

ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ БИОАНТИОКСИДАНТОВ И ИХ СМЕСЕЙ В ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ «ГЕМОГЛОБИН – ПЕРЕКИСЬ ВОДОРОДА – ЛЮМИНОЛ»

© 2017 г. Н.Н. Сажина

*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4
Natnik48s@yandex.ru*

Поступила в редакцию 27.07.17 г.

Определение антиоксидантной активности различных биологических объектов: пищевых продуктов, лекарственных препаратов, напитков, плазмы крови и других биологических жидкостей человека является важной задачей для медико-биологических исследований. В настоящее время для этого широко используются хемилюминесцентные методы. Они чувствительны, оперативны и позволяют непосредственно контролировать кинетику ингибирования окисления антиоксидантами. В настоящей работе использовалась хемилюминесцентная модель свободнорадикального окисления люминола, инициированного смесью «гемоглобин – перекись водорода» в водной среде. Была изучена кинетика ингибирующего действия восьми водорастворимых биоантиоксидантов с разной молекулярной структурой и их бинарных смесей, определены параметры ингибирования окисления люминола этими антиоксидантами и их стехиометрические коэффициенты. Выявлены особенности кинетики ингибирования для глутатиона. Проведена оценка синергических и антагонистических эффектов в смесях использованных антиоксидантов. Для большинства бинарных смесей изученных антиоксидантов была отмечена независимость тушения хемилюминесценции отдельными антиоксидантами, причем более «активные» антиоксиданты ингибировали окисление раньше, чем менее «активные». Исключение составили смеси некоторых антиоксидантов, которые при взаимодействии усиливали или ослабляли друг друга, проявляя синергизм или антагонизм.

Ключевые слова: антиоксидант, хемилюминесценция, люминол, синергизм, антагонизм.

Определение антиоксидантной активности (АОА) различных биологических объектов: пищевых продуктов, лекарственных препаратов, напитков, плазмы крови и других биологических жидкостей человека является важной задачей для медико-биологических исследований, поскольку ингибирующее действие антиоксидантов в этих объектах вносит вклад в защитную силу организма человека в борьбе с окислительным стрессом. Указанные объекты, как правило, содержат широкий спектр антиоксидантов, различных по своему химическому строению. В плазме крови, например, антиоксидантный состав обусловлен наличием в ней аминокислот, витаминов, гормонов, ферментов, но основными соединениями, определяющими суммарную АОА плазмы крови, являются такие водорастворимые компоненты, как мочева и

аскорбиновая кислоты, а также билирубин, глутатион и белки [1]. Суммарная АОА – это интегральная величина, характеризующая возможность совместного действия всех антиоксидантов с учетом их потенциального синергизма. Выбор адекватного метода определения АОА имеет значение для правильной оценки результатов. В настоящее время широко используются хемилюминесцентные методы определения АОА разных биологических субстратов. Они достаточно чувствительны, оперативны и позволяют непосредственно контролировать кинетику ингибирования окисления антиоксидантами [2–14]. Большое количество ХЛ-методов, широко используемых в органической химии, основано на инициированном окислении различных углеводов, в результате рекомбинации перекисных радикалов которых образуются возбужденные молекулы соединений, испускающие свет. В таких системах для усиления свечения используются разные активаторы-люминофоры, а эффективное окисление протекает при температурах 50–80°C [3–5]. Эти ХЛ-модели

Сокращения: АОА – антиоксидантная активность, ХЛ – хемилюминесценция, хемилюминесцентный, АК – аскорбиновая кислота, МК – мочева кислота, ГК – галловая кислота, Гл – глутатион восстановленный, Гло – глутатион окисленный, ФК – фенозан калия, Нб – гемоглобин.

применяют, как правило, для изучения жирорастворимых соединений. В других ХЛ-моделях для измерения АОА водорастворимых субстратов в качестве хемиллюминогенного субстрата окисления используется, в основном, люминол [6–14], а инициирование радикалов осуществляется в большинстве случаев либо при термическом распаде водорастворимых азосоединений [7,10–14], либо при УФ облучении люминола [11], либо при взаимодействии гемсодержащих производных с перекисью водорода [8,9]. В настоящей работе использовали ХЛ-модель свободнорадикального окисления люминола, инициированного смесью «гемоглобин – перекись водорода» в водной среде [8]. Эта модель отличается высокой чувствительностью, оперативностью, а ее компоненты доступны и не токсичны.

В упомянутых выше работах определяли, как правило, АОА плазмы крови и других биологических жидкостей, настоек трав, различных напитков, однако ингибирующая активность индивидуальных антиоксидантов и их совместное действие практически не изучались. В монографии [15] приведены некоторые работы по исследованию кинетики совместного ингибирующего действия некоторых антиоксидантов различной структуры в процессе инициированного окисления липидных субстратов. Однако в основном в них использовали жирорастворимые инициаторы при высоких, не физиологических температурах и волюметрический метод регистрации. Поэтому целесообразно исследовать оперативным ХЛ-методом в окислительной модели при $T = 37^\circ\text{C}$ кинетику ингибирующего действия смесей различных по природе водорастворимых антиоксидантов с точки зрения взаимодействия их между собой, т.е. наличия эффектов их синергизма и антагонизма [16].

