



УДК 547.565:613.2:641

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММАРНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ И АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

© 2002 г. Ю. В. Гелетий*, Ж. Ж. А. Балавуэн**, О. Н. Ефимов*, В. С. Куликова**

* Институт проблем химической физики РАН, 142432, Черноголовка, Россия;

** Лаборатория координационной химии ЦНРС, Нарбонн, Тулуза, Франция

Поступила в редакцию 07.08.2001 г. Принята к печати 24.12.2001 г.

Разработан новый метод анализа активных антиоксидантов, основанный на реакции восстановления ими катион-радикалов $ABTS^{+\cdot}$, полученных окислением диаммониевой соли 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) ($ABTS$). Возможности его применения были подтверждены электрохимическими и кинетическими исследованиями модельных антиоксидантов.

Показано, что $ABTS^{+\cdot}$ быстро реагирует с активными и медленно – с неактивными антиоксидантами и поэтому может быть использован в качестве модельного радикала при количественном определении общего содержания сложной смеси антиоксидантов (антиокислительный эквивалент) в природных экстрактах и винах. Относительную антиокислительную активность антиоксидантов измеряли с помощью другого аналитического метода, основанного на конкурентном окислении красителя пирогаллолового красного (детекторная молекула) и исследуемого антиоксиданта радикалами, генерируемыми при распаде пероксинитрита. Сочетанием обоих методов были измерены средние значения удельной активности антиоксидантов (в расчете на одну молекулу активного вещества) в экстрактах из винограда, оливок, томатов, в различных широко употребляемых напитках (вино, пиво, соки), а также в пищевом концентрате $Kr\acute{e}to-A^{\circledR}$, изготовленном из экстрактов винограда, красного вина, томатов и оливок и отличающимся высоким содержанием активных антиоксидантов. Показано, что красное вино и красный виноградный сок характеризуются наибольшей концентрацией активных антиоксидантов (до 20 мМ) и их активность близка к активности полифенолов.

Ключевые слова: $ABTS^{+\cdot}$; антиоксидант; аскорбиновая кислота; вино; пероксинитрит; полифенолы.

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания, в особенности заболевания коронарных артерий и инсульт, являются одной из главных причин преждевременной смерти и нетрудоспособности в экономически развитых странах. Основная патология большинства серьезных сердечно-сосудистых заболеваний – атеросклероз. Причины его возникновения окончательно не выяснены, но считается, что одна из них – это перекисное окисление липидов сосудистого эндотелия свободными радикалами (см. [1, 2]

и приведенные там ссылки). Весьма вероятно, что свободные радикалы участвуют также в патогенезе многих других заболеваний.

Свободный радикал NO (монооксид азота) играет важную роль во многих физиологических процессах. В частности, он расширяет сосуды, переносит сигналы в центральной и периферической нервной системах и участвует в цитотоксической и цитостатической реакциях иммунной системы [3–5]. Выяснено, что клетки почти всех изученных до сих пор типов способны синтезировать NO с помощью трех различных NO -синтаз. Считается, что избыточный и нерегулируемый (патофизиологический) синтез NO может вызывать у людей множество болезней, приводящих к смерти или нетрудоспособности [6]. Токсичность NO , по-видимому, во многом обусловлена образованием высокотоксичного пероксинитрита $ONOO^-$ (рК 6.8), который образуется в результате быстрой рекомбинации NO и супероксидного анион-радикала $O_2^{\cdot-}$ [7–11]. При физиологических значениях рН примерно половина пероксинитрита находится в

Сокращения: $ABTS$ – диаммониевая соль 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты); $ABTS^{+\cdot}$ – анион-радикал, генерируемый окислением $ABTS$; OPC – концентрат олигопроцианидинов (OligoProCyanidins, олигомеры катехина и эпикатехина); PR – пирогаллоловый красный (пирогаллолсульфонфталеин); SAA – средняя удельная активность антиоксидантов (Specific Antioxidant Activity); TAE – антиокислительные эквиваленты Тролокса (Trolox Antioxidant Equivalents) (см. также “Эксперимент. часть”); $ЦВА$ – циклические вольтамперограммы.

Автор для переписки (тел.: (252) 2-32-22; эл. почта: kulver@icp.ac.ru).

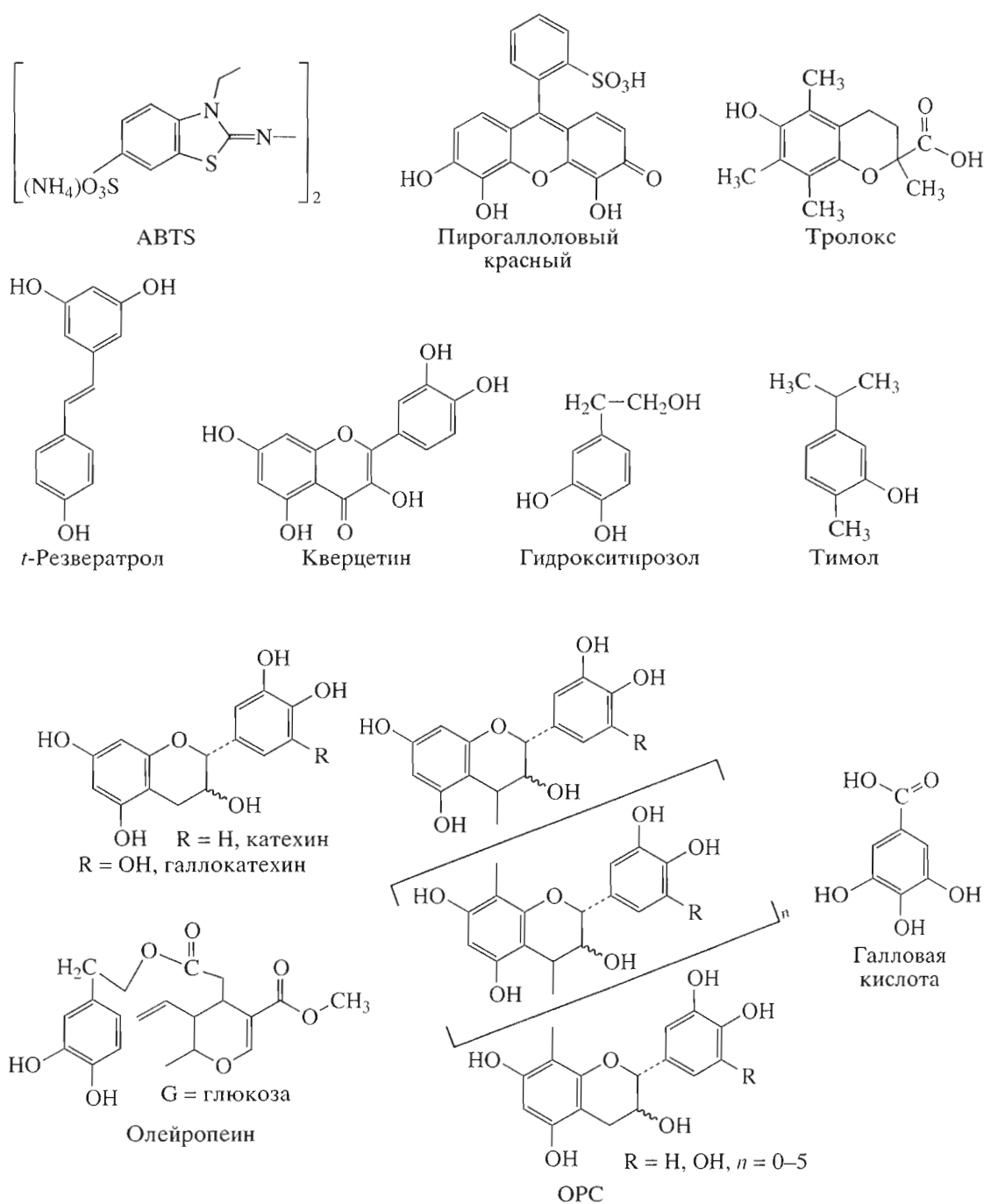


Рис. 1. Структуры используемых соединений.

протонированной форме в виде пероксиазотистой кислоты HOONO . В мономолекулярной реакции последняя довольно быстро (время полупревращения $\sim 1\text{--}2$ с) изомеризуется в нитрат; однако параллельно она распадается на свободные радикалы с выходом около 30% [7–12]. В организме пероксиазотистая кислота и анион пероксинитрита могут реагировать со многими соединениями по бимолекулярному механизму (см. [8–11] и приве-

денные там ссылки). Высказывались различные мнения по поводу механизмов реакций пероксинитрита, природы образующихся свободных радикалов и участия в этих процессах двуокиси углерода [12–15], но однозначно установлено, что сам пероксинитрит и некоторые продукты его распада – это сильные окислители, обладающие цитотоксическими свойствами [9–11]. Например, известно, что пероксинитрит инициирует окисление липи-

дов, окисляет тиолы, приводит к нитрованию фенолов и т.д. (см. [7–12] и приведенные там ссылки).

Клетки защищаются от повреждений, вызываемых окислителями, с помощью ряда механизмов [1–2]. Такие ферменты, как супероксиддисмутаза и каталаза, каталитически обезвреживают реакционные кислородсодержащие свободные радикалы. Некоторые белки (например, трансферрин, церулоплазмин и альбумин) образуют комплексы с ионами переходных металлов и тем самым уменьшают каталитическую активность этих ионов в реакциях образования свободных радикалов. Присутствие в клетках антиоксидантов обеспечивает еще один очень важный защитный механизм: антиоксиданты быстро реагируют со свободными радикалами и, жертвуя собой, предохраняют более важные элементы клетки от повреждений. Основными антиоксидантами являются витамины С и Е, а также полифенолы, например флавоноиды, которые поступают в организм с пищей.

