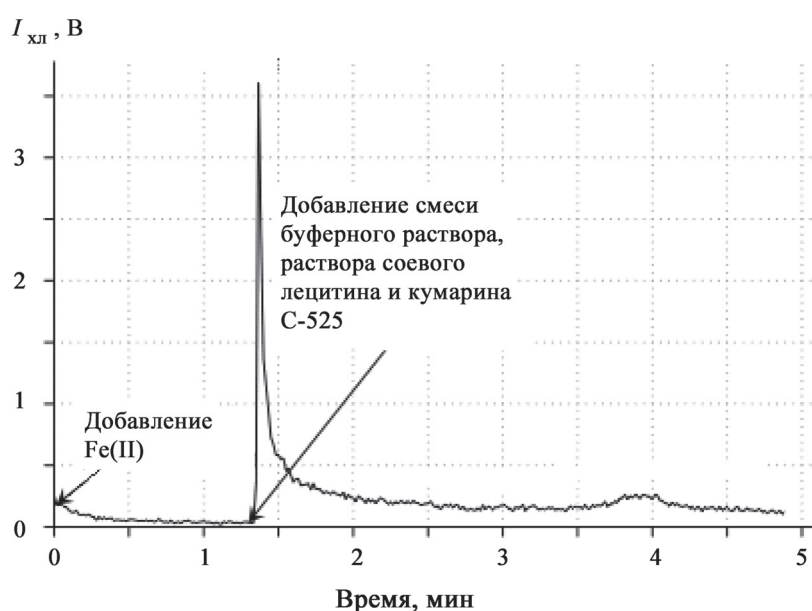


Рис. 1. Хемилюминесцентная кривая перекисного окисления липидов; состав системы: 10 мкг/мл соевого лецитина, 0,1 мМ Fe (II), 50 мкМ С-525. Быстрая и медленная вспышки и латентный период отмечены на рисунке

В настоящей работе мы исследовали ряд новых красителей, в том числе кумариновых соединений, с целью определить наиболее эффективный активатор ХЛ. Все вещества добавляли в конечной концентрации 50 мкМ и регистрировали ХЛ-кривые, по которым определяли амплитуду быстрой вспышки. Рассчитывали коэффициенты усиления ХЛ-активаторами как отношение амплитуды быстрой вспышки системы с активатором к амплитуде быстрой вспышки без активатора. Три соединения из изученных, которые были производными кумарина, оказались эффективными активаторами ХЛ. Кумарин С-525 и соединения № 11 и № 17 усиливали вспышку хемилюминесценции соответственно в 4,65, 4,60 и 2,44 раза (таблица).

Подбор концентрации реагентов

Для подбора соотношения значений рабочей концентрации компонентов системы получены кинетические кривые при разной концентрации соевого лецитина, кумарина С-525 и Fe(II). Оптимальными оказались значения рабочей концентрации 0,10 мМ Fe(II) и 50 мкМ С-525. Зависимость максимума хемилюминесценции от концентрации лецитина в диапазоне от 0 до 100 мкг/мл имеет линейный характер, коэффициент корреляции $r = 0,997$:

$$I_{\text{макс}} = (98,96 \pm 2,05) \cdot c + (0,65 \pm 0,05) \\ (P = 0,95; n = 6), \quad (6)$$

где c – концентрация соевого лецитина в мкг/мл, $I_{\text{макс}}$ – интенсивность быстрой вспышки, В.

Трет-бутилгидропероксид как стандартное соединение

Трет-бутилгидропероксид широко применяется в качестве стандарта при определении гидроперекисей липидов в биологических объектах, пищевых продуктах и медицинских препаратах [9, 17]. При проведении ХЛ-опыта в системе трет-бутилгидропероксид – Fe(II) – кумарин С-525 уровень хемилюминесценции не отличался от фонового, так как для развития перекисного окисления необходима липидная матрица, по этой причине в систему добавляли постоянное количество соевого лецитина. Были проведены эксперименты при разных концентрациях трет-бутилгидропероксида с постоянными конечными концентрациями (10 мкг/мл соевого лецитина; 50 мкМ кумарина С-525; 0,1 мМ Fe(II)).

Уравнение градуировочной прямой:

$$I_{\text{макс}} = (53,21 \pm 1,28) \cdot c_{\text{т-ВНР}} + (2,67 \pm 0,72) \\ (P = 0,95; n = 6), \quad (7)$$

где $I_{\text{макс}}$ – интенсивность быстрой вспышки (В), $c_{\text{т-ВНР}}$ – концентрация трет-бутилгидропероксида (мкМ).

Коэффициент корреляции $r = 0,999$; предел обнаружения по трет-бутилгидропероксиду $c_{\text{мин}} = 164$ нМ; коэффициент чувствительности $s = 53,21 \pm 1,28$ В·л/моль; относительное стандартное отклонение $s_r = 1,37 \cdot 10^{-2}$. Таким образом, разработанная методика обладает удовлетворительными метрологическими характеристиками.