Цель настоящей работы – изучение кинетики ингибирующего действия некоторых водорастворимых биоантиоксидантов и их бинарных смесей в хемиллюминесцентной окислительной модельной системе «гемоглобин (Hb) – (H₂O₂) – люминол» и выяснение существования взаимодействия между отдельными антиоксидантами в их смесях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были использованы восемь водорастворимых соединений: тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота, «Aldrich», США), аскорбиновая кислота (АК) («Sigma», США), мочевиная кислота (МК) («Sigma», США), галловая кислота (ГК) («Sigma», США), глутатион вос-

становленный (Гл) и окисленный (Гло) («Sigma-Aldrich», США), фенозан калия (ФК) (3-3,5-дигрет-бутил-4-гидроксифенил пропионата калия, синтезирован в ИБХФ РАН) и мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат, ИБХФ РАН). Структурные формулы этих соединений представлены на рис. 1.

Использовали окислительную модель «Hb – H₂O₂ – люминол», в которой образование радикалов-инициаторов происходит при взаимодействии Hb и H₂O₂, а люминол играет роль хемиллюминогенного субстрата окисления [8]. Эта модель, хотя и не до конца изучена, представляет интерес «физиологичностью» процесса. Кинетика и конкретные схемы протекающих при взаимодействии Hb и H₂O₂ реакций достаточно сложные и изучались в работах [17–20]. В результате взаимодействия H₂O₂ с Hb (использован коммерческий MetHb – Hb-Fe³⁺) образуются феррил-радикалы (Hb(•+)-Fe^{4+=O}), которые иницируют окисление люминола (L). Параллельно этому часть феррил-производных Hb вновь взаимодействуют с избытком H₂O₂, что заканчивается их деградацией с выходом свободных ионов Fe³⁺, которые восстанавливаются супероксидом O₂^{•-} до Fe²⁺. Далее в реакции Фентона образуются очень активные OH[•]-радикалы. Указанные радикалы-инициаторы вызывают одноэлектронное окисление люминола, в процессе которого образуется L^{•-}-радикал, O₂^{•-}-радикал, эндопероксид люминола LO₂^{•-} и дианион 3-аминофталата в возбужденном состоянии (AP²⁻)^{*}, при переходе которого в основное состояние высвечивается квант света $h\nu$. Добавление в реакционную систему вместо Hb солей двухвалентного (FeSO₄) и трехвалентного железа (FeCl₃) не дает свечения [8], что указывает на необходимость наличия радикалов-инициаторов с гемовой структурой. В работе [9] авторы для устранения побочного действия белков гемоглобина (глобина) использовали гемин в системе «гемин – H₂O₂ – люминол». В настоящей работе замена гемоглобина на эквивалентное количество гемина не привела к изменению параметров ХЛ. Кинетические кривые ХЛ регистрировали на приборе «Lum-5773» («ДИСофт», Москва) при температуре $T = 37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ по методике, аналогичной описанной в работе [8]. Готовили исходные растворы Hb (15 мкМ, MetHb, «Sigma», США), люминола (1 мМ, «AppliChem», США), H₂O₂ (12 мМ, «Химмед», Россия), фосфатного буфера (pH 7,4) и исследуемых антиоксидантов с концентрацией 1 мМ, растворенных в буфере или дистиллированной воде. Основным измеряемым параметром, характеризующим антирадикальную активность изучаемых соединений, являлся