Основные источники антиоксидантов в пище – фрукты, овощи, чай и вино. Интерес к пищевому и лечебному эффектам красного вина особенно усилился после опубликования работы Рено [16], который обнаружил, что жителей Тулузы (Франция) отличает очень низкий уровень сердечно-сосудистых заболеваний. Было замечено, что основным отличием в образе жизни французов является потребление ими алкоголя в виде красного вина. К настоящему времени накоплено большое число фактов, подтверждающих пищевую ценность и лечебные эффекты красного вина [17–19], хотя некоторые публикации по эпидемиологии гораздо менее оптимистичны [20]. Красное вино содержит более 200 известных производных фенолов, таких, как флавоноиды, танины и т.д. [19]. Антиокислительные свойства полифенолов, содержащихся в красном вине, хорошо доказаны *in vitro* разными методами (см. [17–19, 21] и приведенные там ссылки).

Эпидемиологические исследования показывают, что высокий уровень потребления антиоксидантов действительно может приводить к уменьшению числа сердечно-сосудистых заболеваний [22]. Однако в настоящее время даже в экономически развитых странах только малая часть населения (например, около 9% американцев [23]) потребляет ежедневно достаточно овощей и фруктов для поддержания необходимого антиокислительного статуса организма. Пищевые добавки с высоким содержанием антиоксидантов могли бы помочь в поддержании такого статуса и снизить число сердечно-сосудистых заболеваний или даже предотвратить некоторые из них. Например, французская компания “Pierre Fabre Sante” запатентовала [24] и выпускает в продажу концентрат антиоксидантов, включающий экстракты из винограда, красного вина, оливок, помидоров и др.,

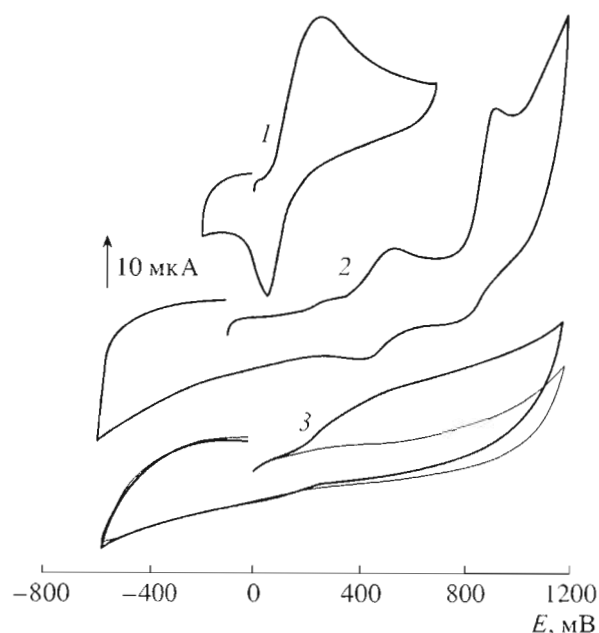


Рис. 2. ЦВА для Тролокса (1), ABTS (2) и красного вина (Madiran) (3) в 35 мМ фосфатном буфере, pH 7; скорость развертки 0.1 В/с; [ABTS] 0.65 мМ; [Тролокс] 1 мМ; [вино] 1.35 мМ ТАЕ (1 мл в 15 мл буфера). Под кривой (3) тонкой линией обозначена ЦВА для фосфатного буфера (без добавления вина).

под названием Kréto-A® (его название основано на игре слов: по-французски оно звучит как “критский”; жители острова Крит, как и французы, меньше страдают от сердечно-сосудистых заболеваний, чем представители других народов). Ингредиенты Kréto-A® типичны для средиземноморской, особенно критской, кухни.

Цель данного исследования состояла в разработке простого способа определения суммарной концентрации антиоксидантов в экстрактах из пищевых продуктов и в оценке их антиокислительных свойств. В качестве примеров изучены экстракты из винограда, вина, томатов и оливок и проведено их сравнение с рядом известных антиоксидантов, в частности с индивидуальными полифенолами (см. рис. 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Электрохимическое поведение ABTS и антиоксидантов

Примеры циклических вольтамперограмм (ЦВА) показаны на рис. 2. Величины потенциалов первого пика окисления исследуемых соединений представлены в табл. 1. В случае ABTS первый редокс-пик соответствует одноэлектронному квазиобратимому окислению до $ABTS^{+\cdot}$, $E = (E_a + E_c)/2 = 460$ мВ, $(E_a - E_c) = 90$ –100 мВ, $I_p/I_a = 0.9$ –1, тогда как вторая волна соответствует необратимому

Таблица 1. Потенциалы анодных (E_a) и катодных (E_c) пиков для АВТС и антиоксидантов (относительно насыщенного каломельного электрода) в 35 мМ фосфатном буфере при рН 7 (скорость развертки 0.1 В/с, стеклоуглеродный электрод)

Соединение	E_a , мВ	E_c , мВ	I_c/I_a^a	E_o , мВ
Аскорбиновая кислота	160 (125 ^b)	Нет	0	56 [28], 36 [29]
Тролокс	240	55	0.8	224 [28], 236 [29]
Пирогаллоловый красный	240	Нет	0	–
Галловая кислота	340	Нет	0	316 ^c [30]
3,4-Дигидроксибензойная кислота	490	–45	0.85	356 [31]
АВТС	513	417	0.95	465 ^d , 376–746 ^e [32]
Тимол	600	Нет	0	–
4-Гидроксифенилуксусная кислота	790	Нет	0	>650 ^f [28]

^a I_a, I_c – величины амплитуд соответственно анодного и катодного пиков.

^b При скорости развертки 0.05 В/с.

^c Для метилгаллата.

^d $(E_a + E_c)/2$.

^e Для различных фенотиозинов.

^f Для фенола.

двухэлектронному окислению (рис. 2, кривая 2). Тролокс, имеющий несколько электронодонорных заместителей, легко окисляется при 240 мВ, причем наблюдается катодный отклик при обратной развертке (рис. 2, кривая 1). Однако большая разница между пиками ($E_a - E_c = 185$ мВ) и низкое значение I_c/I_a (0.8) указывают на необратимое окисление. Тем не менее наблюдаемый потенциал пика окисления $E_a = 240$ мВ совпадает с опубликованным значением одноэлектронного редокс-потенциала $E_o = 224$ –236 мВ при рН 7 [28, 29]. Аскорбиновая кислота также окисляется необратимо, но известное значение одноэлектронного редокс-потенциала $E_o = 38$ –56 мВ [29] выше, чем наблюдаемый потенциал анодного пика (табл. 1), причем последний зависит от скорости развертки. Такие полифенолы, как галловая кислота, РР и 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота, необратимо окисляются при меньших, чем для АВТС, значениях анодных потенциалов, тогда как тимол и 4-гидроксифенилуксусная кислота окисляются при более высоких потенциалах (табл. 1).

На кривой 3 рис. 2 представлена ЦВА для красного вина Madigan. Вместо одного пика окисления наблюдается постепенное, но значительное увеличение тока при анодных потенциалах выше 250 мВ. Форма ЦВА типична для сложной смеси нескольких соединений с близкими значениями редокс-потенциалов. Таким образом, соединения, содержащиеся в красном вине, имеют редокс-свойства, аналогичные свойствам полифенолов.

В большинстве изученных случаев анодное окисление – необратимый процесс. Следовательно, полученные величины потенциалов анодных

пиков могут быть выше значений стандартных (термодинамических) редокс-потенциалов. Тем не менее величины анодных потенциалов исследованных нами антиоксидантов хорошо коррелируют как со способностью этих соединений восстанавливать АВТС^{•+}, так и с их антиокислительной активностью (см. ниже). АВТС^{•+} является умеренно сильным одноэлектронным окислителем, анодный потенциал которого намного выше, чем у активных антиоксидантов, и лишь немного ниже, чем потенциал такого слабого антиоксиданта, как тимол. Поэтому АВТС^{•+} очень быстро реагирует с активными антиоксидантами, окисляющимися при более низких анодных потенциалах, что позволяет использовать его в качестве селективного реагента при титровании различных полифенолов, присутствующих в природных экстрактах.

Реакции антиоксидантов с АВТС^{•+}

Обычно свободные активные радикалы необратимо реагируют с антиоксидантами (А), отрывая от них атом водорода. Образующийся из антиоксиданта радикал перехватывает еще один свободный радикал, завершая таким образом весь процесс. АВТС^{•+} не является акцептором атома водорода и, следовательно, скорее всего, реагирует с антиоксидантами по механизму переноса электрона:



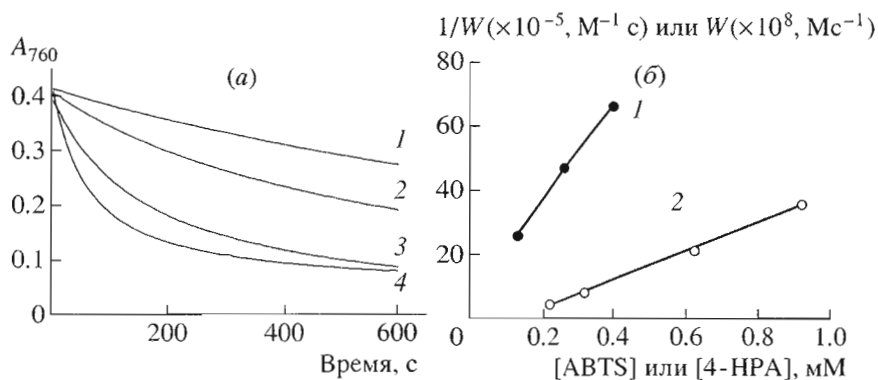


Рис. 3. Взаимодействие $ABTS^{+\cdot}$ с 4-гидроксифенилуксусной кислотой (4-НРА).

а. Кинетика реакции $ABTS^{+\cdot}$ с 4-гидроксифенилуксусной кислотой (с 4-НРА) при исходных концентрациях $ABTS$ 0.22, 0.32, 0.62, 0.92 мМ (1)–(4) соответственно. $[4-НРА]$ 0.26 мМ.

б. Зависимость W от $[4-НРА]$ – (1) и $1/W$ от $[ABTS]$ – (2); (1) $[ABTS]$ 0.62 мМ; (2) $[4-НРА]$ 0.26 мМ; pH 7, 25°C.

k_1 и k_{-1} – константы скоростей прямой и обратной реакций.

