

ОБЩАЯ И ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 544.431.7:54.328

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ МЕТОДОМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОГЛОЩАЮЩЕЙ ЕМКОСТИ ПО ОТНОШЕНИЮ К КИСЛОРОДЦЕНТРИРОВАННЫМ РАДИКАЛАМ

Յ. Օ. ՄԱՆՈՒԿՅԱՆ, Լ. Ա. ԱՐՄԵՆՅԱՆ և Լ. Ա. ՏԱՎԱԴՅԱՆ

Институт химической физики им. А.Б. Налбандяна НАН Республики Армения
Армения, 0014, Ереван, ул. Паруйра Севака, 5/2
E-mail: tavadyan@ichph.sci.am

Поступило 20 VII 2016

Методом определения поглощающей емкости по отношению к кислородцентрированным радикалам (ORAC) определена антипероксирадикальная емкость многофункционального водорастворимого витамина группы В – фолиевой кислоты. Антипероксирадикальная емкость фолиевой кислоты превышает эту величину для водорастворимого аналога α -токоферола – тролокса, и близка к значению, определенному для бутилированного гидрокситолуола (БНТ). Полученные результаты представляют собой полезную информацию для совершенствования фармакологических форм фолатов.

Рис. 2, табл. 1, библиограф. ссылки 19.

Исследование химического механизма и количественных характеристик антиоксидантного действия фолиевой кислоты является актуальной задачей [1,2]. Антиоксиданты обладают способностью нейтрализовать — «захватывать» свободные радикалы и другие реакционноспособные кислородсодержащие компоненты (РКК). Они способны защитить организм человека от повреждений, вызванных свободными радикалами и от вредного воздействия РКК. Последние в условиях их избыточной генерации вызывают многочисленные патологические состояния так называемого окислительного стресса [3,4]. В последние годы особый интерес привлекает исследование новых антиоксидантов для удовлетво-

рения потребностей фармацевтической, химической и пищевой промышленности [5]. Исследования в этой области часто имеют междисциплинарный характер и включают такие области, как медицина, биология, химия.

Фолиевая кислота (N-[4-(2-амино-1,4-дигидро-4-оксо-6-птеридинил-метиламино) бензоил]-L-глутаминовая кислота) — это водорастворимый витамин группы В (витамин В₉), первоначально идентифицированный как фактор антианемии и роста. Фолиевая кислота в *in vivo* условиях трансформируется посредством ряда ферментативных превращений в кофермент N⁵, N¹⁰-метилен-5,6,7,8-тетрафолат.

Структура фолиевой кислоты (птероилглутаминовая кислота) включает пуриновое и пиазиновое кольца, которые совместно образуют птеридиновое кольцо и две аминокислоты в пиазиновом кольце [6] (рис. 1).

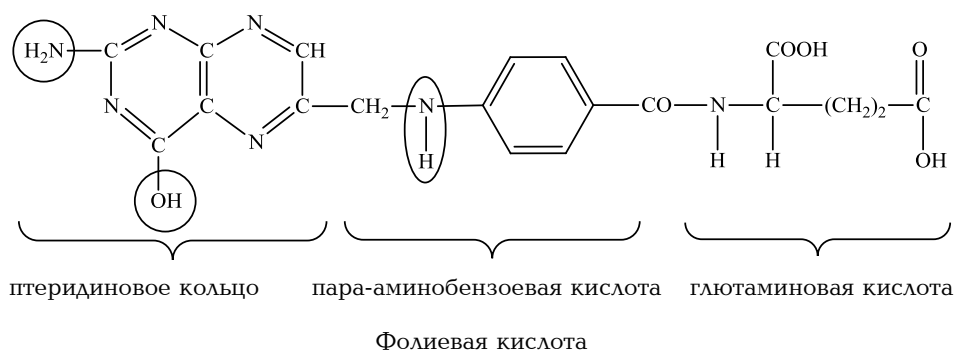


Рис. 1. Структурная формула фолиевой кислоты и ее антирадикальные реакционные центры (отмечены кружками).

В организме фолиевая кислота участвует в биосинтезе белков, моноаминов, нейротранспортеров, в регулировании экспрессии генов, в метаболизме моноаминов и белков [1,2], а также в процессах передачи одноуглеродных групп (метил-, метилен-, метенил-, формимино-) в организме (*in vivo*) и их превращений в нуклеотиды. Фолиевая кислота может выступать в качестве кофермента в важнейших биохимических процессах, связанных с синтезом РНК и ДНК и с репарацией ДНК [7,8].

Установлено также, что дефицит фолиевой кислоты в организме может привести к развитию различных заболеваний, таких, как анемия, сердечные и онкологические заболевания [1,9,10], нервные расстройства [1,2,11], проблемы рождаемости [2,7,8], заболевание Альцгеймера.