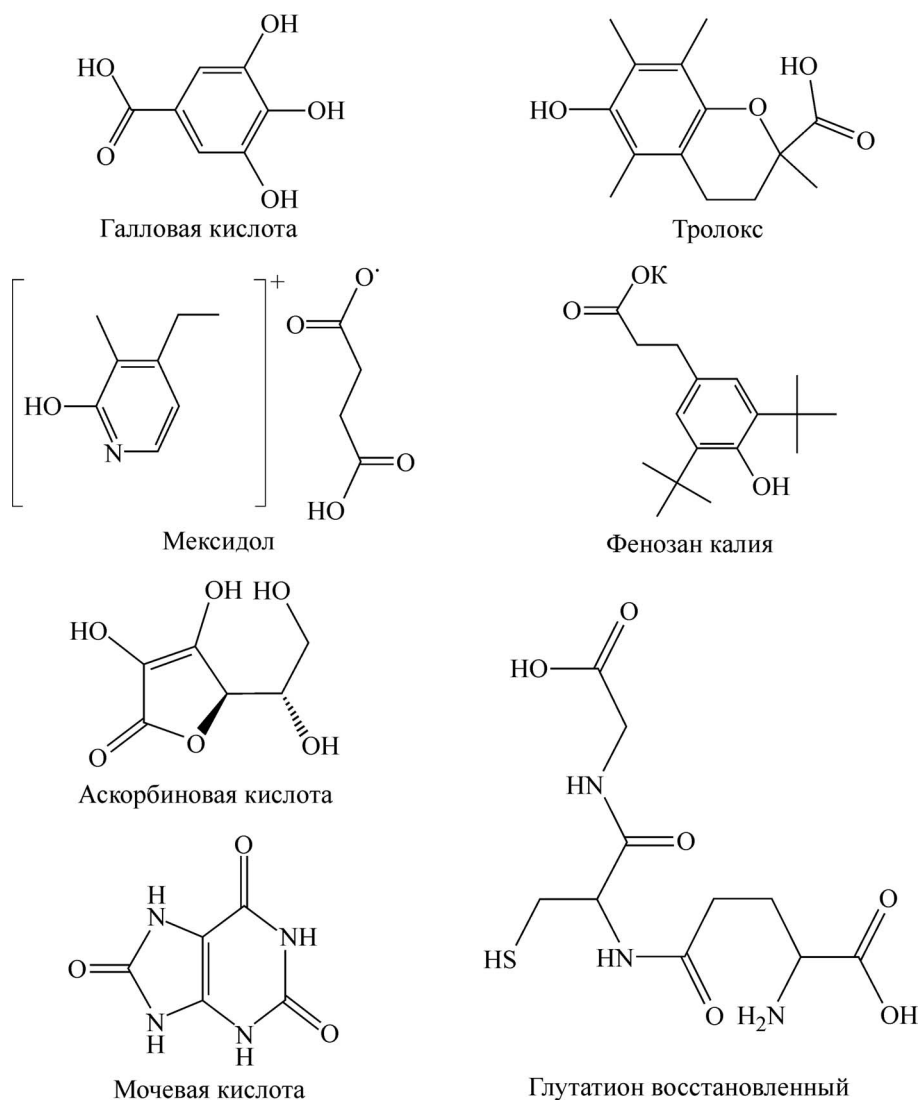


Рис. 1. Структурные формулы тестируемых соединений.

период индукции (τ). Он определялся как время от момента инициирования окисления до точки пересечения с временной осью касательной, приложенной к ХЛ-кривой в точке ее перегиба, соответствующей максимуму первой производной. Для соединений, снижающих интенсивность ХЛ без выраженного периода индукции, измеряемым параметром антиоксидантной активности являлся коэффициент тушения интенсивности ХЛ по сравнению с холостой пробой в точке ее максимума (I_0/I).

Статистическую обработку проводили с использованием стандартных алгоритмов программ MS Excel. Все результаты представлены в виде значений средней величины стандартная ошибка среднего [21]. Ошибка измерений всех параметров с учетом повторяемости результатов составила не более 15%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 приведены кинетические ХЛ-кривые для использованных в работе антиоксидантов. Тролокс, АК, МК и ГК имеют четкий период индукции (рис. 2а), Гл не имеет выраженного периода индукции (объяснение приводится далее), а ХЛ-кривые для окисленного Гло совпадают с холостой пробой. Фенозан калия и мексидол демонстрируют уменьшение амплитуды ХЛ без какого-либо значительного периода индукции даже при значительно большей концентрации, по сравнению с остальными антиоксидантами (рис. 2б).

Тролокс, АК, МК и ГК ведут себя как «активные» антиоксиданты. Период индукции ХЛ в их присутствии можно рассматривать как время, необходимое для их инактивации в процессе взаимодействия с образующимися в сис-

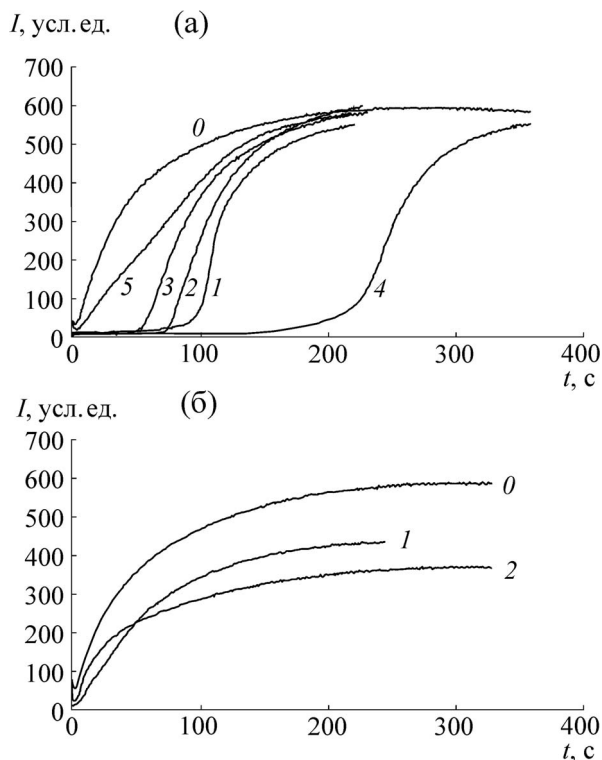


Рис. 2. Кинетические кривые хемилюминесценции: (а) – 0 – холостая проба, 1 – МК, 2 – тролокс, 3 – АК, 4 – ГК, 5 – Гл. Вводимый в ХЛ-ячейку объем для всех антиоксидантов составлял 1 мкл, конечная концентрация 0,38 мкМ. (б) – 0 – холостая проба, 1 – фенозан, 2 – мексидол. Вводимый объем 20 мкл, конечная концентрация 7,6 мкМ.

теме свободными радикалами-инициаторами. В присутствии антиоксидантов в окислительной ХЛ системе возникает конкуренция за эти радикалы между антиоксидантами и люминолом, а результат зависит от констант скоростей соответствующих реакций. У «активных» антиоксидантов константа скорости их реакций со свободными радикалами больше, чем у люминола, поэтому эти антиоксиданты успевают перехватить радикалы-инициаторы раньше, чем те вступят в реакцию с люминолом. У мексидола и фенозана калия константы скорости взаимодействия со свободными радикалами меньше, чем у люминола, поэтому ингибирование окисления и тушение ХЛ обуславливается, по-видимому, скоростью их взаимодействия с радикалами, образующимися в процессе окисления люминола. В работе [22] путем численного моделирования экспериментальной кинетики ХЛ были оценены соответствующие константы скоростей для тролокса, токоферола и мексидола при окисления люминола смесью « H_2O_2 + кардиолипид + цитохром с», и они различаются на два–три порядка.