За первой обратимой стадией переноса электрона должна следовать необратимая реакция радикала $A^{+\cdot}$, приводящая к его исчезновению:



k_2 – константа скорости реакции.

Для многих антиоксидантов радикал $A^{+\cdot}$ может находиться в быстром равновесии со своей депротонированной формой. Ниже для простоты обе эти формы будут обозначаться как $A^{+\cdot}$.

Согласно этой простейшей схеме (реакции (1) и (2)), скорость убыли $ABTS^{+\cdot}$ выражается следующим уравнением (3):

$$W = k_1 k_2 [ABTS^{+\cdot}] [A] / (k_{-1} [ABTS] + k_2). \quad (3)$$

Поскольку величины k_1 и k_{-1} зависят от разности редокс-потенциалов между $ABTS^{+\cdot}$ и антиоксидантом, суммарная скорость реакции будет определяться редокс-потенциалами реагентов. Кроме редокс-потенциалов, суммарную скорость также определяет концентрация $ABTS$ и скорость (k_2) последующих реакций образовавшегося $A^{+\cdot}$.

В соответствии с уравнением (3) кинетика восстановления $ABTS^{+\cdot}$ избытком 4-гидроксифенилуксусной кислоты не является экспоненциальной (рис. 3а). Скорость реакции падает заметно быстрее, чем следовало бы ожидать из экспоненциальной зависимости. При этом очевидно, что реакция ингибируется образовавшимся $ABTS$, так как начальная скорость падает, если в систему прибавить $ABTS$. Зависимости $1/W$ от $[ABTS]$ и W от $[A]$ (рис. 3б) представляют собой прямые ли-

нии в соответствии с уравнением (3). Таким образом, концентрация $ABTS$ значительно влияет на скорость восстановления $ABTS^{+\cdot}$ антиоксидантом. Это влияние особенно важно для антиоксидантов с высоким редокс-потенциалом, когда равновесие (1) сдвигается влево, как в случае с 4-гидроксифенилуксусной кислотой.

Уравнение (3) предсказывает, что реакция (2), которая следует за переносом электрона, также сильно влияет на суммарную скорость восстановления $ABTS^{+\cdot}$. Рекомбинация и/или диспропорционирование двух радикалов $A^{+\cdot}$ являются бимолекулярными реакциями. Поэтому для антиоксидантов с высоким редокс-потенциалом они крайне мало вероятны из-за чрезвычайно низкой стационарной концентрации $A^{+\cdot}$ (если равновесие в реакции (1) сильно сдвинуто влево). Возможно, что в действительности последующие реакции радикала $A^{+\cdot}$ происходят посредством его превращения в другой радикал. Например, в случае фенолов $A^{+\cdot}$ может сначала присоединиться к антиоксиданту с образованием другого радикала, имеющего более сильные восстановительные свойства и способного быстро реагировать с другой молекулой $ABTS^{+\cdot}$. Поскольку в наших экспериментальных условиях концентрация антиоксиданта, как правило, очень мала, то суммарная скорость восстановления $ABTS^{+\cdot}$ слабыми антиоксидантами всегда оказывается очень низкой. Кроме того, эта реакция сильно ингибируется образующимся $ABTS$. Все эти результаты хорошо соответствуют литературным данным. Например, кинетика реакции $ABTS^{+\cdot}$ с фенолами при избытке $ABTS^{+\cdot}$ [37] подчиняется

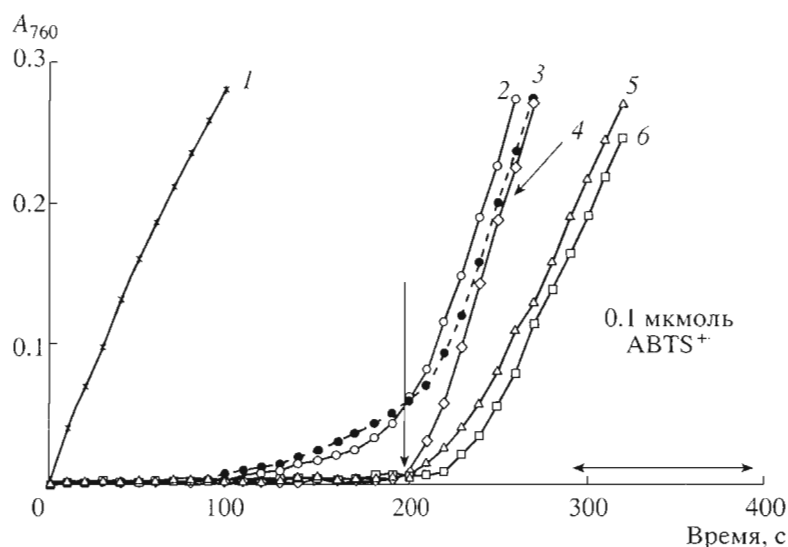


Рис. 4. Накопление $ABTS^{+\cdot}$ в ходе титрования различных антиоксидантов.

Условия: каждые 10 с прибавляли 15 мкл $ABTS^{+\cdot}$; конечная точка титрования для Тролокса помечена вертикальной стрелкой; pH 7.0, 25°C, $V_0 = 2.3$ мл. 1(★) — 4-гидроксифенилуксусная кислота, 0.13 мкМ; 2(○) и 3(●) — тимол, 0.085 мкМ, для 2 — каждые 20 с прибавляли $ABTS^{+\cdot}$, шкала времени сжата в 2 раза; 4(◇) — Тролокс, 0.1 мкМ; 5(△) — экстракт красного виноградного сока, 2.5 мг; 6(□) — красное вино (Madiran), 6 мкл.

уравнению $W = k[ABTS^{+\cdot}]^2[PhOH]/[ABTS]$. Эти результаты также объяснены на основе механизма, аналогичного реакциям (1) и (2).

Реакция $ABTS^{+\cdot}$ с активными антиоксидантами, такими, как Тролокс, аскорбиновая и мочевая кислоты, протекает значительно быстрее, чем со слабыми антиоксидантами [36, 37]. Для аскорбиновой кислоты скорость реакции уже слабо зависит от $[ABTS]$ (3×10^7 и 8×10^6 $M^{-1} s^{-1}$ соответственно при 1 и 10 мМ $ABTS$ и pH 7) [27]. В отличие от простых фенолов, одноэлектронное окисление аскорбиновой кислоты и полифенолов дает промежуточные радикалы $A^{+\cdot}$ (дегидроаскорбатный и семихиноновый радикалы), которые сами также являются очень сильными восстановителями [29]. В этом случае вместо медленной реакции (2) образующийся $A^{+\cdot}$ сам быстро восстанавливает вторую молекулу $ABTS^{+\cdot}$. Следовательно, если $k_1[ABTS] \ll k_2$, суммарная скорость реакции становится $W = k_1[ABTS^{+\cdot}][A]$, т.е. она вообще не зависит от $[ABTS]$. Полное отсутствие зависимости или слабая зависимость от $[ABTS]$ позволяют реакции легко протекать до полного завершения. Таким образом, низкий редокс-потенциал антиоксиданта сдвигает равновесие (1) вправо, тогда как образование сильного промежуточного восстановителя $A^{+\cdot}$ способствует завершению реакции.

В то же время реакции со слабыми антиоксидантами (они имеют более высокие редокс-потенциалы и образуют устойчивые промежуточные соединения $A^{+\cdot}$) протекают намного медленнее и в значительной степени тормозятся образующимся $ABTS$. В итоге $ABTS^{+\cdot}$ оказывается очень селективным окислителем по отношению к антиоксидантам, он реагирует исключительно с активными антиоксидантами в присутствии слабых или неактивных. Представленные ниже данные по титрованию антиоксидантов подтверждают этот вывод. Аналогичный подход был использован для оценки антиоксидантного статуса в образцах сыворотки крови [36].

4-Гидроксифенилуксусная кислота является типичным слабым антиоксидантом, не восстанавливающим $ABTS^{+\cdot}$ при низких концентрациях (рис. 4, кривая 1), тогда как аскорбиновая кислота, Тролокс (рис. 4, кривая 4) и мочевая кислота дают четкую конечную точку титрования радикалом $ABTS^{+\cdot}$. Стехиометрия реакции соответствует расходу двух радикалов $ABTS^{+\cdot}$ на одну молекулу этих соединений (табл. 2). Та же стехиометрия была получена в работах [33, 34], тогда как в работе [37] сообщалось, что стехиометрические факторы равны 1.0. Однако наша собственная обработка данных, представленных в работе [37] (см. рис. 1 в работе [37]) с использованием для

Таблица 2. Стехиометрия реакции $ABTS^{+\cdot}$ с различными антиоксидантами, их ТАЕ и антиоксидантные активности, измеренные относительно Тролокса (АА), а также пересчитанные на единицу ТАЕ (SAA) (условия: 35 мМ фосфатный буфер, рН 7, комнатная температура)

Соединение	Стехиометрия	ТАЕ*	АА**	SAA***
Тролокс	2 ± 0.15	1	1.0	1.0
Аскорбиновая кислота	2 ± 0.15	1	См. текст	
Мочевая кислота	2 ± 0.2	1	0.03	0.03
4-Гидроксифенилуксусная кислота	нр ^a		0.0034	–
Тролокс + 4-гидроксифенилуксусная кислота	2 ± 0.15	1	–	
Тимол	1.7 ± 0.2	0.85	0.2	0.2
3,4-Дигидроксibenзойная кислота	2.1 ± 0.2	1	0.022	0.022
Галловая кислота	4 ± 0.2	2	7.7	3.8
Кофейная кислота	4.2 ± 0.2	2.1	0.35	0.17
Тролокс + 3,4-дигидроксibenзойная кислота	2 ± 0.15^b	1	–	
Флороглюцин	1.7 ± 0.2	0.85	1.5	1.5
Резвератрол	4 ± 0.3	2	<0.01	–
Кверцетин	4.8 ± 0.7	2.4	11	4.6
Рутин	3.1 ± 0.3	1.6	но ^d	–
Катехин	6.3 ± 0.5	3.15	0.7	0.22
Нарингенин ^e	нр ^a		<0.01	–
Морин	2.2 ± 0.2	1.1	но ^d	
	4 ± 0.3^c	2		
L-Глутатион	1.0 ± 0.1	0.5	9.4	19
L-Цистеин	1.1 ± 0.1	0.5	но ^d	

* Определение ТАЕ см. в “Эксперимент. части”.