В организме фолиевая кислота также ингибирует пероксидное окисление липидов [12]. Она обладает высокой антиоксидантной способностью предотвращать окислительную деструкцию крови человека [13]. По исследованиям авторов [12,14], антирадикальная и антипероксинитритная способности фолиевой кислоты обусловлены присутствием

ароматической аминной группы в птеридиновом кольце молекулы (рис. 1.). Фолиевая кислота — эффективный хелатор. Она хелатирует ионы переходных металлов (например, Fe^{2+}) и вследствие этого ингибирует реакцию Фентона с образованием свободных радикалов и соответственно окислительный стресс в организме [15].

В связи с многофункциональностью действия фолиевой кислоты и наличием различных механизмов проявления ее антиоксидантных свойств актуальной задачей является систематическое исследование ее антиоксидантных свойств. Имеется ограниченная информация об антирадикальных реакционных центрах и количественных характеристиках антиоксидантной способности фолиевой кислоты [6]. Немногочисленны также свидетельства того, что антирадикальная и антиоксидантная способности фолиевой кислоты обусловлены исключительно наличием ароматической аминной группы птеридинового кольца [12]. Антирадикальными и антиоксидантными центрами могут выступать также фенольная/гидроксильная ОН группа птеридинового кольца, NH группа глутаминовой кислоты (рис. 1). Поэтому актуальной задачей являются количественное исследование антирадикальной и антиоксидантной активности фолиевой кислоты, выявление реакционных центров на молекулярном уровне, исследование связи между антиоксидантной способностью и молекулярной структурой.

В настоящей работе поставлена цель исследовать антипероксирадикальную емкость фолиевой кислоты методом ORAC. Напомним, что пероксильные радикалы являются ведущими носителями цепи цепного пероксидного окисления липидов мембран клеток [4]. Эти результаты важны для предсказания антиоксидантных свойств фолиевой кислоты в реакциях пероксидного окисления липидов мембран клеток.

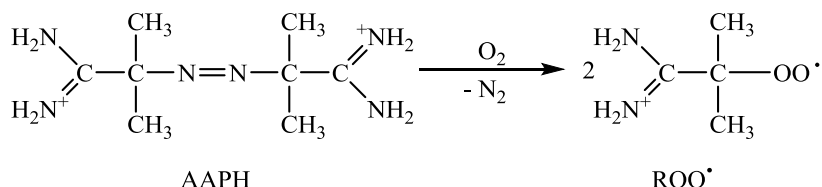
Экспериментальная часть

Материалы и методы. Реактивы: 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан) дигидрохлорид (AAPH); 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота (тролокс); 2,6-ди(третбутил)-4-метилфенол (BHT); N-[4-(2-амино-1,4-дигидро-4-оксо-6-птеридинилметиламино)бензоил]-L-глутаминовая кислота (фолиевая кислота); динатриевая соль флуоресцеина — 3',6'-дигидрокси спиро[изобензофуран-1(3H),9'-[9H]ксантен]-3-она динатриевая соль (Fl); растворители — метанол, фосфатный буффер (pH = 7.4), приобретены в химической компании Sigma-Aldrich (США). Метанол дополнительно очищался согласно методике, описанной в [16]. Была использована деионизированная вода с электрическим сопротивлением 18.2 Мом·см при 25°C.

Метод определения поглощающей емкости по отношению к кислородным радикалам (“Oxygen Radical Absorbption Capacity” ORAC). Метод ORAC

основан на измерении во времени уменьшения интенсивности флуоресценции флуоресцеина (Fl), расходуемого при связывании кислородцентрированных радикалов [17,18]. Антиоксиданты, вводимые в реакционную среду, реагируют с радикалами, генерируемыми путем термического разложения азоинициатора, тем самым замедляя свободно-радикальное расходование флуоресцеина. И по этой характеристике в целом определяется антирадикальная емкость антиоксидантов.

В методе ORAC использовался флуоресцентный спектрометр "Perkin-Elmer" MPF-44B (США) с компьютерной регистрацией кинетики изменения интенсивности флуоресценции Fl в результате реакции с пероксидными радикалами ($RO_2\cdot$). Последние генерировались путем термического разложения водорастворимого азосоединения — AAPH, в присутствии молекулярного кислорода при температуре 37°C согласно схеме.



