

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИДРОПЕРОКСИДОВ ЛИПИДОВ МЕТОДОМ АКТИВИРОВАННОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

**П.О. Волкова, А.В. Алексеев, А.А. Джатдоева, Е.В. Проскурнина, Ю.А. Владимиров**  
(кафедра медицинской биофизики, факультет фундаментальной медицины, e-mail: proskurnina@gmail.com)

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

**Ключевые слова:** *гидропероксиды липидов, перекисное окисление липидов, активированная хемилюминесценция, кумарин C-525*

## 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, Lomonosovskii pr., 31-5, Moscow; 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* — научный сотрудник Всероссийского научно-исследовательского института авиационных материалов (7(499)261-86-77, kvark-87@mail.ru); *Джатдоева Айшат Абдрахмановна* — аспирант кафедры медицинской биофизики факультета фундаментальной медицины (8-925-826-64-04; ayshatdj@gmail.com), *Проскурнина Елена Васильевна* — доцент кафедры медицинской биофизики факультета фундаментальной медицины, к.х.н., доц. (proskurnina@gmail.com); *Владимиров Юрий Андреевич* — зав. кафедрой медицинской биофизики факультета фундаментальной медицины, профессор, академик РАН (yuvlad@mail.ru).

## **Введение**

Гидропероксиды липидов образуются в липидных системах в процессе перекисного окисления — сложного многостадийного цепного процесса окисления кислородом липидных субстратов, главным образом полиненасыщенных жирных кислот, включающий стадии с участием и образованием свободных радикалов [1]. В настоящее время существует большое количество методов определения гидропероксидов липидов, главным образом в пищевых продуктах (растительные масла). 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 ряду причин: потери иода вследствие его летучести, окисление  $\Gamma$ -ионов кислородом воздуха, мешающее влияние веществ, индуцирующих окисление иодида ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}$  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 титрования при определении гидропероксидов липидов в биологических объектах является относительно невысокий предел обнаружения, как следствие, необходимость большого количества образца.

Из инструментальных методов для определения гидроперекисей липидов в растительных маслах активно используется ИК-спектроскопия 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  $[I_3]$  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 были разработаны на основе иммобилизированной каталазы на электроде с клиноптилолитом, 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, 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]. Его предлагается использовать после разделения липидов сыворотки методом ВЭЖХ, что делает анализы дорогостоящими, длительными и трудоемкими.

Целью настоящей работы явилась 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 (оксиметиламинометан хлорид) (Reanal, Венгрия) в дистиллированной воде. Необходимое значение pH 7,4 доводили при помощи конц. HCl, контролируя кислотность при помощи 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 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (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 кумарина С-525 (ООО "НПФ" "Альфа-Аконис") с концентрацией 1 ммоль/л готовили растворением навески в метаноле. Рабочие растворы готовили разбавлением исходного 20 mM *трис*-буферным раствором. Новые потенциальные активаторы хемилюминесценции, в том числе и класса кумаринов, были приобретены в ОАО ПО «ТОС» (Тонкий органический синтез), Долгопрудное, Россия (табл. 1), растворы указанных соединений готовили аналогичным образом.

Использованы поверхностно-активные вещества: додецилсульфат натрия (Sigma-Aldrich), тритон X-100 (Sigma-Aldrich), Твин-60 (Sigma). Для иодометрического титрования использовали хлороформ, ледяную уксусную кислоту, KI, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, крахмал (все реактивы Sigma-Aldrich).

### Результаты и их обсуждение

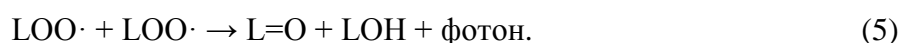
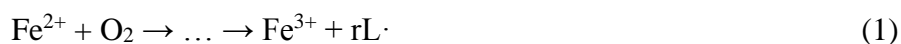
Для моделирования перекисного окисления липидов ранее использовали липосомы яичного желтка [11, 12], либо митохондрии [13]. Методики приготовления липосом и выделения митохондрий трудоемки и требуют специального оборудования. В нашей работе в качестве модельной была выбрана система на основе соевого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

пробоподготовки, хорошо растворяется в дистиллированной воде. Кроме соевого лецитина, модельная ХЛ-система содержала Fe(II) и активатор хемиллюминесценции. Общий объем системы составлял 1,000 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 рассчитанные количества 20 mM *трис*-буферного раствора, раствора соевого лецитина, активатора, раствора ПАВ (в опытах по изучению влияния ПАВ) и *трет*-бутилгидропероксида (при построении градуировочной зависимости), предварительно смешав эти компоненты в пробирке. Во время измерения раствор в кювете перемешивали механической мешалкой со скоростью 16 оборотов/с.