** Антиоксидантная активность относительно Тролокса, измеренная с использованием PR [26] (см. “Эксперимент. часть”).

*** Удельная антиоксидантная активность $SAA = AA/ТАЕ$.

^a Реакции нет.

^b По отношению к общему количеству обоих соединений.

^c Короткое время реакции. При увеличении времени стехиометрия достигает 4 ± 0.3 .

^d Не определяли.

^e Нарингенин – 1,4',5,7-тригидроксифлаванон.

$ABTS^{+\cdot}$ величины $\epsilon_{734} = 1.45 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, дает стехиометрию реакции 2.2.

3,4-Дигидроксibenзойная кислота – это водорастворимый пирокатехин, который также быстро взаимодействует с $ABTS^{+\cdot}$ со стехиометрией равной 2.0; при этом вероятнее всего образуется хинон. В смеси Тролокса и 4-гидроксифенилуксусной кислоты в соотношении 1 : (2–5) только Тролокс восстанавливает $ABTS^{+\cdot}$ со стехиометрией равной 2.0. Смесь Тролокса и 3,4-дигидроксibenзойной кислоты реагирует со стехиометрией $[ABTS^{+\cdot}]/([Тролокс] + [3,4-дигидроксibenзойная кислота]) = 2.0$. Таким образом, активные антиоксиданты легко титруются в присутствии избытка слабых антиоксидантов.

Тимол, имеющий немного более высокий редокс-потенциал, чем $ABTS^{+\cdot}$, реагирует с $ABTS^{+\cdot}$ медленнее, чем Тролокс. После прибавления ~1 экв. $ABTS^{+\cdot}$ на молекулу тимола появляется неустойчивое зелено-голубое окрашивание (рис. 4, кривая 2), которое затем вновь исчезает, что несколько затрудняет определение конечной точки титрования. Поэтому в таких случаях за конечную точку титрования было принято достижение оптического поглощения 0.02–0.03 при 760 нм с двадцатисекундным интервалом после очередного добавления $ABTS^{+\cdot}$. Стехиометрия для тимола равна 1.7 ± 0.2 , тогда как увеличение временного интервала до 60 с дает величину равную 2 ± 0.2 . Аналогично тимолу ведет себя флороглюцин (1,3,5-тригидроксибензол) (табл. 2). В таких случаях визуальное определение конечной точки ти-

трования до некоторой степени осложняется и приводит к погрешностям, а содержание слабых антиоксидантов, определяемое в натуральных экстрактах, может быть занижено.

Молекулы галловой кислоты, резвератрола и флавоноидов содержат более двух гидроксильных групп. Первичные продукты их окисления также имеют антиокислительные свойства и могут окисляться глубже; следовательно, они являются более чем двухэлектронными восстановителями. В результате для таких антиоксидантов стехиометрия их реакции с $ABTS^{+\cdot}$ может иметь значение 3–6 в зависимости от их структуры. Если антиокислительная активность промежуточных продуктов слаба, то конечная точка титрования выражена слабее, как и в случае тимола. Примером может служить морин (аналог кверцетина – 2',3,4',5,7-пентагидроксифлавонол): при его реакции с $ABTS^{+\cdot}$ в течение 10–20 с стехиометрия равна 2.2 ± 0.2 , а увеличение времени реакции до 30–40 с приводит к стехиометрии 4 ± 0.3 (табл. 2). Кверцетин восстанавливает даже большее число эквивалентов $ABTS^{+\cdot}$ (стехиометрия 4.8 ± 0.7), но в этом случае конечная точка титрования определяется с большей погрешностью. При окислении резвератрола, катехина и морина катион-радикалом $ABTS^{+\cdot}$ появляется слабое розовое окрашивание, которое заметно не влияет на определение конечной точки титрования. Несмотря на некоторые сложности с флавоноидами, для большинства изученных природных экстрактов наблюдалась достаточно ясно выраженная конечная точка титрования (рис. 4, кривые 5 и 6). Многие исследованные образцы (например, красное вино) сами ярко окрашены, но, поскольку для анализа используются очень низкие их концентрации, трудностей и в этих случаях не возникало.

Тиолаты имеют относительно высокие редокс-потенциалы (E_0 0.5–1.05 В) [39], следовательно, равновесие (1) сильно сдвинуто влево. Но в то же время образующиеся тиольные радикалы RS^{\cdot} либо быстро взаимодействуют с $ABTS$ (например, для цистеина константа скорости этой реакции $k = 5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [38]), либо в присутствии свободных тиолатных анионов RS^- они находятся в равновесии с анион-радикалом $RSSR^{\cdot-}$. Последний, являясь очень сильным восстановителем, быстро восстанавливает и вторую молекулу $ABTS^{+\cdot}$ с образованием дисульфида. Поэтому суммарная реакция $ABTS^{+\cdot}$ с *L*-цистеином или *L*-глутатионом протекает очень быстро и со стехиометрией 1 : 1 (табл. 2). Таким образом, тиолы также титруются $ABTS^{+\cdot}$. Высокая концентрация тиолов в сыво-

ротке крови вносит значительный вклад в ее общий антиокислительный статус, определенный с помощью $ABTS^{+\cdot}$ [36].

Метод титрования, описанный в данной работе, во многом напоминает метод Райс-Эванс и сотр. [33–36], где $ABTS^{+\cdot}$ также используется в качестве модельного радикала. На основе метода Райс-Эванс фирма Randox (Великобритания) разработала и продает набор реактивов для определения полного антиокислительного статуса (TAS – Total Antioxidant Status) плазмы крови и сложных смесей природных антиоксидантов. В то же время метод Райс-Эванс имеет и существенные отличия. Мы всегда используем небольшой избыток антиоксидантов по отношению к $ABTS^{+\cdot}$ (а не наоборот) и меньшее время реакции $ABTS^{+\cdot}$ с исследуемыми антиоксидантами. Например, согласно данным [33–35], $ABTS^{+\cdot}$ должен реагировать с антиоксидантом в течение 1.5 мин при 30°C, тогда как наше время реакции – не более 10–20 с при ~25°C. Следовательно, в наших экспериментальных условиях $ABTS^{+\cdot}$ успевает реагировать только с активными антиоксидантами, а в условиях Райс-Эванс [33–35] слабые антиоксиданты вносят некоторый вклад в измеряемую величину суммарной концентрации антиоксидантов. Поэтому в данной работе мы и используем понятие TAE (см. “Эксперимент. часть”), которое отличается от понятия TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), используемого в работах [33–35]. Отметим, что TAE – не концентрация, а общее число радикалов, которые может захватить одна молекула данного соединения, и оно выражается в эквивалентах Тролокса, который сам нейтрализует два радикала. Аскорбиновая и мочевая кислоты и пирокатехины (3,4-дигидробензойная кислота), способные перехватить два свободных радикала, имеют TAE = 1.0. Рутин, кофейная кислота, кверцетин и катехин – это более чем двухэлектронные восстановители, и значения TAE для них равны соответственно 1.5, 2.1, 2.4 и 3.1 (см. табл. 2). Для природных экстрактов с высоким содержанием полифенолов весьма вероятно, что TAE будет выше суммарной концентрации всех индивидуальных антиоксидантов.

Данные, полученные при определении TAE различных природных экстрактов, представлены в табл. 3. Известно, что зеленый чай чрезвычайно богат сильными антиоксидантами, преимущественно производными пирокатехина [40]. Величина TAE исследованного нами образца равнялась 7.5 ммоль/г (см. также [26]). Из других популярных напитков, как и ожидалось, красные вина оказались наиболее богаты антиоксидантами. Величины TAE для них равнялись 7.8–19 мМ (в среднем 14 мМ). Со-

Таблица 3. Полные концентрации антиоксидантов в природных экстрактах и винах, измеренные с использованием ABTS⁺ и выраженные в единицах ТАЕ, а также их активность относительно Тролокса (условия: 35 мМ фосфатный буфер, рН 7, комнатная температура)

Образец	Концентрация антиоксидантов (ТАЕ)		Удельная активность (SAA)
	ммоль/г ^а	мМ	
Вино			
Красное Bordeaux (Haut Medoc, 1994)	0.014	14	2.3 ± 0.2
Красное Carignan (1994)	0.015	15	1.6 ± 0.15
Красное Madiran (1996)	0.019	19	2.0 ± 0.2
Красное Beaujolais Village (1997)	0.0078	7.8	но ^б
Розовое, Côte de Provence (1996)	0.0025	2.5	но
Белое, Chardonnay (1996)	0.0016	1.6	но
Пиво			
Heineken (светлое)	0.0012	1.2	но
Löwenbräu (темное)	0.0016	1.6	но
Экстракт зеленого чая	7.5		1.8 ± 0.2
Концентрат из:			
красного вина	0.31		1.4 ± 0.15
после 3 мес. хранения	0.27		1.4 ± 0.15
после 6 мес. хранения	0.23		1.4 ± 0.15
Виноградный сок (96/97 года)	0.072		1.7 ± 0.2
Виноградный сок (97/98 года)	0.042		1.75 ± 0.2
Экстракт из виноградных косточек (ОРС)	4.4		1.3 ± 0.15
Экстракт из оливок (сухой)	0.12		0.65 ± 0.1
Экстракт из оливок (30%, в H ₂ O)	0.09–0.17		0.8 ± 0.1
Экстракт из помидоров	0.017		1.5 ± 0.15
Kreto-A [®]			
концентрат	0.066	80	1.7 ± 0.2
торговый продукт	0.062 (0.025)	63	1.8 ± 0.2
после 3 мес. хранения	0.048 (0.014)	47	1.75 ± 0.2
после 6 мес. хранения	0.035 (0.005)	105	1.8 ± 0.2
содержащий экстракт из виноградных косточек	0.080 (0.025)		1.4 ± 0.2

^а В скобках дан вклад аскорбиновой кислоты.