Зависимости периода индукции τ от концентрации для пяти «активных» антиоксидантов приведены на рис. 3а. В исследуемом диапазоне концентраций эти зависимости линейны $\tau = k[\text{АО}]$, и k определяет антирадикальную активность антиоксидантов. На рис. 3б для ФК и мексидола представлены концентрационные зависимости степени подавления максимальной интенсивности ХЛ по сравнению с холостой пробой (I_0/I), откуда получен коэффициент ингибирования амплитуды $K = (I_0/I - 1)/[\text{АО}]$.

В таблице представлены значения k и K для всех исследованных антиоксидантов, а также их стехиометрические коэффициенты ингибирования f (число радикалов, перехваченных одной молекулой антиоксиданта). Для тролокса был принят коэффициент $f = 2$ [7,9,13].

Стехиометрические коэффициенты ингибирования тролоксом, МК, АК определялись многими авторами [7–9,12–14]. Наиболее близкие к нашим значениям величины f получены в работе [13] для модели с азоинициатором 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан)дигидрохлоридом. В этой работе был также определен коэффициент $f = 0,44$ для соединений SH-групп, однако кинетика ХЛ исследована не была. Как уже было отмечено ранее, кинетические ХЛ-кривые для Гл (рис. 2а, кривая 5) резко отличаются от ХЛ-кривых для других антиоксидантов, не имея хорошо выраженного периода индукции. Это свидетельствует о том, что в процессе окисления люминола глутатион взаимодействует с промежуточными интермедиатами, меняя скорость и кинетику окисления. Как показано в работе [23], некоторые тиольные соединения, включая глутатион, могут восстанавливать образующиеся при окислении гидропероксида (LOOH), и это восстановление может проходить через радикальные стадии $\text{RSH} + \text{LOOH} \rightarrow \text{RS}^\bullet + \text{LO}^\bullet + \text{H}_2\text{O}$, образуя дополнительный источник радикалов и меняя процесс ингибирования. В нашем случае этим гидропероксидом может служить H_2O_2 , нарабатывая RS^\bullet - и LO^\bullet -радикалы и усиливая окисление люминола. Поэтому период индукции не четко выражен, а f для глутатиона имеет относительно низкие значения. Подобный вид имеет ХЛ-кривая для глутатиона при окислении люминола в модели с азоинициатором 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан)дигидрохлоридом, где гидропероксиды формируются из пероксильных радикалов, возникающих при распаде инициатора [24].

Антирадикальная и антиокислительная активности биоантиоксидантов зависят от структуры их молекул [25] (рис. 1), в частности, для фенольных антиоксидантов – от прочности ОН-связи ($D_{\text{ОН}}$), от длины этой связи, от характера

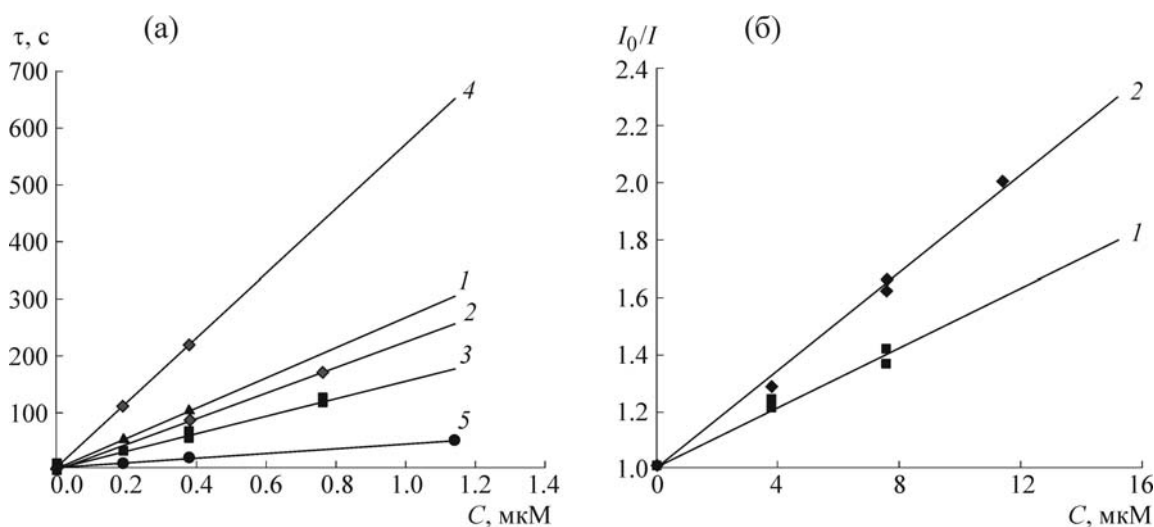


Рис. 3. (а) – Зависимости периода индукции τ от концентрации C для МК (кривая 1), тролокса (кривая 2), АК (кривая 3), ГК (кривая 4) и Гл (кривая 5). (б) – Степень подавления амплитуды ХЛ (I_0/I) от C для ФК (кривая 1) и мексидола (кривая 2).