Рис. 1

Типичный вид кинетической кривой показан на рис. 1. Она соответствует классической кинетике перекисного окисления в липидных системах [14, 15] с участием следующих основных реакций [1, 15]:



Кинетическая кривая состоит из нескольких фаз — быстрой вспышки, которая определяется реакцией гидропероксида с ионами двухвалентного железа (реакция 2), и ее амплитуда может служить, таким образом, аналитическим сигналом латентного периода, обусловленного антиоксидантным действием ионов железа (реакция 4), и медленной вспышки, протекание которой определяют в основном реакции 2, 3 и 5.

#### Изучение влияния ПАВ и активаторов

Раствор лецитина в воде при высоких концентрациях представляет собой весьма гетерогенную систему, что ухудшает воспроизводимость и чувствительность ХЛ-определения. Было сделано 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 хемиллюминесценции (додецилсульфат натрия, «Тритон Х-100»), либо содержали компоненты, реагирующие с ионами железа, что сопровождалось хемиллюминесценцией в отсутствие липидного субстрата («Твин-60»).

Для повышения чувствительности ХЛ, сопровождающей перекисное окисление липидов, ранее был предложен физический активатор – кумарин С525, добавление этого соединения увеличивало квантовый выход ХЛ-реакции [16]. Это дает возможность измерять хемилюминесценцию в малых количествах биологического материала. Вторым достоинством является селективность усиления [16]. Важно и то, что физические сенсibilизаторы не участвуют в реакциях, а следовательно, их применение не сказывается на ходе процессов ни в химических, ни в биологических системах [16].

Табл. 1

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, из которых 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 (табл. 1).

#### Подбор концентраций реагентов

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

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

где  $c$  — концентрация соевого лецитина в мкг/мл,  $I_{\max}$  — 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, т.к. 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: 10,0 мкг/мл соевого лецитина, 50 мкМ кумарина С-525, 0,10 мМ Fe(II).

Уравнение градуировочной прямой:

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

где  $I_{\max}$  — интенсивность быстрой вспышки, В,  $c_{\text{ВНР}}$  — концентрация *трет*-бутилгидропероксида, мкМ.

Коэффициент корреляции:  $r = 0,999$ , предел обнаружения по *трет*-бутилгидропероксиду:  $c_{\min} = 164$  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 – коммерческого препарата 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

Оцененное по интенсивности хемилюминесценции содержание гидропероксидов липидов в образцах соевого лецитина разной концентрации, было проверено стандартным иодометрическим методом по ГОСТ Р 51487-99. В коническую колбу на 300 мл вносили навеску образца массой 1,0 г, 10,0 мл хлороформа; после растворения пробы приливали 10,0 мл ледяной уксусной кислоты и 1,0 мл 10 % 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% раствора крахмала. Оттитровывали выделяющийся иод 0,01 М раствором  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . Перекисное число рассчитывали по формуле:

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

Где  $V_0$  — объем раствора тиосульфата натрия, использованный 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.

Рис. 2

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

$$ПЧ = 0,84c_{tВНР} + 31,38 \quad (10)$$

где  $ПЧ$  — перекисное число, мМ/кг  $1/2O_2$ ,  $c_{tВНР}$  — концентрация гидропероксидов липидов в единицах *трет*-бутилгидропероксида, мМ/кг.

Однако имеется некоторое ложное количество гидропероксидов, определяемое в образце, где гидропероксиды вообще не 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 дипогидропероксидов ионами  $Fe^{2+}$  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:

$$c_{\text{ЛОН}} = 1,19c_{\text{РООН}} \quad (11)$$

#### Определение липидных гидропероксидов в сухих сливках

Методика была применена для определения гидропероксидов липидов в сухих сливках "Аристократ" методом добавок с использованием *трет*-бутилгидропероксида. Аналитическая ХЛ-система состояла из  $Fe(II)$  (конечная концентрация 0,10 мМ) и кумарина С-525 (50 мкМ), 10 мг/мл раствора сухих сливок в воде и различных количеств *трет*-бутилгидропероксида (конечные концентрации 0; 50; 80; 110; 140; 170 мкМ). Аналитическим сигналом служил максимум быстрой вспышки.