^б Не определяли.

держание антиоксидантов в розовых и, особенно, белых винах, а также в пиве было меньше, и их ТАЕ были значительно ниже. Наши данные очень хорошо согласуются со значениями, полученными другими методами [17, 41–43], например, для красного Bordeaux приводились значения 11.4 [41], 17.0 [42], 7.5–28.6 мМ (в зависимости от типа вина и его возраста) [43]; средняя величина была 20 мМ [44].

Как отмечено выше, винный концентрат (предоставленный Institut de Recherche Pierre Fabre) был получен 40-кратным концентрированием красного вина с удалением из него алкоголя и винной кислоты, но сохранением всех антиоксидантов. ТАЕ

таких концентратов соответствует значению ТАЕ исходных красных вин с учетом концентрирования (табл. 3). Интересно, что при хранении этих концентратов в течение более 9 месяцев при комнатной температуре в запаянных пробирках концентрация антиоксидантов в них несколько падала и ТАЕ уменьшался от 0.31 до 0.23 ммоль/г. Это, с одной стороны, свидетельствовало о довольно высокой стабильности экстрактов, но одновременно указывало на вероятность реакции этерификации фенольных групп, приводящей к снижению содержания свободных фенолов. Исследованные образцы концентрированного в 4–5 раз красного виноградного сока имели значения ТАЕ,

близкие к значениям для красных вин. Эти величины несколько менялись в зависимости от года сбора урожая, сорта винограда и технологии производства.

Такие потенциальные источники полифенолов, как водорастворимые экстракты из оливок, имели различное содержание антиоксидантов, которое главным образом зависело от технологии их получения. Их ТАЕ находился в пределах 0.09–0.17 ммоль/г. Большинство водорастворимых полифенолов в экстрактах оливок – производные тирозола (4-гидроксифенилэтанола) и гидрокситирозола (3,4-дигидроксифенилэтанола). Например, концентрация такого гликозида, как олеuropeин (см. рис. 1) в сухих экстрактах достигает 100 мг/г [45], а исследованный нами образец содержал 19 мг/г олеuropeина и 3 мг/г кофейной кислоты (данные Institut de Recherche Pierre Fabre), а также немного других дигидроксифенолов, что хорошо согласуется с полученным нами для него значением ТАЕ (0.12 ммоль/г). Концентрат из помидоров (смесь природных каротиноидов) также имел достаточно высокое значение ТАЕ (0.017 ммоль/г). Однако реакции $ABTS^{+}$ с индивидуальными каротинами не изучены, поэтому интерпретация данных затруднена.

Далее мы исследовали смеси различных концентратов, например, смесь из 7 частей концентрата виноградного сока, 1 части винного концентрата и 0.01 части экстракта оливок (30%, ТАЕ 0.17 ммоль/г). Эта смесь использовалась в промышленном производстве $Kr\acute{e}to-A^{\circledR}$. Величина ТАЕ для нее равнялась 0.066 ммоль/г, что точно соответствует теоретическому значению 0.066 ммоль/г, рассчитанному исходя из величин для индивидуальных веществ. Одна доза продажного образца $Kr\acute{e}to-A^{\circledR}$ (15 г или 11.5 мл) содержит 8 г этой смеси, 2 г томатного экстракта, 0.08 г аскорбата натрия, 0.02 г витамина Е, а также ароматические и другие вкусовые добавки. Эти добавки, а также витамин Е (в виде ацетата токоферола) не взаимодействуют с $ABTS^{+}$. Измеренное значение ТАЕ для $Kr\acute{e}to-A^{\circledR}$ составляло 0.062 ммоль/г (включая 0.025 ммоль/г аскорбиновой кислоты, ее определение см. ниже), что вновь согласуется с расчетной величиной. Интересно, что величина ТАЕ для $Kr\acute{e}to-A^{\circledR}$ медленно уменьшается при комнатной температуре даже при хранении без доступа кислорода. Детальное исследование показало, что аскорбиновая кислота при этом исчезает значительно быстрее, чем полифенолы (количество которых определялось как разность между ТАЕ образца и концентрацией аскорбиновой кислоты). Так, при хранении при комнатной температуре в течение 3 и 6 месяцев величина ТАЕ уменьшалась с 0.062 до 0.048 и 0.036 ммоль/г соответственно, в то время как концентрация аскорбиновой кисло-

ты – с 0.025 до 0.014 и 0.005 ммоль/г, т.е. ее потери составляли 80%. В то же время полифенолы сохранялись значительно лучше, их концентрация изменялась от 0.037 до 0.033 и 0.030 ммоль/г, т.е. менее чем на 20%. Таким образом, аскорбиновая кислота, по-видимому, служит стабилизатором для других антиоксидантов, но механизм такой стабилизации пока не ясен, так как процессы окисления кислородом не протекают в запаянных ампулах.

Общее содержание полифенолов в одной дозе $Kr\acute{e}to-A^{\circledR}$ (15 г) эквивалентно ~0.5 ммоль Тролокса, что примерно соответствует содержанию полифенолов в 30–70 мл красного вина. Для увеличения общего количества антиоксидантов на одну дозу к стандартному образцу $Kr\acute{e}to-A^{\circledR}$ прибавили большее количество экстракта из оливок, а также экстракт из виноградных косточек (представляющий собой концентрат олигопроцианидинов (ОПС), см. рис. 1), который часто используется в различных пищевых добавках и обладает антиокислительной активностью [46]. Известно, что ОПС, полученные из какао и продуктов его переработки, также обладают высокой антиокислительной активностью, в частности, в реакциях с радикалами, образующимися из пероксинитрита [47]. Принимая молекулярный вес для мономера ОПС равным $\sim 3 \times 10^2$ и стехиометрию его реакции с $ABTS^{+}$ равной 5 (аналогично кверцетину), мы можем ожидать, что наибольшая величина ТАЕ для ОПС должна составлять не более ~8 ммоль/г. Исследуемые образцы ОПС имели ТАЕ в пределах 3.3–4.5 ммоль/г, что соответствует 40–60% содержанию полифенолов в экстрактах.

Такой обогащенный $Kr\acute{e}to-A^{\circledR}$ имел величину ТАЕ 0.080 ммоль/г, из которой 0.024 ммоль/г отвечает аскорбиновой кислоте (табл. 3). Таким образом, если исключить аскорбиновую кислоту, то одна доза такого $Kr\acute{e}to-A^{\circledR}$ была эквивалентна 0.056 ммоль/г полифенолов или 50–100 мл красного вина.

Удельная антиокислительная активность природных экстрактов

Способность антиоксидантов нейтрализовать свободные радикалы зависит не только от их общей концентрации, но и от скорости, с которой они реагируют с радикалами. В зависимости от структуры антиоксидантов могут захватывать радикалы с различной скоростью и поэтому имеют различную активность. Мы разработали простой способ оценки такой антиокислительной активности для индивидуальных веществ с использованием PR (см. “Эксперимент. часть” и [26]). Для природных экстрактов содержание антиоксидантов неизвестно, поэтому вместо концентраций для оценки средней антиокислительной активно-

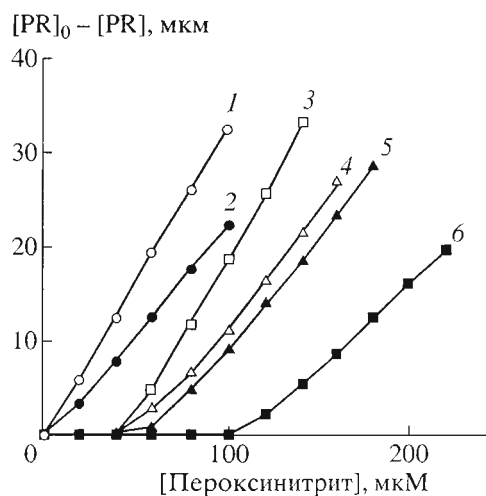


Рис. 5. Убыль пирогаллолового красного в результате реакции с пероксинитритом в отсутствие и в присутствии антиоксидантов. Условия: pH 7, 25°C, $[PR]_0$ 77 мкМ, 1(○) – контрольный эксперимент без добавок антиоксиданта; 2(●) – Kréto-A® (концентрат), 35 мкМ; 3(□) – аскорбиновая кислота, 10 мкМ; 4(△) – Kréto-A® (концентрат), 34 мкМ + аскорбиновая кислота, 10 мкМ; 5(▲) – Kréto-A® (торговый), 37 мкМ; 6(■) – Kréto-A® (торговый), 74 мкМ.

сти антиоксидантов, входящих в исследуемую смесь используется ТАЕ. Измеренная таким образом активность была нами названа удельной антиокислительной активностью SAA (Specific Antioxidant Activity). Следует отметить, что SAA может быть ниже средней активности индивидуальных антиоксидантов, присутствующих в данной смеси, поскольку часто величина ТАЕ больше общей суммарной концентрации антиоксидантов (см. предыдущий раздел). В качестве примера в табл. 2 представлены SAA и действительные активности антиоксидантов для ряда индивидуальных соединений. Как видно из этой таблицы, наибольшие значения SAA имеют галловая кислота и кверцетин, тогда как кофейная кислота и катехин являются умеренными антиоксидантами.