заместителей в орто- и пара-положениях, от степени экранирования гидроксильных групп в бензольном кольце, от орто-эффекта двух гидроксильных групп или гидроксильной и карбонильной групп [26]. Экранирование ОН-группы приводит к существенному повышению активности антиоксидантов по сравнению с неэкранированным фенолом. Трет-бутильные заместители в орто-положении повышают электронную плотность на ОН-группе, снижая энергию ее диссоциации [26,27]. Высокая антирадикальная активность ГК связана с наличием в ее молекуле трех электронодонорных ОН-заместителей, прочность ОН-связи или энергия диссоциации $D_{\text{ОН}} = 347$ кДж/моль [27]. Для тролокса энергия диссоциации наиболее слабой ОН-связи выше [27], поэтому его антирадикальная активность при одних и тех же условиях меньше. В литературе имеется очень мало информации об энергии диссоциации нефенольных антиоксидантов. Мочевая кислота не от-

носится к фенольным соединениям и имеет достаточно низкий потенциал двухэлектронного электрохимического окисления ($\approx 0,65$ В [28]), а стехиометрический коэффициент ингибирования у нее относительно высокий. Аскорбиновая кислота является производным моносахарида и сильным восстановителем (потенциал окисления $\approx 0,4$ В), однако антирадикальная активность и стехиометрический коэффициент у нее меньше, чем у тролокса и МК. В присутствии кислорода АК быстро окисляется с образованием дегидроаскорбиновой кислоты, что затрудняет работу с ней. Глутатион – важный кофермент для активности глутатион-пероксидазы и обеспечивает защиту сульфгидрильных групп протеинов от окисления, сам при этом окисляясь до дисульфида. Как было сказано выше, ингибирующая активность Гл в окислительных моделях с гидроперекисями значительно меньше из-за ее способности образовывать с ними дополнительные свободные радикалы.

Антирадикальная активность k , коэффициент подавления амплитуды хемилюминесценции K и стехиометрические коэффициенты ингибирования f для отдельных антиоксидантов

Антиоксиданты	k , с·М ⁻¹	K , М ⁻¹	f
Тролокс	$(2,23 \pm 0,12) \cdot 10^8$		2,0
Мочевая кислота	$(2,65 \pm 0,16) \cdot 10^8$		$2,35 \pm 0,20$
Аскорбиновая кислота	$(1,55 \pm 0,17) \cdot 10^8$		$1,39 \pm 0,15$
Галловая кислота	$(5,41 \pm 0,29) \cdot 10^8$		$4,84 \pm 0,34$
Глутатион	$(0,42 \pm 0,06) \cdot 10^8$		$0,38 \pm 0,06$
Мексидол		$(8,5 \pm 0,9) \cdot 10^4$	
Фенозан калия		$(5,2 \pm 0,7) \cdot 10^4$	

Что касается мексидола и фенозана калия, то они более активны в реакциях с пероксильными радикалами, чем с радикалами-инициаторами. Наличие трет-бутильных групп в 3,5-положениях фенольного кольца молекулы ФК способствует перпендикулярному расположению гидроксильной группы, и тем самым увеличивает легкость ее разрыва [26,27]. Но, как и большинство монофенолов, мексидол и фенозан калия являются относительно слабыми ингибиторами [22,26]. Полученные в настоящей работе значения антирадикальной и антиокислительной активности хорошо согласуются с аналогичными параметрами таких же соединений, измеренными другими методами [9,14,22,24,29,30]. Например, при сравнении наших значений антирадикальной активности с коэффициентами электрохимической окисляемости (определяющими антиоксидантную активность), полученными для тех же антиоксидантов методом амперометрии, коэффициент корреляции составил $r = 0,97$ [30].

Для выяснения существования взаимодействия между отдельными антиоксидантами в процессе ингибирования окисления люминола (синергизма или антагонизма) были получены кинетические кривые ХЛ для различных комбинаций бинарных смесей антиоксидантов (1 : 1). На рис. 4 приведены некоторые из них. Концентрация всех антиоксидантов, кроме мексидола и ФК, была одинаковой отдельно для антиоксидантов и в их смесях. Видно, что в большинстве смесей антиоксиданты действуют практически независимо друг от друга, а кривые для смесей сдвигаются вправо (рис. 4а–в), причем первыми тушат ХЛ более «активные» антиоксиданты. Для смеси АК+Гл (рис. 4в) хорошо видно, что Гл начинает ингибировать окисление после окончания АК. Смесь АК с Гло показала небольшой (порядка 10%) синергетический эффект, т.е. АК усиливает свое действие в присутствии окисленного глутатиона (рис. 4г). Возможно, АК частично восстанавливает Гло.

ФК и мексидол в смеси с другими антиоксидантами начинают ингибировать процесс только после окончания периода индукции более «активных» антиоксидантов (рис. 4д,е).

На рис. 5а для различных пар антиоксидантов представлены сравнительные диаграммы аддитивных значений периода индукции τ_p , рассчитанные как суммы τ для отдельных антиоксидантов, исходя из данных таблицы при известной концентрации ($\tau_p = \tau_i + \tau_j$), и измеренных значений τ_i для бинарных смесей с соответствующими погрешностями расчетов и измерений. Погрешность τ_p вычислялась как

ошибка суммы двух величин [21], ошибка для τ_i – исходя из повторяемости результатов. Видно, что в пределах погрешностей для большинства смесей расчетные значения совпадают с измеренными, что свидетельствует о независимости ингибирования окисления люминола составляющими этих смесей. Исключение составляют смеси АК, тролокса и МК с Гл, а также АК с Гло. Эти смеси проявляют синергетический эффект, вероятней всего, из-за «аномального» поведения Гл в процессе окисления. В смеси АК + ГЛo, возможно, происходит частичное восстановление ГЛo аскорбиновой кислотой. Такой же эффект наблюдался при электрохимическом окислении этой смеси [30].