Уравнение градуировочной прямой:

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

где  $I_{\text{max}}$  — 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:

$$c(\text{трет-бутилгидропероксида}) = (2,58 \pm 0,27) \text{ мМ в 1 г порошка.}$$

В результате, 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 поддержке средств гранта РФФИ № 14-04-01361а.



## Рисунки к статье

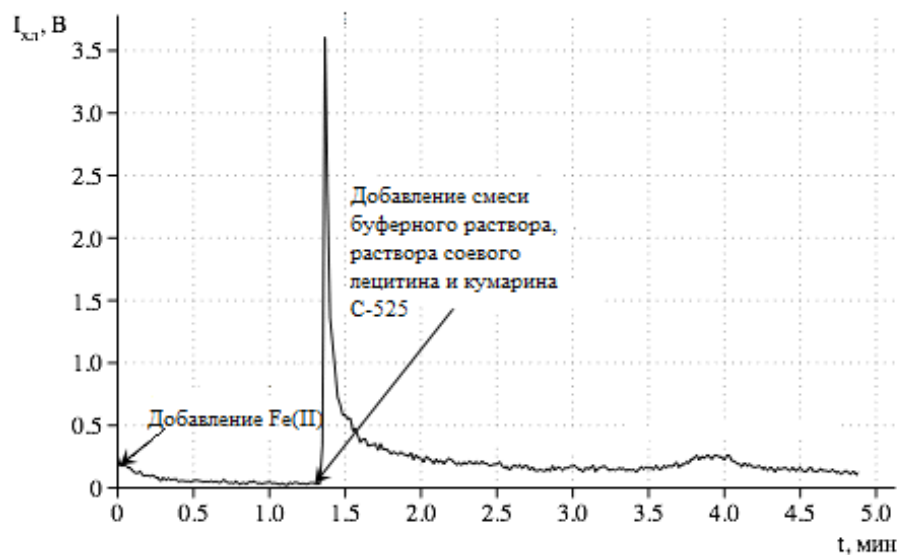


Рис. 1. Хемилюминесцентная кривая переокисления липидов; состав системы: 10,0 мкг/мл соевого лецитина, 0,10 мМ Fe (II), 50 мкМ С-525. Быстрая и медленная вспышки и латентный период отмечены на рисунке.