Как и в случае индивидуальных антиоксидантов, добавление к PR концентратов антиоксидантов или их смесей значительно защищает его от обесцвечивания пероксинитритом, степень такой защиты возрастает с увеличением количества прибавленных антиоксидантов (рис. 5 и 6). Например, концентраты красного вина и виноградного сока дают наклоны линейной зависимости D_0/D от $[TAE]/[PR]_0$ большие, чем в случае Тролокса, что свидетельствует о более высокой их активности по отношению к Тролоксу. Величина SAA красных вин, а также концентратов красных вин и виноградного сока весьма слабо зависит от происхождения вина; наибольшую величину имеет Bordeaux, 2.3 ± 0.2 . Красное вино Carignan име-

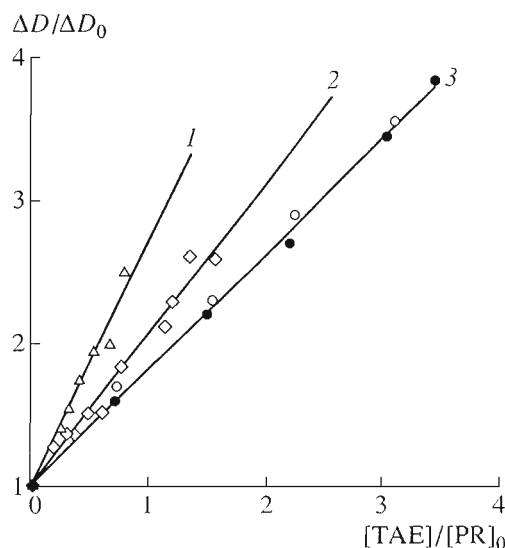


Рис. 6. Зависимость D_0/D от $TAE/[PR]_0$ в присутствии винного экстракта (1), экстракта виноградного сока (2) и Тролокса (3). Последовательно прибавляли по 10 мкл раствора пероксинитрита (12 мкМ). Условия: pH 7, 25°C, $[PR]_0$ 80 мкМ (○), 40 мкМ (●).

ет SAA 1.6 ± 0.15 , что близко к SAA винного концентрата, полученного из аналогичного вина (1.4 ± 0.15). Величины SAA для OPC (1.4) и экстракта зеленого чая после удаления кофеина (1.8) выше, чем SAA индивидуального катехина (0.22) из-за присутствия в этих экстрактах галлокатехина и его производных [40]. Полученные значения SAA для исследованных концентратов вполне соответствуют SAA таких индивидуальных полифенолов, как галловая кислота (3.8), флавоноиды (4.6 для кверцетина, 0.22 для катехина) и пирокатехины (0.17 для кофейной кислоты). Экстракты оливок содержат больше пирокатехинов и их SAA (0.65–0.8) немного ниже по сравнению с красным вином и чаем. Величина SAA для такой сложной смеси антиоксидантов как Kréto-A® соответствует величине, рассчитанной исходя из SAA компонентов и их количеств.

Как сама аскорбиновая кислота, так и смеси антиоксидантов, содержащих аскорбиновую кислоту, например Kréto-A®, ведут себя очень специфически при их изучении с использованием PR. Аскорбиновая кислота является уникальным антиоксидантом, так как она способна восстанавливать промежуточные радикалы, образовавшиеся из PR, и таким образом его регенерировать [26]. В результате PR в присутствии аскорбиновой кислоты вообще не окисляется пероксинитритом до тех пор, пока полностью не израсходуется сама аскорбиновая кислота (рис. 5, кривая 3). Только после этого идет обесцвечивание PR, но с той же стехиометрией, что и в отсутствие аскорбиновой кислоты (ср. кривые 1 и 3 рис. 5). Более того, если

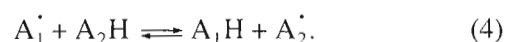
к PR одновременно прибавить антиоксидант и аскорбиновую кислоту, то последняя расходуется таким же образом, как и в отсутствие дополнительного антиоксиданта. Важно, что после расходования аскорбиновой кислоты обесцвечивание PR пероксинитритом идет с той же стехиометрией, что и в случае прибавления только одного этого антиоксиданта. Количество пероксинитрита, необходимое для полного израсходования аскорбиновой кислоты (измеряется началом обесцвечивания PR, рис. 5, кривая 3), растет с увеличением последней, но зависимость немного отклоняется от линейной. Так, на 10 мкмоль аскорбиновой кислоты требуется 40 ± 10 мкмоль (1 : 4), тогда как 30 мкмоль окисляется 75 ± 10 мкмоль (1 : 2.5) пероксинитрита. По этим экспериментальным данным была построена калибровочная кривая для определения концентрации аскорбиновой кислоты в концентратах антиоксидантов. Важно отметить, что более чем из сотни рассмотренных нами различных антиоксидантов не удалось найти ни одного другого, который вел бы себя аналогично аскорбиновой кислоте. Таким образом, этот подход позволяет определять содержание аскорбиновой кислоты в присутствии других антиоксидантов.

Например, Kréto-A[®] вел себя точно так же, как смесь его концентрата с аскорбиновой кислотой (рис. 5, кривые 5 и 4). Соответственно, зная концентрацию аскорбиновой кислоты, можно было определить содержание других антиоксидантов в смеси как разность между ТАЕ и содержанием аскорбиновой кислоты, а затем определить SAA этих антиоксидантов.

Как упоминалось выше, аскорбиновая кислота как антиоксидант во многом уникальна. Эта уникальность состоит прежде всего в ее способности восстанавливать промежуточные радикалы, образующиеся из других антиоксидантов в их реакциях с радикалами. Так, аскорбиновая кислота восстанавливает α -токоферильный радикал ([1, 48–50] и ссылки в этих работах), а также арилоксилфлавоноидные [51] и урацильные [52] радикалы. Эти свойства аскорбиновой кислоты позволяют ей регенерировать (или “ремонттировать”) другие антиоксиданты. Именно такой механизм и реализуется в смеси аскорбиновой кислоты с PR. Этот механизм регенерирования одного антиоксиданта другим может играть важную роль *in vivo*. Полифенолы и другие соединения могут служить первичными акцепторами радикалов и образовывать менее опасные стабильные радикалы, которые в свою очередь могут восстанавливаться аскорбиновой кислотой. В свою очередь семидегидроаскорбатный радикал и дегидроаскорбиновая кислота могут дальше восстанавливаться под действием NADH или глутатиона (GSH) (причем GSH окисляется до GSSG) в присутствии соответственно NADH-семидегидроаскорбатредуктазы или дегидроаскорбатредуктазы [1]. Так как в свою оче-

редь GSSG восстанавливается NADPH по реакции, катализируемой глутатионредуктазой [1], суммарный процесс можно рассматривать как “каталитическую” реакцию радикалов с NADH или NADPH, причем антиоксиданты при этом могут не расходоваться. Таким образом, при нормальных физиологических условиях антиоксиданты в действительности могут и не уничтожаться радикалами в стехиометрических количествах. Более того, мочевую кислоту (один из основных антиоксидантов в сыворотке крови), а также полифенолы можно рассматривать как примеры своеобразных катализаторов окисления аскорбиновой кислоты радикалами.

Таким образом, наряду с их собственной реакционной способностью по отношению к радикалам, антиоксиданты можно также классифицировать по их способности регенерировать друг друга в смеси. По этой способности их можно расположить в определенном порядке, т.е. они имеют определенную иерархию (часто ее называют “pecking order”) [29]. Действительно, если один из антиоксидантов A₁H или A₂H окисляется до радикала, то имеет место следующее равновесие:



Если это равновесие сдвинуто вправо, тогда антиоксидант A₁H находится выше в такой иерархии, чем A₂H. Если такую смесь антиоксидантов подвергнуть воздействию радикалов, антиоксидант, находящийся в самом низу такой иерархической лестницы, будет расходоваться намного быстрее остальных, если даже сам он непосредственно не реагирует с первичными окислителями. Таким образом, последовательность, в которой антиоксиданты расходуются, присутствуя в смеси, может сильно отличаться от той последовательности, в которой они располагаются в соответствии со своей реакционной способностью по отношению к радикалам-окислителям. Это приводит к тому, что суммарный защитный эффект смеси различных антиоксидантов может быть значительно выше величины, рассчитанной как сумма активностей индивидуальных компонентов с учетом их концентраций. С этой точки зрения, регулярное употребление в пищу, даже в малых дозах, разнообразных природных антиоксидантов может быть гораздо более выгодным, чем употребление одного, даже очень активного антиоксиданта. Многие пищевые продукты содержат как большое количество, так и большое разнообразие активных антиоксидантов. Например, 300–350 мл красного вина дает ~40% общего количества необходимых полифенолов [53]. Более того, эти полифенолы являются водорастворимыми и биологически усваиваются намного легче, чем полифенолы фруктов и овощей [19]. В этом смысле пищевые добавки типа Kréto-A[®], по-видимому,

служат хорошим альтернативным безалкогольным источником биологически активных полифенолов. Другим таким источником, безусловно, является крепко заваренный зеленый чай.

Хотя имеются свидетельства в пользу сильных антиокислительных свойств полифенолов красного вина, полученных *in vitro*, их воздействие на антиокислительный статус *in vivo* в литературе описано гораздо хуже. Употребление красного вина здоровыми добровольцами приводило к значительному увеличению антиокислительного статуса плазмы их крови, причем особенно заметно было увеличение содержания мочевой кислоты ([17] и ссылки в этой работе). Это увеличение, по-видимому, можно объяснить восстановлением первоначально образующихся уратных радикалов полифенолами (т.е., мочевая кислота, как антиоксидант, находится значительно выше полифенолов, а тем более аскорбиновой кислоты в иерархии, которая обсуждалась выше). Непрямое подтверждение этому было получено при исследовании пары антиоксидантов мочевая кислота–PR [26].

В последнее время в литературе появились работы, утверждающие, что многие полифенолы, в частности флавоноиды, более эффективно перехватывают пероксинитрит, чем эбселен [54, 55]. Эбселен – селеносодержащее соединение, которое быстро реагирует с пероксинитритом в бимолекулярной реакции, $k = 2.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [56]. Следовательно, в работах [54, 55] фактически утверждается, что полифенолы быстро и бимолекулярно реагируют с пероксинитритом. Однако описанная нами методика с использованием PR предполагает, что пероксинитрит сначала распадается на свободные радикалы, которые затем реагируют с PR и антиоксидантами. Недавно прямыми измерениями было показано, что полифенолы в действительности не реагируют с пероксинитритом [57]. Поэтому выводы авторов работ [54, 55] основаны на неправильной интерпретации результатов, полученных методом конкурентных реакций.