Экстраполяция прямой до пересечения с осью концентраций стандартного раствора трет-бутилгидропероксида (метод добавок) позволяет определить содержание гидропероксидов в исследуемом образце, в нашем случае – коммерческий препарат соевого лецитина в единицах трет-бутилгидропероксида. Концентрация гидропероксидов в лецитине составила:

$$c_{\text{ROOH}} = (2,67 \pm 0,72) / (53,21 \pm 1,28) = \\ = 0,05 \text{ мкМ}. \quad (8)$$

Проверка правильности

Содержание гидропероксидов липидов в образцах соевого лецитина разной концентрации, оцененное по интенсивности хемилюминесценции, было проверено стандартным иодометрическим методом по ГОСТ Р 51487-99. В коническую колбу (300 мл) вносили навеску образца массой 1 г и 10 мл хлороформа; после растворения пробы приливали 10 мл ледяной уксусной кислоты и 1 мл 10%-го раствора KI. Колбу закрывали пробкой, перемешивали в течение 1 мин и оставляли в темном месте на 15 мин. Затем приливали 75 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивали и вносили 5 капель 1%-го раствора крахмала. Оттитровывали выделяющийся иод 0,01 М раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Перекисное число рассчитывали по формуле:

$$\text{ПЧ} = ((V_0 - V_1)/m) \cdot c \cdot 1000, \quad (9)$$

где V_0 – объем раствора тиосульфата натрия, использованного при контрольном измерении, мл; V_1 – объем раствора тиосульфата натрия, использованного при измерении, мл; c – концентрация использованного тиосульфата натрия, моль/л; m – масса испытуемой пробы, г.

Методы продемонстрировали достаточно высокий уровень корреляции ($r = 0,989$, $p < 0,001$) (рис. 2). Уравнение корреляции:

$$\text{ПЧ} = 0,84c_{\text{т-ВНР}} + 31,38, \quad (10)$$

где $c_{\text{т-ВНР}}$ – концентрация гидропероксидов ли-

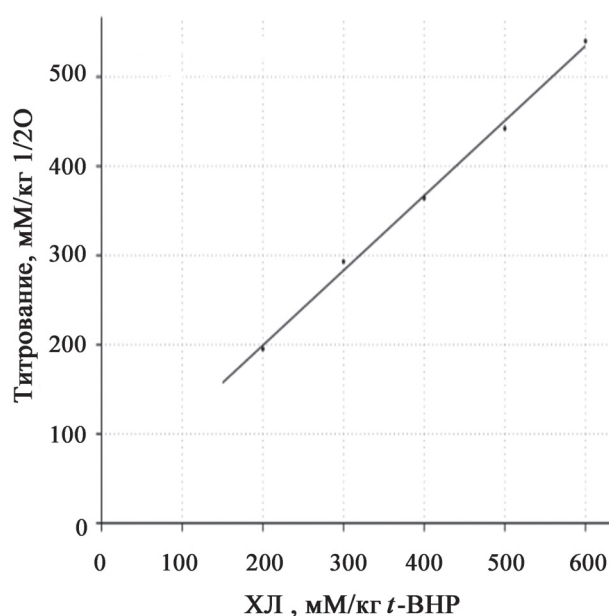


Рис. 2. Корреляция между значениями содержания липидных гидропероксидов, определенными методом хемилюминесценции и иодометрическим титрованием

пидов в единицах *трет*-бутилгидропероксида, mM/kg; ПЧ – перекисное число, mM/kg 1/2O₂.

Однако при определении гидропероксидов по данной методике обнаружено некоторое «ложное» количество этих соединений в образце, где гидропероксиды вообще не были добавлены. Кроме того, ХЛ-метод дает завышенное (на 19%) значение концентрации гидропероксидов по сравнению с иодометрическим методом. Это связано с тем, что кинетические кривые при разложении липогидропероксидов ионами Fe²⁺ не вполне идентичны кривым ХЛ при разложении *трет*-бутилгидропероксида, а кроме того, квантовый выход свечения может быть не одним и тем же. Поэтому получаемые данные могут либо быть выражены в эквивалентной концентрации *трет*-

бутилгидропероксида, либо рассчитываться по уравнению:

$$c_{\text{LOOH}} = 1,19c_{\text{ROOH}} \quad (11)$$

Определение липидных гидропероксидов в сухих сливках

Методику применяли для определения гидропероксидов липидов в сухих сливках «Аристократ» методом добавок с использованием *трет*-бутилгидропероксида. Аналитическая ХЛ-система состояла из Fe(II) (конечная концентрация 0,1 mM) и кумарина С-525 (50 мкМ), 10 мг/мл раствора сухих сливок в воде и разного количества *трет*-бутилгидропероксида (конечные концентрации 0; 50; 80; 110; 140; 170 мкМ). Аналитическим сигналом служил максимум быстрой вспышки.