Рис. 5б демонстрирует снижение максимальной амплитуды ХЛ (I_0/I) бинарными смесями ФК и мексидола с остальными антиоксидантами. Темные столбики – аддитивные значения по данным таблицы для ФК и мексидола, светлые – экспериментальные данные (I_0/I) при совместном действии антиоксидантов. Для большинства смесей, в пределах погрешностей измерений и расчета, уменьшение амплитуды ХЛ происходит только за счет действия ФК и мексидола, однако некоторые антиоксиданты (АК, МК, ГК) с мексидолом усиливают это действие. Смесь мексидол + ФК проявляет небольшой (~15%) синергетический эффект по сравнению с аддитивным действием отдельных компонентов этой смеси. Что касается изменения периода индукции при совместном действии мексидола и ФК с другими антиоксидантами, то для большинства смесей наблюдается увеличение τ_i до 10% по сравнению с расчетом по аддитивности. Это, по-видимому, связано с влиянием ФК и мексидола на подавление окисления остальными антиоксидантами при их совместном действии. Исключение продемонстрировали смеси мексидол + АК и ФК + АК, у которых τ_i уменьшились примерно в два раза (от 60 до 35 с), что свидетельствует о сильном влиянии ФК и мексидола на ингибирование окисления люминола аскорбиновой кислотой (антагонизм).

ВЫВОДЫ

Изучена кинетика ингибирующего действия некоторых водорастворимых биоантиоксидантов и их бинарных смесей в ХЛ окислительной модельной системе «гемоглобин – (H₂O₂) – люминол». Определены параметры ингибирования окисления люминола антиоксидантами и их стехиометрические коэффициенты. Выявлена особенность тушения ХЛ глутатионом, связанная с образованием промежуточных радикалов при

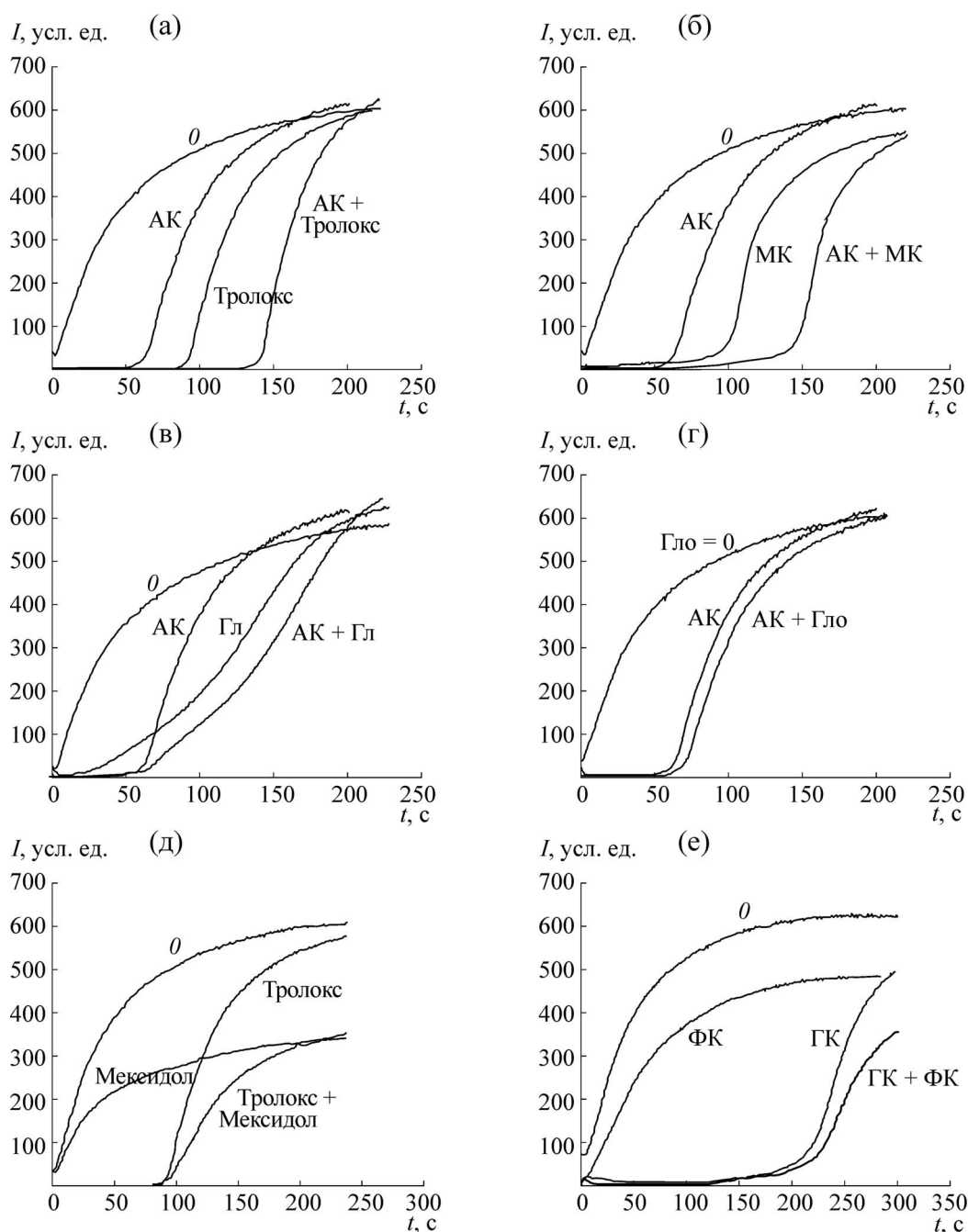


Рис. 4. Кинетические кривые ингибирования окисления люминола некоторыми антиоксидантами и их бинарными смесями. Концентрации АК, ГК, тролокса и МК на всех рисунках равны 0,38 мкМ, Гл – 0,76 мкМ, Гло – 10 мкМ (г), мексидола – 7,6 мкМ (д), ФК – 3,8 мкМ (е).