ВЫВОДЫ

Разработаны простые и удобные методы исследования антиокислительной активности сложных смесей природных антиоксидантов. Эти методы позволяют определить как общее содержание антиоксиданта, ТАЕ, так и их среднюю относительную реакционную способность в реакциях с радикалами, SAA. Разработан также метод измерения концентрации аскорбиновой кислоты в присутствии других активных антиоксидантов и их сложных смесей. Продемонстрирована возможность использования этих методов для исследования целого ряда различных концентратов антиоксидантов, разных напитков и пищевых добавок. Было показано, что красное вино, экстракты

из винограда, оливок и чая имеют очень высокое содержание активных антиоксидантов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали без дополнительной очистки следующие реактивы: пирогаллоловый красный (пирогаллолсульфонфталеин, PR), Тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота) и другие антиоксиданты (см. рис. 1) (Aldrich, США); резвератрол (3,4',5-тригидроксистильбен) (Sigma, США); кверцетин, рутин, катехин, нарингенин и морин (Institut de Recherche Pierre Fabre, Франция). Основные растворы антиоксидантов обычно готовили в 30 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7.0 ± 0.05), при этом резвератрол и кверцетин сначала растворяли в этаноле, а рутин в смеси этанол–вода, 1 : 1 по объему. Использованный в работе PR содержал небольшое количество примесей, легко окисляемых на воздухе, и поэтому его раствор (0.7 мМ в буфере) выдерживали при комнатной температуре в течение нескольких часов при тщательном перемешивании. Потери самого PR при этом не превышали 5%. Затем этот раствор хранили в замороженном состоянии в течение нескольких недель. В процессе измерений все растворы (пероксинитрита, PR и антиоксидантов) хранили на ледяной бане для предотвращения их медленного разложения.

Пероксинитрит синтезировали в соответствии с методикой [25, 26]. Его концентрацию определяли путем измерения оптической плотности при 302 нм (ϵ $1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [25]). Необходимую концентрацию (обычно 4–7 мМ) готовили ежедневно его разбавлением 0.5–1% NaOH.

Использованные природные экстракты. Концентрированные красное вино и виноградный сок, экстракт природных каротиноидов из томатов и водорастворимые экстракты из оливок (далее называемые просто экстрактами) были предоставлены Institut de Recherche Pierre Fabre. Экстракт красного вина готовился 40-кратным концентрированием вина Cagnan (кариньян) с удалением из него спирта и винной кислоты. Виноградный сок концентрировали в 4–5 раз, а в качестве экстракта оливок использовали концентрированную водную фракцию, получаемую при производстве оливкового масла. Концентрат олигопроцианидинов (OPC, рис. 1) получали экстракцией виноградных косточек этанолом. Подробности получения этих экстрактов изложены в работе [24]. Обычные французские красные вина Bordeaux Haut Medoc (Château Le Chêne), Cagnan (Coteaux de Morimont, выдержанное в дубовых бочках), Madiran, Beaujolais Village, а также Chardonnay (белое), Côte de Provence rosé (розовое) и пиво покупали в розничной торговле.

ABTS^{•+}. ABTS (50 мг) растворяли в 50 мл буферного раствора и к раствору прибавляли при перемешивании 150–220 мг PbO₂ (7–10-кратный избыток относительно ABTS), при этом раствор сразу же становился зеленовато-голубым. После перемешивания в течение 2–3 мин раствор дважды фильтровали, сначала через мелкопористый стеклянный, а затем через 0,45 мкм одноразовый фильтр. Концентрацию ABTS^{•+} определяли по оптической плотности при 660 нм ($\epsilon 1.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [27]). В ходе синтеза степень превращения ABTS в ABTS^{•+} не превышала 20–35%. Полученный таким образом раствор был достаточно устойчив при комнатной температуре в течение нескольких дней. При степени превращения выше 40% концентрация ABTS^{•+} сначала медленно уменьшалась до величины, соответствующей 20–35% степени превращения, а затем оставалась практически неизменной.

Электрохимические измерения проводили с помощью потенциостата ElectroKemat (Франция) при комнатной температуре в трехэлектродной электрохимической ячейке, соединенной с линиями подачи аргона и вакуума. Электрод сравнения (насыщенный каломельный) отделяли от раствора солевым мостиком, заполненным фоновым электролитом. Рабочий и вспомогательный электроды были соответственно из стеклоуглерода (диаметром 3 мм) и платиновой проволоки (площадь поверхности $\sim 1 \text{ cm}^2$). Перед использованием рабочий электрод полировали алмазной пастой и тщательно промывали водой. Все измерения проводили в фосфатном буфере в атмосфере аргона при скорости развертки 50–200 мВ/с. Полученные данные представлены в табл. 1, примеры циклических вольтамперограмм (ЦВА) даны на рис. 2.

Кинетические исследования реакции между 4-гидроксибензилуксусной кислотой и ABTS^{•+} проводили в термостатированной кварцевой ячейке ($l = 1 \text{ cm}$) спектрофотометра в фосфатном буфере (pH 7) при 25°C. В ячейку помещали необходимые растворы антиоксиданта и ABTS. После достижения температурного равновесия прибавляли ABTS^{•+} и кинетику убыли ABTS^{•+} измеряли при длине волны 760 нм. Ни исходные соединения, ни продукты окисления не поглощают при этой длине волны. Начальную скорость реакции определяли в течение первых 60 с.

Титрование антиоксидантов радикалом ABTS^{•+}. Этот метод близок к методу "обесцвечивания ABTS^{•+}" Райс-Эванс и сотр., описанному в работах [33–36]. В термостатируемую ячейку спектрофотометра, оборудованного магнитной мешалкой, по-

мешали 1.8–2.3 мл раствора исследуемого антиоксиданта в фосфатном буфере (pH 7). Оптическое поглощение измеряли при 760 нм каждые 10 или 20 с. Раствор ABTS^{•+} прибавляли в ячейку с помощью микропипетки (10–20 мкл) каждые 10 или 20 с до тех пор, пока поглощение не достигало величины 0.25–0.30. Концентрации подбирали таким образом, чтобы полное количество ABTS^{•+} не превышало 0.1–0.4 мкмоль (0.2–0.9 мл). Активные антиоксиданты быстро (в процессе перемешивания) восстанавливали добавляемый зелено-голубой раствор ABTS^{•+} с образованием бесцветного ABTS. После полного израсходования антиоксиданта появлялась относительно устойчивая зелено-голубая окраска и оптическое поглощение при 760 нм начинало увеличиваться (рис. 4). Конечной точкой титрования, определяющей количество израсходованного ABTS^{•+}, считали момент, когда оптическое поглощение достигало значения 0.02–0.04.

Аналогичные результаты получали при использовании метода традиционного титрования с визуальным обнаружением конечной точки титрования. В этом случае ABTS^{•+} прибавляли по каплям из градуированной пипетки к тщательно перемешиваемому раствору исследуемого антиоксиданта. Конечная точка титрования легко определялась как момент появления зелено-светло-голубого окрашивания, но исчезающего через 10–20 с. Для каждого образца готовили не менее трех разных растворов, и концентрацию антиоксиданта в каждом таком растворе определяли не менее двух раз. При этом использовали не менее двух отдельно приготовленных растворов ABTS^{•+}.

Процесс титрования несколько осложняется, если реакция антиоксиданта с ABTS^{•+} приводит к интенсивно окрашенным продуктам. Например, окисление резвератрола и некоторых флавоноидов радикалом ABTS^{•+} дает розовое или красноватое окрашивание. В этом случае конечная точка определялась как изменение цвета на темно-фиолетовый или другие аналогичные цвета. Тем не менее для большинства антиоксидантов продукты их окисления не поглощали в области 760 нм, и, таким образом, их присутствие не создавало дополнительных сложностей.

Суммарное содержание антиоксидантов в природных экстрактах выражали в единицах ТАЕ. ТАЕ данного образца представляет собой величину, равную количеству Тролокса, которое нейтрализует столько же катион-радикалов ABTS^{•+}, что и исследуемый образец. Так как каждая молекула Тролокса способна нейтрализовать две молекулы

радикалов, то для индивидуальных антиоксидантов ТАЕ отвечает максимальному количеству радикалов, которое может быть перехвачено данным антиоксидантом, поделенному на коэффициент 2. ТАЕ выражается либо в ммоль/г для твердых образцов и вязких жидкостей, либо в мМ для растворов.

Анализ относительной антиокислительной активности. Этот метод основан на обесцвечивании PR радикалами, образующимися при распаде пероксинитрита [26]. PR удобен для спектрофотометрического измерения его концентрации. Если к PR добавить другой антиоксидант, то он перехватит часть радикалов и таким образом частично защитит PR от обесцвечивания, тем самым стехиометрия реакции $D = \Delta[\text{PR}]/\Delta[\text{пероксинитрит}]$ уменьшится. Подробности этого метода изложены в работе [26]; кратко он состоит в следующем. В пробирку помещали 4 мл раствора PR (с концентрацией 30–90 мкМ в фосфатном буфере) либо вместе с исследуемым антиоксидантом (А), либо без него. Затем пробирку наклоняли и на ее сухую стенку с помощью микропипетки помещали 10 мкл раствора пероксинитрита (4–8 мкМ). Пробирку закрывали резиновой пробкой и быстро встряхивали. Таким образом последовательно прибавляли 4–6 порций пероксинитрита. УФ-спектры раствора регистрировали после каждого прибавления пероксинитрита, а расход PR измеряли при 542 нм ($\epsilon = 2.4 \times 10^4$ л моль⁻¹ см⁻¹). Стехиометрию реакции PR с пероксинитритом $D = \Delta[\text{PR}]/\Delta[\text{пероксинитрит}]$ определяли из наклона прямой в координатах $\Delta[\text{PR}] - \Delta[\text{пероксинитрит}]$ (рис. 5). После этого откладывали D_0/D в зависимости от $[\text{A}]_0/[\text{PR}]_0$ при различных начальных концентрациях антиоксидантов (рис. 6), где D_0 и D – стехиометрия реакции обесцвечивания PR пероксинитритом соответственно в отсутствие и в присутствии антиоксиданта А, а $[\text{A}]_0$ и $[\text{PR}]_0$ – начальные концентрации А и PR. Наклон полученной прямой представлял собой активность данного антиоксиданта, измеренную относительно PR.