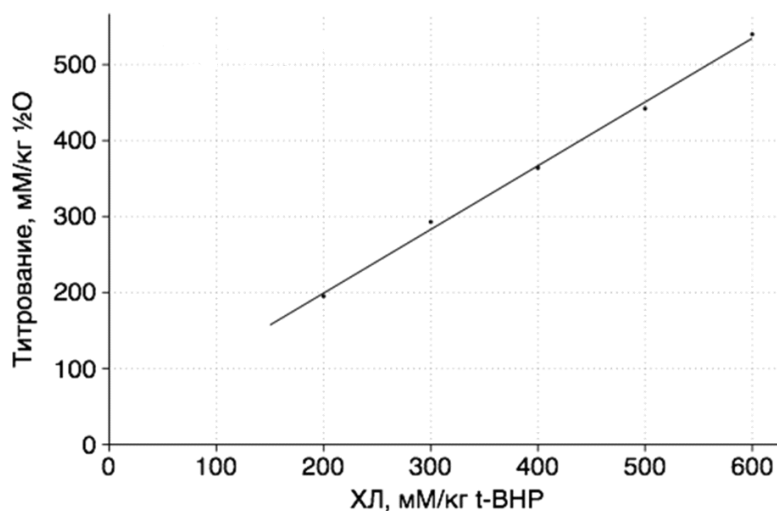
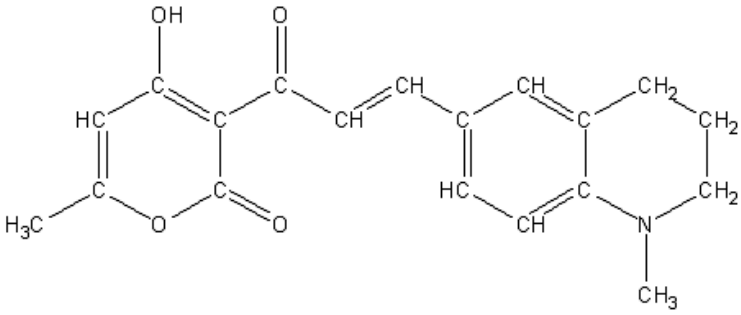
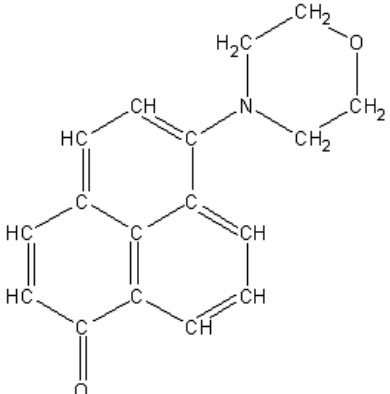
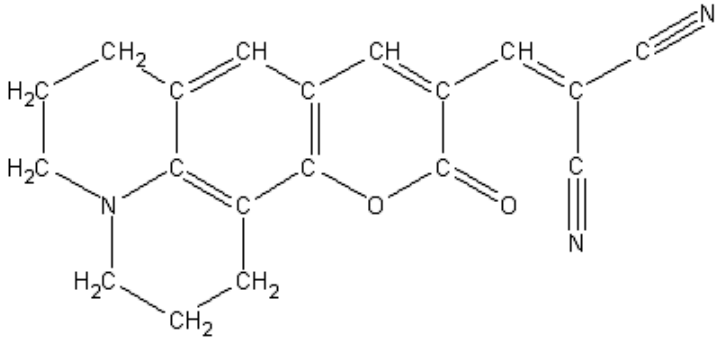
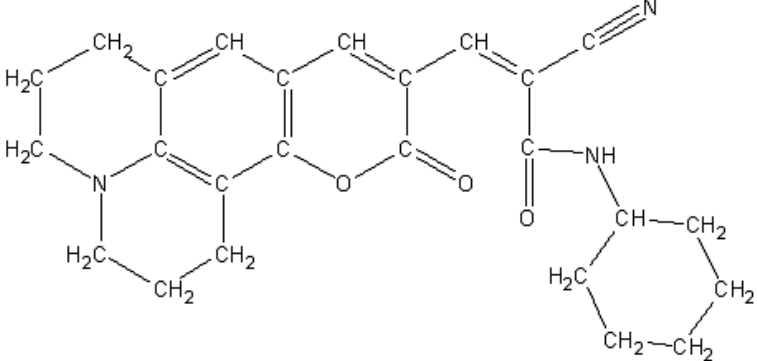


