

ВАЛИДИРОВАННАЯ МЕТОДИКА ДЕТЕКТИРОВАНИЯ КАТИОН-РАДИКАЛА АБТС⁺ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОННО-ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА**П.А.Киселев¹, Н.А.Орешко¹, В.С.Камышников²**

¹Белорусская медицинская академия последипломного образования, ул. П. Бровки, 3, 220013, г. Минск, Беларусь, E-mail: kafdiag@mail.ru

²Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, ул. Купревича, 5/2, г. Минск, Беларусь, E-mail: kiselev@iboch.bas-net.by

Abstract. The technique of detecting ABTS radical cation was consisting. The detecting is based on use of an electro-paramagnetic resonance. It is shown that it has the performance data corresponding regulated, satisfies with the established criterion, and the parameters measured by means of it correspond to the due.

В конце 50-х – начале 60-х годов 20-го столетия D. Harmann в США и Б.Н.Тарусов в России независимо друг от друга высказали предположение о возможности участия свободных радикалов в нарушении процессов обмена веществ и функций организма, приводящих, в частности, к ускорению процесса старения и развития злокачественных новообразований.

Вскоре выяснилось, что дефект в указанном звене метаболизма способен существенно снизить резистентность организма к воздействию на него неблагоприятных факторов внешней и внутренней среды, а также создать предпосылки к формированию, ускоренному развитию и усугублению тяжести течения различных заболеваний.

Состояние свободнорадикального окисления белков и липидов во многом определяется уровнем содержания в органах и тканях антиоксидантов различной природы, или антиоксидантной (антиокислительной) активностью (АОА).

Для определения общей АОА биологических жидкостей применяют несколько модельных систем, различающихся по способу генерации свободных радикалов (СР), по методу их детектирования, по характеру фазы системы (гомогенная или гетерогенная) и сложности интерпретации.

В настоящий период времени на базе ГНУ «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси» под руководством д.х.н П.А.Киселева осуществлены работы по созданию экспериментальных образцов оригинальной тест-системы для экспресс-исследования общей антиокислительной активности биологических жидкостей и фармакологических субстанций.

Для характеристики антиоксидантной активности биологических жидкостей, а также иных синтетических и природных образцов разработана методика детектирования катион-радикала диаммониевой соли 2,2-азино-бис-[3-этилбенз-тиазолин-6-сульфоукислоты] (АБТС⁺) с применением электронно-парамагнитного резонанса (ЭПР).

В настоящее время для определения общей антиоксидантной способности сыворотки крови не существует единого, «золотого» стандарта, -- т.е. метода, способного дать информацию о вкладе в формирование антиокислительной активности всех компонентов антиоксидантной системы. Это обусловлено рядом существенных обстоятельств, к числу которых следует отнести сложность в приготовлении и короткий срок хранения компонентов модельных систем окисления, значительную продолжительность процедуры определения, низкую чувствительность большинства тестов определения антиоксидантов, необходимость располагать дорогостоящим оборудованием, токсичность используемых реактивов [1,2, 3]

Известные методы количественного определения общей антиоксидантной активности сыворотки крови с помощью разрабатываемой тест-системы базируются на реакции антиоксидантов, содержащихся в тестируемой пробе, с предварительно окисленной диам-

мониевой солью 2,2-азино-бис-[3-этилбенз-тиазолин-6-сульфокислоты], обладающей характерным спектром поглощения в видимой области. Эти методы не применимы в случае анализа окрашенных образцов.

Данного недостатка лишен метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), который может быть использован для исследования парамагнитных частиц, к которым относится и катион-радикал АБТС⁺.

В качестве средства измерений нами использован малогабаритный автоматизированный ЭПР спектрометр ESR 70-03 XD/2 производства дочернего предприятия Белорусского государственного университета УП «КБСТ» БГУ (г. Минск).

Перед непосредственным выполнением процедуры оценки антиокислительной активности готовят катион-радикал АБТС и осуществляют его стандартизацию. Образцы препарата получают растворением лиофильно высушенного катион-радикала АБТС в 96-ти % этиловым спирте. Спектр ЭПР представлен на рис.1.