Длины волн возбуждающего и эмиссионного света равнялись 450 и 515 нм, соответственно. Количественное определение антипероксирадикальной емкости исследуемых соединений осуществлялось по площади между двумя кинетическими кривыми уменьшения интенсивности флуоресценции Fl в отсутствие и в присутствии антиоксидантов в условиях полного расходования Fl. В качестве стандартного антиоксиданта использовался водорастворимый аналог α -токоферола – тролокс. Значение антипероксирадикальной емкости антиоксиданта f_{AO} определялось при температуре $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ согласно уравнению:

$$f_{AO} = \frac{(S_{AO} - S_0)M_{\text{trolox}}}{(S_{\text{trolox}} - S_0)M_{AO}} \times f_{\text{trolox}},$$

где S_0 , S_{AO} и S_{trolox} — площади, ограниченные кинетическими кривыми уменьшения интенсивности флуоресценции в отсутствие и в присутствии исследуемого антиоксиданта и стандартного антиоксиданта — тролокса, соответственно; M_{trolox} , M_{AO} — молярные концентрации тролокса и исследуемого антиоксиданта, соответственно; f_{AO} , f_{trolox} — антипероксирадикальные емкости исследуемого антиоксиданта и тролокса, соответственно, указывающие на количество радикалов захватываемых молекулой антиоксидантов. Антипероксирадикальная емкость относительно тролоксowego эквивалента ($f_{\text{rel TE}}$) равна: $f_{\text{rel TE}} = f_{AO} / f_{\text{trolox}}$.

Интегрирование соответствующих площадей осуществлялось по методу трапеции с помощью компьютерной вычислительной программы Microcal Origin 8.0 [19].

Результаты и их обсуждение

На рис. 2. представлены экспериментальные данные, полученные методом ORAC: кинетические кривые расходования флуоресцеина в результате реакции с пероксильными радикалами в отсутствие и в присутствии антиоксидантов: фолиевая кислота, в качестве сравнения троллокс и ВНТ. Как видно из рис. 2, во всех случаях при добавлении антиоксиданта отчетливо заметен период индукции реакции — время, по истечении которого скорость расходования FI заметно возрастает. При этом скорость расходования FI существенно ниже, по сравнению со случаем, когда отсутствует антиоксидант (кривая 1). Это свидетельствует об антипероксирадикальной способности всех трех исследуемых антиоксидантов, включая фолиевую кислоту.

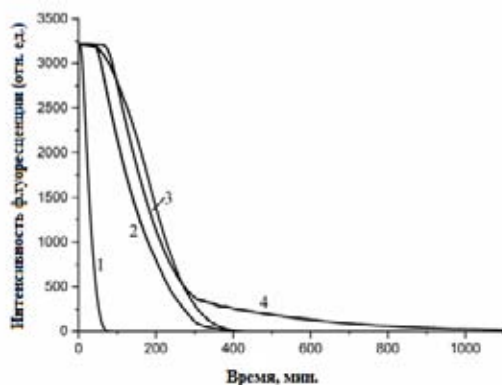


Рис. 2. Кинетические кривые уменьшения интенсивности флуоресценции флуоресцеина (FI) при 515 нм в результате реакции с пероксильными радикалами в отсутствие (1) и в присутствии антиоксидантов: троллокс (2), фолиевая кислота (3), ВНТ (4) при температуре 37 °С. $[AAPH]_0 = 1.53 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, (скорость зарождения $ROO^\cdot$ радикалов составляет $R_i = 2.6 \cdot 10^{-9} \text{ Mc}^{-1}$), концентрация антиоксидантов равна $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $[FI]_0 = 10^{-6} \text{ M}$. Растворитель — деионизированная вода.

Значения экспериментально определенных антипероксирадикальных емкостей антиоксидантов представлены в таблице.

Предполагается, что $f_{\text{троллокс}} = 2$ на том основании, что троллокс захватывает два пероксильных радикала — один исходной формой, а вторым образующимся токофероксильным радикалом.

Согласно полученным данным, $f_{\text{rel TE}}$ для фолиевой кислоты равна 1.31. Как следует из результатов, приведенных на рис. 2 и в таблице, антипероксирадикальная способность фолиевой кислоты, выраженная в данном случае в виде антипероксирадикальной емкости ($f_{\text{rel TE}}$), превышает это значение для троллокса и близка по величине к значению для ВНТ.

**Антипероксирадикальные емкости антиоксидантов,
определенные методом ORAC**

Антиоксидант	* $f_{\text{rel TE}}$	** f_{AO}
фолиевая кислота	1.31	2.62
ВНТ	1.29	2.58
тролокс	1	2

* $f_{\text{rel TE}}$ — антипероксирадикальная емкость относительно тролоксowego эквивалента; ** f_{AO} — абсолютное значение антипероксирадикальной емкости при значении $f_{\text{trolox}} = 2$.