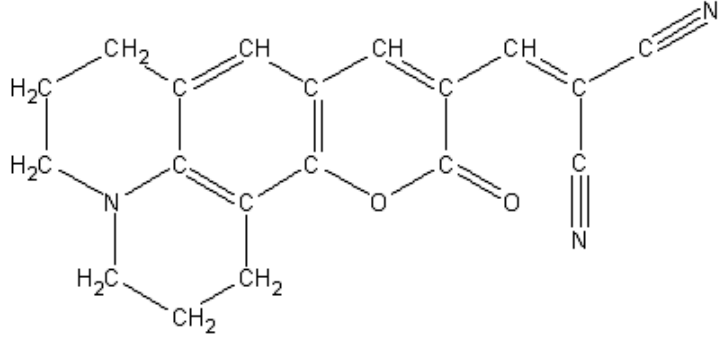
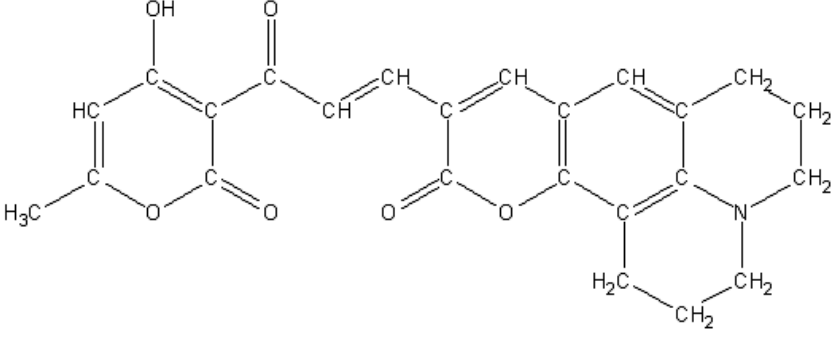
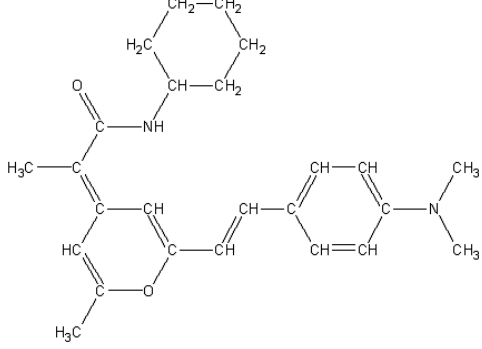
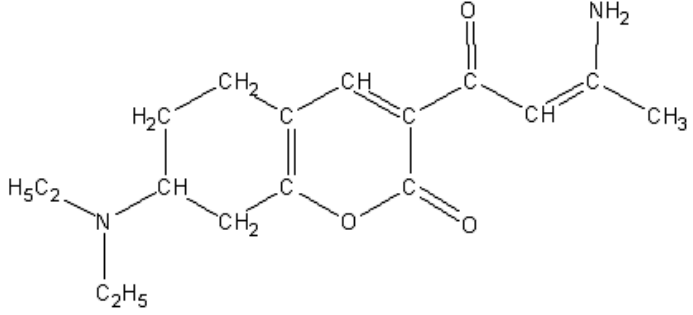
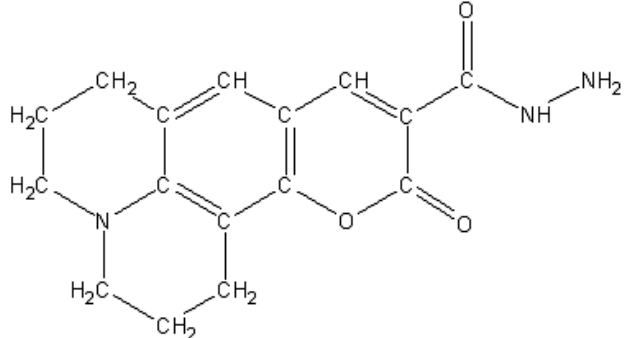
Рис. 2. Корреляция между содержаниями липидных гидропероксидов, определенными методом хемилюминесценции и иодометрическим титрованием.

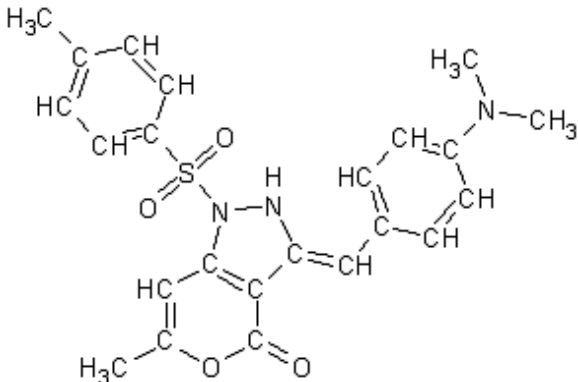
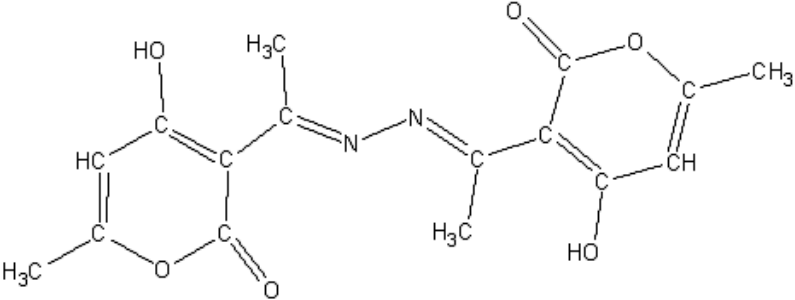
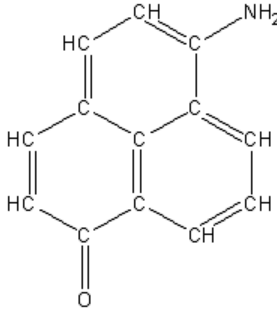
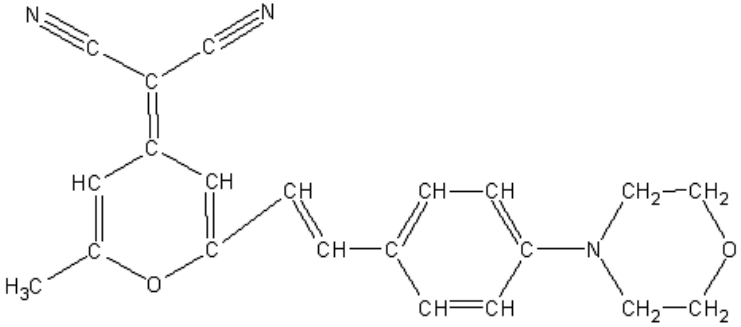
Структурные формулы и коэффициенты усиления исследованных соединений