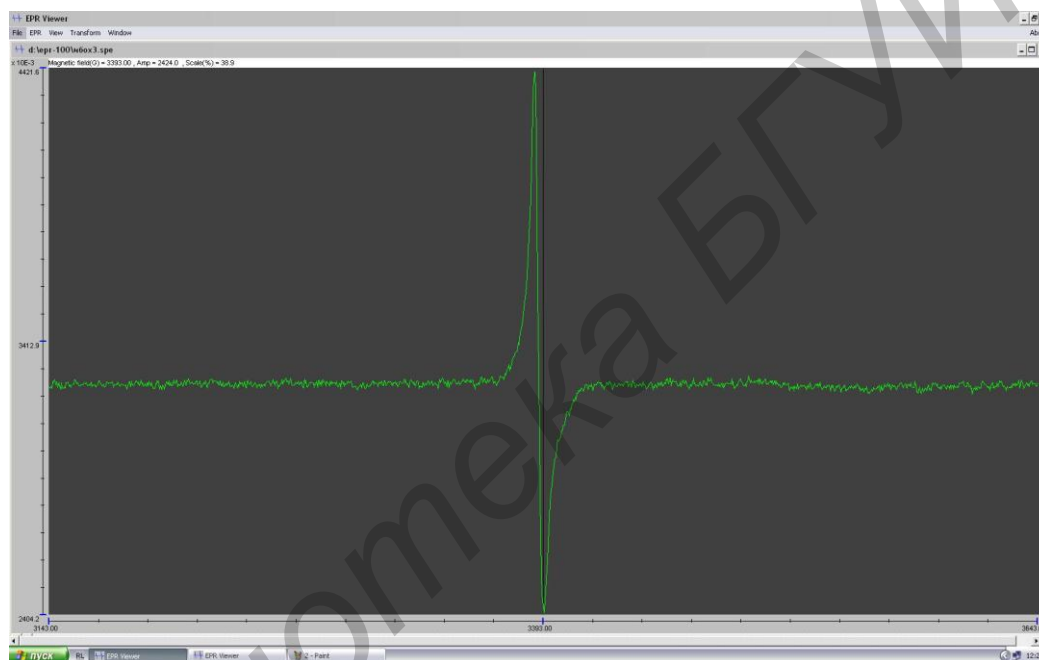


Рисунок 1- ЭПР-спектр АБТС⁺ в концентрации 585 мкмоль/л

Для подтверждения правильности предложенного метода производили сравнение количественного содержания катион-радикала АБТС⁺, определенного методом ЭПР и путем регистрации спектра поглощения на спектрофотометре Specord M-40. Результаты исследования указанными методами представлены в таблице 1 [4].

Таблица 1 - Результаты оценки правильности по данным исследования содержания катион-радикала АБТС с помощью ЭПР и оптической спектроскопии

№ п/п анализируемого образца	ЭПР, мкмоль /л	Оптический спектр, мкмоль/л
1	585,0	575,3
2	412,2	412,5
3	257,5	260,4
4	117,5	119,3

Как следует из представленных в таблице данных, результаты определения содержания катион-радикала АБТС методами электронного парамагнитного резонанса и оптической спектроскопии статистически не различаются, что следует из величины r^2 . т.е. несовпадение результатов составляет $< 10\%$ ($P < 0,05$), что подтверждает правильность предлагаемого метода.

Для проведения испытаний сходимости использовали аликвоты трех различных образцов катион-радикала АБТС. Данные образцы анализировали 10 раз в соответствии с методикой испытаний в условиях повторяемости (1 исследователь, 1 день, одно и то же оборудование). Разбежка в полученных результатах соответствовала заданным производителем эксплуатационным характеристикам ЭПР-спектрометра ESR 70-03 XD/2 и превышала 1% [5].

Для оценки воспроизводимости метода использовали образец катион-радикала АБТС с концентрацией 585 мкмоль/л. Установлено, что при регистрации спектра в стандартных условиях среднее квадратическое отклонение находится в пределах $(\bar{X} \pm 2\sigma)$, что удовлетворяет требованиям точности анализа [6, 7].

Таким образом, результаты выполненных исследований показали, что методика детектирования катион-радикала АБТС с помощью электронно-парамагнитного резонанса имеет рабочие характеристики, соответствующие регламентированным, удовлетворяет установленным критерием, а измеренные с помощью нее параметры соответствуют должным.

При использовании имеющихся в распоряжении лаборатории средств измерения, вспомогательных устройств, материалов и реактивов методика позволяет получить результаты испытаний, удовлетворяющие критериям приемлемости, сходимости, воспроизводимости, линейности, надежности.

Разработанная методика детектирования катион-радикала АБТС⁺ с помощью электронно-парамагнитного резонанса существенно расширяет возможности оценки антиокислительной активности различных объектов, поскольку использование фотометрической детекции АОА ограничивает окрашенность анализируемых жидкостей.

Литература

1. Фархутдинов Р.Р., Лиховских В.А.. Хемилюминесцентные методы исследования свободно-радикального окисления в биологии и медицине. Уфа, 1995, 87.
2. Метелица Д.И., Еремин А.Н., Свиридов Д.О., Камышников В.С. Иницирование и ингибирование радикальных процессов в системах H_2O_2 – метмиоглобин (метгемоглобин) – 2,2-азинобис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфокислота)//Биохимия. – 2001. – Т.66.- №5 – С.628-639
3. Свиридов Д.О., Юрага Т.М., Гуревич Л.Л., Камышников В.С. Антиоксидантный статус больных туберкулезом легких //Актуальные проблемы пульмонологии: Тез. Докл. – III Республиканской научно-практической конференции. – Минск, 2001. – С.51-53.
4. Общие требования к компетентности испытательных лабораторий: СТБ ИСО/МЭК 17025-2007. – Введ. 23.02.07. – Минск: Межгос. Совет по стандартизации, метрологии и сертификации: Беларус. гос. Ин-т стандартизации и сертификации, 2007. – 28с.
5. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерения: СТБ ИСО 5725-2-2002. – Введ. 21.02.02. – Минск: Межгос. Совет по стандартизации, метрологии и сертификации: Беларус. гос. Ин-т стандартизации и сертификации, 2002. – 29 с.
6. Валидация аналитических методик: теория и практика. Часть 1. / Носырев П., Носырева М., Рассказова Т., Н. Корнеева // Ремедиум. – 2003. – №10. – С. 69–71.
7. Валидация аналитических методик: теория и практика. Часть 2. / П. Носырев, М. Носырева, Т. Рассказова, Н. Корнеева // Ремедиум. – 2003. – №12. – С. 65–67.