Уравнение градуировочной прямой:

$$I_{\text{макс}} = (0,191 \pm 0,008) \cdot c + (4,926 \pm 0,825) \quad (P = 0,95; n = 6), \quad (12)$$

где $I_{\text{макс}}$ – интенсивность быстрой вспышки (В), c – концентрация липидных гидропероксидов в единицах концентрации *трет*-бутилгидропероксида (мкМ). Коэффициент корреляции: $r = 0,997$.

Рассчитанное содержание гидропероксидов липидов в единицах *трет*-бутилгидропероксида в исходном порошке сухих сливок:

$$c_{t\text{-ВНР}} = (2,58 \pm 0,27) \text{ mM в 1 г порошка.}$$

Таким образом, разработана методика определения гидропероксидов липидов методом активированной хемилюминесценции с использованием *трет*-бутилгидропероксида как стандартного соединения. Данная методика применима для определения содержания гидропероксидов липидов в пищевых продуктах.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 14-04-01361а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
2. Масла растительные и жиры животные. Метод определения перекисного числа, ГОСТ Р 51487-99/1999.
3. Van de Voort F.R. // J. Am. Oil. Chem. Soc. 1994. Vol. 71. P. 921.
4. Van de Voort F.R. // Food. Anal. Methods. 2008. Vol. 1. P. 153.
5. Bloomfield M.S. // Analyst. 1999. Vol. 124. P. 1865.
6. Grau A. // J. Agric. Food. Chem. 2000. Vol. 48. P. 4136.
7. Silva R.A.B. // Food. Chem. 2012. Vol. 133. P. 200.
8. Lagrange J., Lagrange P. // Fresenius J. Anal. Chem. 1991. Vol. 339. P. 452.
9. Yamamoto Y., Kambayashi Y., Ueda T. // Methods Mol. Biol. 1998. Vol. 108. P. 63.
10. Adachi J. et al. // Lipids. 1998. Vol. 33. P. 1235.
11. Шерстнев М.П., Азимбаев Т.К., Владимиров Ю.А. // Биофизика. 1995. Т. 40. С. 531.
12. Васильева О.В. // Биол. мембраны. 1998. Vol. 15. С. 177.
13. Суслова Т.Б., Оленев В.И., Владимиров Ю.А. // Биофизика. 1969. Т. 14. С. 510.
14. Погосян Г.А. // Биофизика. 1996. Vol. 41. С. 342.
15. Измайлов Д.Ю., Владимиров Ю.А. // Биологические мембраны. 2002. Т. 19. С. 507.

16. Sharov V.S., Dremina E.S., Vladimirov Iu. A. // Biofizika. 1995. Vol. 40. P. 428.
17. Van de Voort F.R. // J. Am. Oil. Chem. Soc. 1998. Vol. 71. P. 921.

Поступила в редакцию 23.04.15

QUANTITATION OF LIPID HYDROPEROXIDES BY ENHANCED CHEMILUMINESCENCE

P.O. Volkova, A.V. Alekseev, A.A. Dzhatdоеva, E.V. Proskurnina, Yu.A. Vladimirov

(M.V.Lomonosov Moscow State University, Faculty of Basic Medicine;
e-mail: proskurnina@gmail.com)

For the determination of lipid hydroperoxides, an analytical procedure was proposed based on enhanced chemiluminescence. The analytical system consists of a lipid, Fe(II), and coumarin C-525 as an enhancer of chemiluminescence. The lipid hydroperoxides were determined with spiked solutions using *tert*-butyl hydroperoxide as an internal standard. The analytical procedure provides a detection limit as low as 164 nM. The accuracy verification was performed with iodometric titration. The assay was used for the determination of total lipid hydroperoxides in food.

Key words: lipid hydroperoxides, lipid peroxidation, enhanced chemiluminescence, coumarin C-525.

Сведения об авторах: Волкова Полина Олеговна – студентка химического факультета; Алексеев Андрей Владимирович – науч. сотр. Всероссийского научно-исследовательского института авиационных материалов (kvark-87@mail.ru); Джатдоева Айшат Абдрахмановна – аспирант кафедры медицинской биофизики факультета фундаментальной медицины (ayshatdj@gmail.com); Проскурнина Елена Васильевна – доцент кафедры медицинской биофизики факультета фундаментальной медицины, канд. хим. наук (proskurnina@gmail.com); Владимиров Юрий Андреевич – зав. кафедрой медицинской биофизики факультета фундаментальной медицины, профессор, акад. РАН (yuvlad@mail.ru).