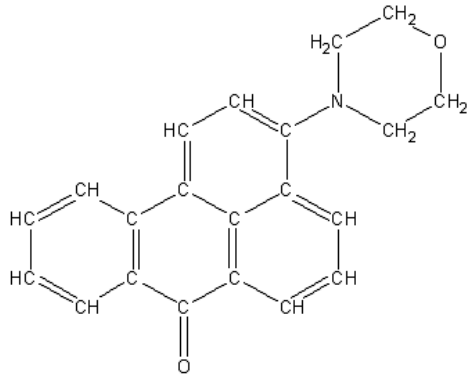
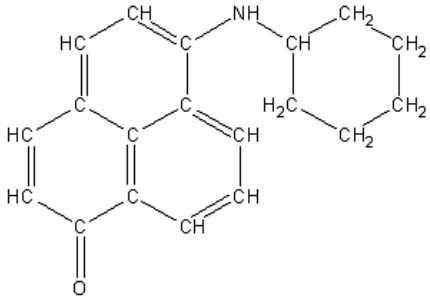
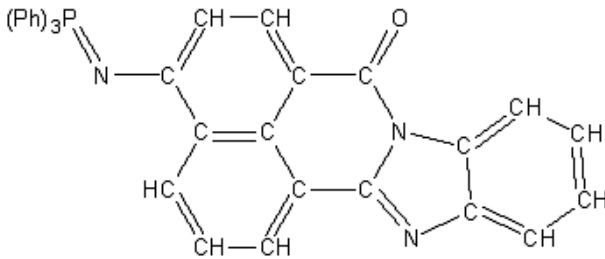
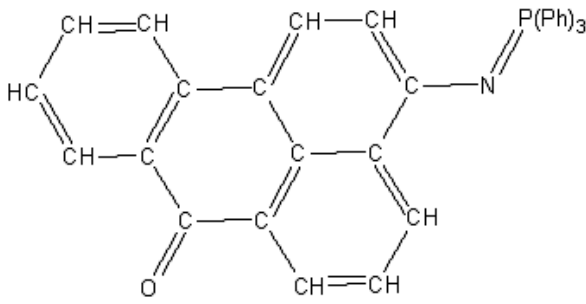
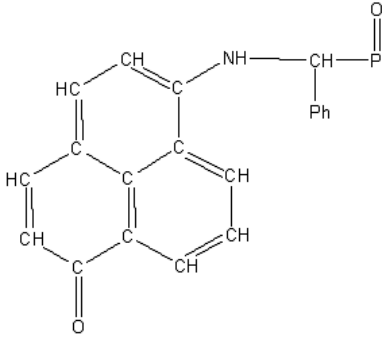
Номер	Структурная формула	Коэффициент усиления
1		1,21
2		0,66
3		1,61
4		0,89