Для сложных смесей (экстрактов или концентратов) вместо концентрации антиоксидантов использовали значение ТАЕ и соответственно строили зависимость D_0/D от $[\text{ТАЕ}]/[\text{PR}]_0$ (рис. 6). В этом случае наклон полученной прямой представлял собой среднюю активность всех антиоксидантов, присутствующих в данной смеси, рассчитанную на единицу ТАЕ. Такую среднюю удельную активность антиоксидантов именовали SAA. В качестве стандартного антиоксиданта использовали Тролокс, а экспериментально полученные активности относительно PR пересчитывали на Тролокс. Так как ТАЕ и концентрации часто не совпадали, для примера в табл. 2 представлены SAA некоторых индивидуальных веществ, а также их действительная относительная активность. Анализ полученных экспериментальных данных проводи-

ли с использованием пакета программ Kaleida-Graph. В большинстве случаев стандартное отклонение составляло менее 10–15%.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность за финансовую поддержку ЦНРС (Национальный центр научных исследований Франции, CNRS), Pierre Fabre Santé (Франция), Institut de Recherche Pierre Fabre (Франция) и INTAS (грант № 99-209).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. 2 ed. Oxford: Clarendon Press, 1989.
- Stehbens W.E. // Med. Hypotheses. 1999. V. 53. P. 507–515.
- Furchgott R. // Angew. Chem., Int. Ed. 1999. V. 38. P. 1870–1880.
- Murad F. // Angew. Chem., Int. Ed. 1999. V. 38. P. 1856–1868.
- Ignarro L. // Angew. Chem., Int. Ed. 1999. V. 38. P. 1882–1892.
- Gross S.S., Wolin M.S. // Annu. Rev. Phys. 1995. V. 57. P. 737–769.
- Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshal P.A., Freeman B.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 1620–1624.
- Pryor W.A. // Am. J. Physiol. 1995. V. 268. P. L699–L722.
- Radi R., Peluffo G., Alvarez M.N., Navilia M., Cayota A. // Free Radical Biol. Med. 2001. V. 30. P. 463–488.
- Fukuto J.M., Ignarro L.J. // Acc. Chem. Res. 1997. V. 30. P. 149–152.
- Koppenol W.H. // Met. Ions Biol. Syst. 1999. V. 36. P. 597–619.
- Coddington J.W., Lyman S.V., Hurst J.K. // J. Amer. Chem. Soc. 1999. V. 121. P. 2438–2443.
- Lyman S.V., Hurst J.K. // Inorg. Chem. 1998. V. 37. P. 294–301.
- Uppu R.M., Squadrito G.L., Pryor W.A. // Arch. Biochem. Biophys. 1996. V. 327. P. 335–343.
- Goldstein S., Czapski G. // J. Amer. Chem. Soc. 1998. V. 120. P. 3458–3463.
- Renaud S., de Lorgeril M. // Lancet. 1992. V. 339. P. 1523–1526.
- Maxwell S.R.J. // ACS Symposium Series. 1997. V. 661. P. 150–166.
- Tomera J.F. // Trends Food Sci. Technol. 1999. V. 10. P. 129–138.
- Soleas G.J., Diamandi E.P., Goldberg D.M. // J. Clin. Lab. Analysis. 1997. V. 1. P. 287–313.
- Rimm E.B., Klatsky A., Grobde D., Stampfer M.J. // British Medical J. 1996. V. 312. P. 731–736.
- Halliwell B. // Lancet. 1993. V. 341. P. 1538–1538.
- Natural Antioxidants in Human Health and Disease / Ed. B. Frei, F.L. Orlando, N.Y.: Acad. Press, 1994.
- Block G. // Am. J. Clin. Nutr. 1991. V. 54. P. 1310–1314.

24. Rouanet M., Potherat J.J., Cousse H. Patent FR9715760 от 12.12.1997.
25. Hughes M.N., Nicklin H.G. // J. Chem. Soc.(A). 1968. P. 450–452.
26. Balavoine G.G.A., Geletii Yu.V. // Nitric Oxide: Biol. Chem. 1999. V. 3. P. 40–54.
27. Forni L.G., Mora-Arellano V.O., Parker J.E., Wilson R.L. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1986. № 2. P. 1–6.
28. Steenken S., Neta P. // J. Phys. Chem. 1982. V. 86. P. 3661–3667.
29. Buettner G.R. // Arch. Biochem. Biophys. 1993. V. 300. P. 535–543.
30. Jovanovich S.V., Hara Y., Steenken S., Simic M.G. // J. Amer. Chem. Soc. 1995. V. 117. P. 9881–9888.
31. Jovanovich S.V., Steenken S., Tosic M., Marjanovich B., Simic M.G. // J. Amer. Chem. Soc. 1994. V. 116. P. 4846–4851.
32. Pelizzetti E., Mentasti E. // Inorg. Chem. 1979. V. 18. P. 583–588.
33. Miller N., Rice-Evans C.A. // Redox Report. 1996. V. 2. P. 161–171.
34. Rice-Evans C.A., Miller N. // Methods Enzymol. 1994. V. 234. P. 279–293.
35. Rice-Evans C.A. // Free Radical Res. 2000. V. 33 (Suppl.). S59–S66.
36. Romay C., Pascual C., Lissi E.M. // Braz. J. Med. Biol. Res. 1996. V. 29. P. 175–183.
37. Campos A.M., Lissi E.A. // Int. J. Chem. Kin. 1997. V. 29. P. 219–224.
38. Wolfenden B.S., Willson R.L. // J. Chem. Soc. PT II. 1982. P. 805–812.
39. Asmus K.D. // Methods in Enzymology. 1990. V. 186. P. 168–180.
40. Mitcher L.A., Jung M., Shankel D., Dou J.-H., Steele L., Pillai S.P. // Med. Res. Rev. 1997. V. 17. P. 327–365.
41. Maxwell S.R.J., Cruickshank A., Thorpe G.H.G. // Lancet. 1995. V. 334. P. 193–194.
42. Whitehead T.P., Robinson D., Allaway S., Syms J., Hale A. // Clin. Chem. 1995. V. 41. P. 32–35.
43. Soleas G.J., Tomlinson G., Diamandis E.P., Goldberg D.M. // J. Agric. Food Chem. 1997. V. 45. P. 3995–4003.
44. Landrault N., Poucheret P., Ravel P., Gasc F., Cros G., Teissedre P.-L. // J. Agric. Food Chem. 2001. V. 49. P. 3341–3348.
45. Perrin J.L. // Revue Francaise des Corps Gras. 1992. V. 39. P. 24–32.
46. Kaul R // Pharm. Unserer Zeit. 1996. V. 25. P. 175–185.
47. Arteel G.E., Sies H. // FEBS Lett. 1999. V. 462. P. 167–170.
48. Frei B., England L., Ames B.N. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 6377–6381.
49. Bisby R.H., Parker A.W. // Arch. Biochem. Biophys. 1995. V. 317. P. 170–178.
50. Mukai K., Nishimura M., Kikuchi S. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 274–278.
51. Bors W., Michel C., Schikora S. // Free Rad. Biol. Medicine. 1995. V. 19. P. 45–52.
52. Simic M.G., Jovanovic S.V. // J. Amer. Chem. Soc. 1989. V. 111. P. 5778–5782.
53. Goldberg D.M. // Clin. Chim. Acta. 1995. V. 41. P. 14–16.
54. Haenen G.R.M.M., Paquay J.B.G., Korthouwer R.E.M., Bast A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997. V. 236. P. 591–593.
55. Paquay J.B.G., Haenen G.R.M.M., Korthouwer R.E.M., Bast A. // J. Agric. Food Chem. 1997. V. 45. P. 3357–3358.
56. Masumoto H., Kissner R., Koppenol W.H., Sies H. // FEBS Lett. 1996. V. 398. P. 179–182.
57. Tibi S., Koppenol W.H. // Helv. Chim. Acta. 2000. V. 83. P. 2412–2424.

The Determination of Total Concentration and Activity of Antioxidants in Foodstuffs

Yu. V. Geletii*, G. G. A. Balavoine**, O. N. Efimov*, and V. S. Kulikova**

*Phone: +7 (252) 23-222; e-mail: kulver@icp.ac.ru

*Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow oblast, 142432 Russia

**Laboratoire de Chimie de Coordination, CNRS, 205 route de Narbonne, Toulouse, Cedex, F-31077 France

We developed a new method for the analysis of active antioxidants that is based on their reactions with the $ABTS^{+\cdot}$ cation radical obtained by oxidation of ABTS, 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt. The feasibility of this method was confirmed by electrochemical and kinetic studies of model antioxidants. $ABTS^{+\cdot}$ was shown to react rapidly with active and slowly with weak antioxidants, which allows it to be used as a model radical for the quantitative determination of the total content of natural antioxidants (antioxidant equivalent) in natural extracts and wines. Another analytical method based on the competitive oxidation of Pyrogallol Red (a detecting molecule) and the examined antioxidants by radicals derived from peroxyxynitrite was used for measuring the relative activity of antioxidants. A combination of both methods helped measure the total concentration of antioxidants and their average specific activities (per molecule of active compound) in extracts from grape, olive, and tomato and concentrates of various popular beverages (wines, beers, and juices), as well as in the commercial concentrated food product Kréto-A[®], made from grape, red wine, tomato, and olive. Red wine and red grape juice were shown to be the most rich in antioxidants (up to 20 mM), with their activity being similar to that of polyphenols. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: $ABTS^{+\cdot}$, antioxidant, ascorbic acid, peroxyxynitrite, polyphenols, wine