взаимодействии глутатиона с гидропероксидами. Проведено сравнение ингибирующей активности изученных антиоксидантов с их антиоксидантной активностью, полученной другими методами. Для большинства бинарных смесей использованных антиоксидантов была отмечена независимость тушения ХЛ отдельными антиоксидантами, причем более «активные» антиоксиданты ингибировали окисление раньше,

чем менее «активные». Исключение составили некоторые смеси: АК + Гл, МК + Гл, тролокс + Гл, АК + Гло, ФК + мексидол. Эти антиоксиданты при совместном действии усилили друг друга, т.е. проявили синергизм. Для смесей АК с ФК и мексидолом наблюдался антагонизм – период индукции ХЛ для них уменьшился вдвое по сравнению с периодом индукции для АК, что свидетельствует о влиянии ФК и мексидола

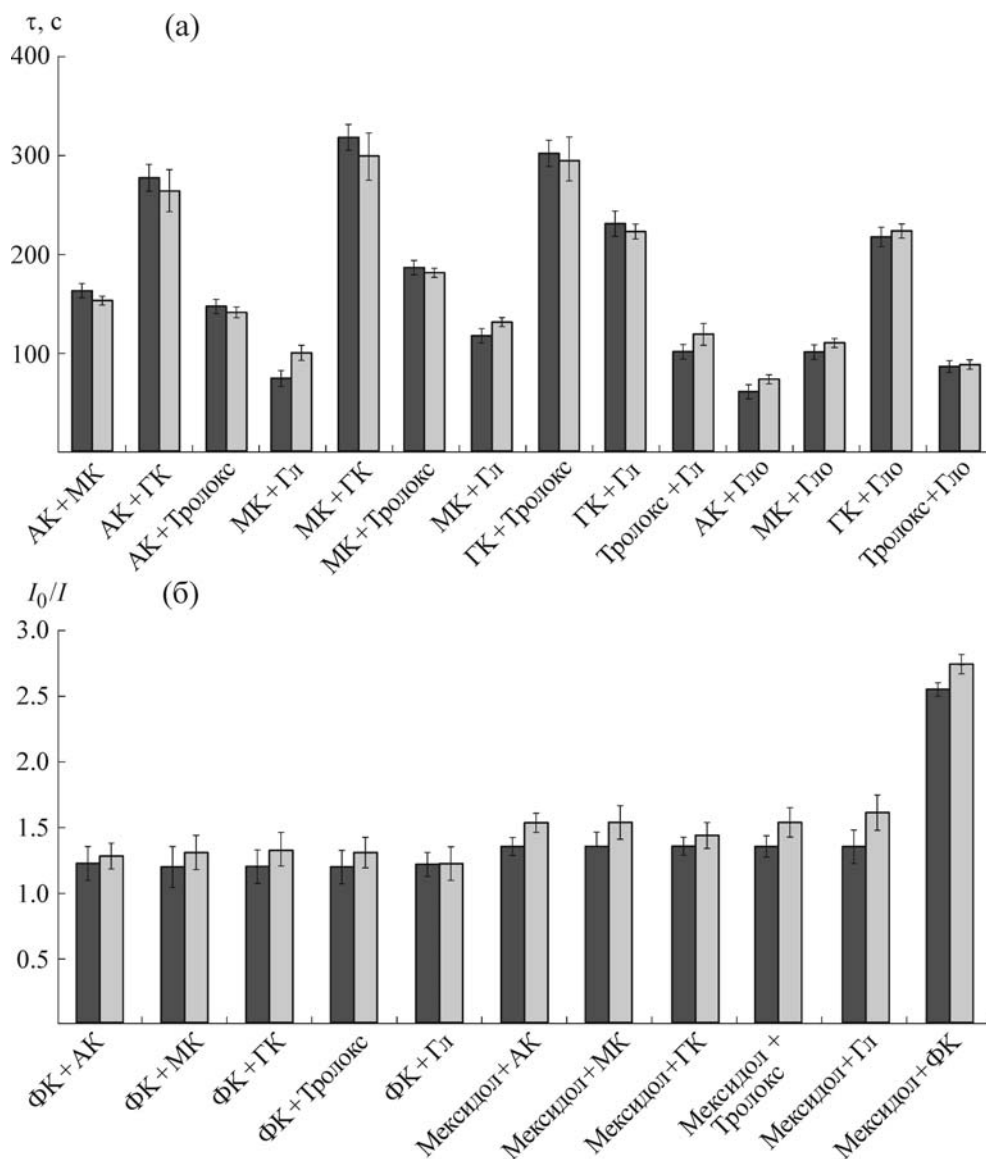


Рис. 5. (а) – Расчетные периоды индукции $\tau_p = \tau_i + \tau_j$ (темные столбики) и экспериментально измеренные τ_i (светлые столбики) при совместном действии различных пар антиоксидантов. Концентрация всех антиоксидантов равна 0,38 мкМ, окисленного глутатиона – 10 мкМ. (б) – Уменьшение максимальной амплитуды ХЛ (I_0/I) бинарными смесями ФК и мексидола с остальными антиоксидантами. Левые столбики – расчет по сумме I_0/I для отдельных антиоксидантов, правые – экспериментально измеренные I_0/I для их смесей. Концентрации ФК и мексидола – 3,8 мкМ, остальных антиоксидантов – 0,38 мкМ.