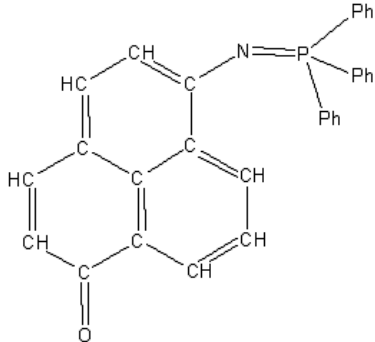
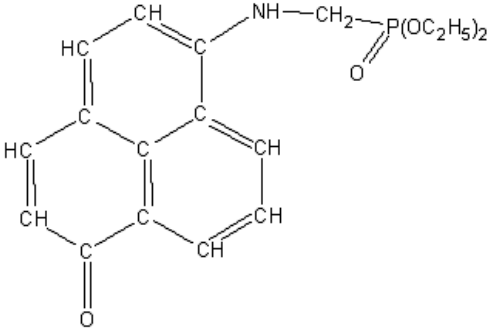
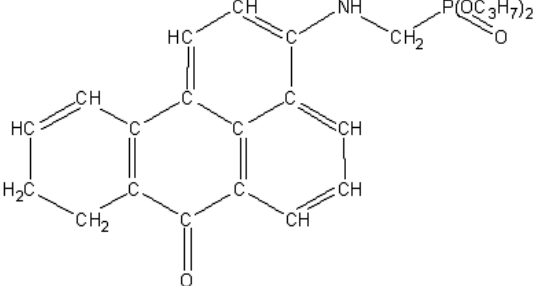
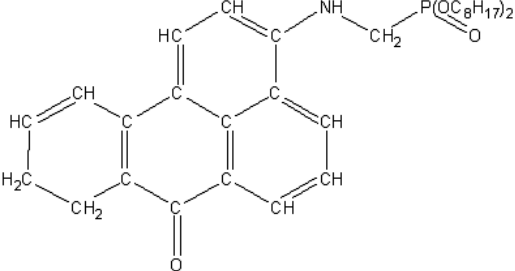
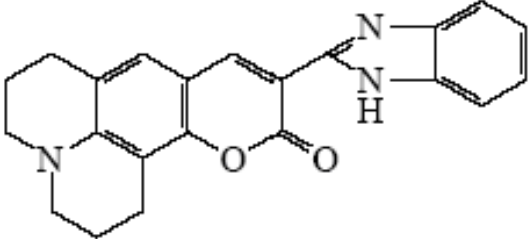
5		1,08
6		1,07
7		1,10
8		1,01

9		0,76
10		0,97
11		4,60
12		1,84
<i>Продолжение таблицы</i>		

13		1,18
14		1,37
15		1,21
16		0,89
17		2,44
<i>Продолжение таблицы</i>		

18		1,71
19		1,14
20		0,84
21		1,06
<i>Продолжение таблицы</i>		

22		0,95
23		0,99
24		1,13
25		0,81
26		1,05
<i>Продолжение таблицы</i>		

27		1,17
28		0,84
29		1,10
30		0,67
C-525		4,65



## Список литературы

1. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. Москва.1972.
2. *Масла растительные и жиры животные. Метод определения перекисного числа, ГОСТ Р 51487-99*1999.
3. *Van de Voort, V.R.* // J. Am. Oil. Chem. Soc. 1994. **71**. P. 921.
4. *Van de Voort, F.R.* // Food. Anal. Methods. 2008. **1**. P. 153.
5. *Bloomfield M.S.* // Analyst. 1999. **124**. P. 1865.
6. *Grau A.* // J. Agric. Food. Chem. 2000. **48**. P. 4136.
7. *Silva R.A.B.* // Food. Chem. 2012. **133**. P. 200.
8. *Lagrange J., Lagrange P.* // Fresenius J. Anal. Chem. 1991. **339**. P. 452.
9. *Yamamoto Y., Kambayashi Y., Ueda T.* // Methods Mol. Biol. 1998. **108**. P. 63.
10. *Adachi J., et al.* // Lipids. 1998. **33**. P. 1235.
11. *Шерстнев М.П., Азимбаев Т.К., Владимиров Ю.А.* // Биофизика. 1995. **40**. С. 531.
12. *Васильева О.В.* // Биол.мембраны. 1998. **15**. С. 177.
13. *Суслова Т.Б., Оленев В.И., Владимиров Ю.А.* // Биофизика. 1969. **14**. С. 510.
14. *Погосян Г.А.* // Биофизика. 1996. **41**. С. 342.
15. *Измайлов Д.Ю., Владимиров Ю.А.* // Биологические мембраны. 2002. **19**. С. 507.
16. *Sharov V.S., Dremina E.S., Vladimirov Iu. A.* // Biofizika. 1995. **40**. P. 428.
17. *Van de Voort F.R.* // J. Am. Oil. Chem. Soc. 1998. **71**. P. 921.

Поступила в редакцию 23.04.15