на ингибирование окисления люминола аскорбиновой кислотой. Результаты, полученные в работе, могут быть использованы в медико-биологических исследованиях для интерпретации результатов измерений антиоксидантной активности биологических объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. G. Bartosz, *Adv. Clin. Chem.* **37**, 219 (2003).
2. V. Roginsky and E. Lissy, *Food Chemistry* **92**, 235 (2005).
3. Е. Б. Бурлакова, Н. М. Сторожок и Н. Г. Храпова, *Биофизика* **33** (4), 584 (1988).
4. G. F. Fedorova, V. A. Menshov, A. V Trofimov, and R. F. Vasil'ev, *Analyst* **134**, 2128 (2009).
5. И. Ф Русина, О. Н. Карпунин и О. Т. Касаикина, *Хим. физика* **32** (8), 1 (2013).
6. P. S. Rao, J. M. Lubner, J. Milonowicz, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**, 39 (1988).
7. E. A. Lissi, M. Salim-Hanna, C. Pascual, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **18** (2), 153 (1995).
8. Ю. О. Теселкин, И. В. Бабенкова, О. Б. Любичкий и др., *Вопр. мед. химии* **43** (2), 87 (1997).

9. E. L. Bastos, P. Romoff, C. R. Eckert, and W. J. Baader, *J. Agric. Food Chem.* **57**, 7481 (2003).
10. И. Н. Попов и Г. Левин, *Биофизика* **58** (5), 848 (2013).
11. I. Popov and G. Lewin, in *Handbook of chemiluminescent methods in oxidative stress assessment*, Ed. by I. Popov and G. Lewin (Transworld Research Network, Kerala, 2008), pp. 361–391.
12. E. Niki, in *Methods in Enzymology*, Ed. by L. Packer and A. N. Glazer (Academic Press, New York, 1990), pp. 100–108.
13. J. T. Uotila, A. L. Kirkkola, M. Rorarius, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **16** (5), 581 (1994).
14. А. В. Алексеев, Е. В. Проскурнина и Ю. А. Владимиров, *Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия* **53** (3), 187 (2012).
15. М. Г. Перевозкина, *Тестирование антиоксидантной активности полифункциональных соединений кинетическими методами* (СибАК, Новосибирск, 2014).
16. Г. В. Карпухина и Н. М. Эммануэль, *Докл. АН СССР* **276** (5), 1163 (1984).
17. A. Puppo and B. Halliwell, *Biochem. J.* **249** (1), 185 (1988).
18. Э. Ш. Якутова, А. Н. Осипов, О. В. Костенко и др., *Биофизика* **37** (6), 1021 (1992).
19. C. Giulivi and K. J. Davies, *J. Biol. Chem.* **265** (32), 19453 (1990).
20. E. A. Lissi, J. Escobar, C. Pascual, et al., *Photochem. Photobiol.* **60** (5), 405 (1994).
21. А. Н. Зайдель, *Погрешности измерений физических величин* (Наука, Москва, 1985).
22. Д. Ю. Измайлов, У. М. Демин и Ю. А. Владимиров, *Фотобиология та експериментальна фотомедицина*, № 2, 70 (2011).
23. Е. А. Менгеле, Д. А. Круговов и О.Т. Касаикина, *Изв. РАН. Сер. химическая*, № 4, 1 (2015).
24. N. N. Sazhina, I. N. Popov, and V. A. Volkov, in *Proc. Intern. scientific-practical conf. of the Eurasian Union scientists* (Evro, Moscow), **14** (4) 165 (2015).
25. S. A. Van Acker, D. J. van Den Berg, M. N. Tromp, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 331 (1996).
26. В. А. Рогинский, *Фенольные антиоксиданты. Реакционная способность и эффективность* (Наука, Москва, 1988).
27. Е. Т. Денисов и Т.Г. Денисова, *Успехи химии* **78** (11), 1129 (2009).
28. R. J. Troy and W. C. Purdy, *Clin. Chim. Acta.* **27**, 401 (1970).
29. K. Schlesier, M. Harwat, V. Bohm, and R. Bitsch, *Free Radic. Res.* **36** (2), 177 (2002).
30. Н. Н. Сажина, *Химия растительного сырья* (4), 71 (2016).

An Inhibitory Effect of Some Bioantioxidants and Their Mixtures in the Hemoglobin–Hydrogen Peroxide–Luminol Chemiluminescent System

N.N. Sazhina

Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

Determination of antioxidant activity in various biological objects: food products, medicinal preparations, beverages, blood plasma and other human biological liquids is an important task for medical-biological researches. Nowadays chemiluminescent methods are widely utilized for this purpose. These methods are sensitive, rapid measure to monitor indirectly the kinetics of oxidation inhibition by antioxidants. In this work we used the chemiluminescent model that describes oxidation of luminol by free radicals in the presence of «hemoglobin-hydrogen peroxide» mixture in aqueous solution. The kinetics of the inhibitory effect of eight water-soluble bioantioxidants with different molecular structures and their binary mixtures was studied. The concentrations of these antioxidants and their stoichiometric coefficients for inhibition of luminol oxidation were determined. Specific features of the kinetics of inhibition when glutathione was used as an inhibitor were found out. Assessment of synergetic and antagonistic effects of antioxidants present in mixtures used is carried out. For the majority of binary mixtures of the antioxidants it was shown that some antioxidants produced independently the quenching effect on chemiluminescence, more «active» antioxidants inhibited oxidation earlier, than less «active» ones. The exception was only mixtures of some antioxidants which at interaction strengthened or weakened each other, showing synergism or antagonism.

Keywords: antioxidant, chemiluminescence, luminol, synergism, antagonism