Таким образом, методом ORAC выявлена антипероксирадикальная способность у фолиевой кислоты. Эти исследования показывают, что фолиевая кислота является эффективным "захватчиком" свободных радикалов в водном растворе. Она также может выступать в качестве антиоксидантного регулятора пероксидного окисления липидов мембран клеток, действующих по механизму обрыва кинетических цепей, располагающихся на границе раздела фаз мембрана клетки — вода. Полученные результаты могут быть полезными для дальнейших исследований использования фолиевой кислоты в химиопрофилактике и терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного комитета по науке Министерства образования и науки Республики Армения (Грант 15T-1D351, 2015).

**ՖՈԼԻԱԹԻՎԻ ՆԱԿԱՕՔՍԻԴԻԶ ՆԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԹԹՎԱԾՆԱՅԻՆ ՌԱԴԻԿԱԼՆԵՐԻ
ՆԿԱՏՄԱՄԲ ԿԼԱՆՄԱՆ ՏԱՐՈՂՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՄԱՆ ԵՂԱՆԱԿՈՎ**

Զ. Ն. ՄԱՆՈՒԿՅԱՆ, Լ. Ն. ՆԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ և Լ. Ա. ԹՎԱԴՅԱՆ

Թվովածնային ռադիկալների նկատմամբ կլանման տարողության որոշման եղանակով բացահայտվել է B խմբի բազմաֆունկցիոնալ, ջրալուծ վիտամին ֆոլաթթվի հակապերօքսիռադիկալային տարողությունը: Ֆոլաթթվի հակապերօքսիռադիկալային տարողությունը գերազանցում է այդ մեծությունը α -տոկոֆերոլի ջրալուծ նմանակ տրոլոքսի համար և մոտ է բուտիլացված հիդրօքսիտոլուոլի (BHT) համար որոշված մեծությանը: Ստացված արդյունքները օգտակար տեղեկություններ են ֆոլատների դեղաբանական ձևերի կատարելագործման համար:

INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT PROPERTIES OF FOLIC ACID BY OXYGEN RADICAL ABSORBANCE CAPACITY METHOD

Z. H. MANUKYAN, L. H. HARUTYUNYAN and L. A. TAVADYAN

A.B. Nalbandyan Institute of Chemical Physics NAS RA

5/2, P. Sevak Str., Yerevan, 0014, Armenia

E-mail: tavadyan@ichph.sci.am

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) method was used to detect antiperoxyradical capacity of folic acid multifunctional and water-soluble vitamin of the B group. Studies were carried out in aqueous solution (phosphate buffer 0.1 M, pH=7.4) at temperature 37°C. The values of antiperoxyradical capacities of antioxidants were calculated on the basis of kinetic data of fluoresceine consumption. According to the data given, absolute values of antiperoxyradical capacities (f_{AO}) for the water-soluble analog of α -tocopherol: trolox, butylated hydroxytoluene (BHT) and water-soluble vitamin are: folic acid 2; 2.58 and 2.62, respectively. The antiperoxyradical capacity of folic acid is higher than that of the trolox and close to the value determined for the BHT. Investigation of antioxidant properties of folic acid is urgent for understanding its role in prevention of pathologies of the oxidative stress in body. The results obtained represent useful information to improve pharmacological forms of folates.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Lucock M.* // Mol. Genet. Metab., 2000, v.71, p. 121.
- [2] *Stanger O.* // Curr. Drug Metab., 2002, v.3, №2, p. 211.
- [3] *Halliwel B.* // Ann. Rev. Nutr., 1997, v. 16, p. 33.
- [4] *Tavadyan L.A., Khachoyan A., Martoyan G., Kamal-Eldin A.* // Chem. Phys. Lipids, 2007, v. 147, p. 30.
- [5] *Arouma O.L.* // Free Radic. Biol. Med., 1996, v.20, p.675.
- [6] *Joshi R., Adhikari S., Patro B.S., Chattopadhyay S., Mukherjee T.* // Free Radic. Biol. Med., 2001, v.30, №12, p.1390.
- [7] *Tamura T., Frances M.* // Am. J. Clin. Nutr., 2006, v.83, p.993.
- [8] *Stockstad E.L.R.* in: Folic acid metabolism in health and disease / Picciano MF, Stockstad ELR, Gregory JF editors. New York: Wiley-Liss, Inc., 1990, p. 1.
- [9] *Moens A.L., Champion H.C., Claeys M.J., Tavazzi B., Kaminski P.M., Wolin M.S.* // Circulation, 2008, v.117, p.1810.
- [10] *Choi S.W., Mason J.B.* // J. Nutr., 2000, v.130, p.129.
- [11] *Reynolds E.* // Lancet Neurol., 2006, v.5, p.949.
- [12] *McEneny J., Couston C., McKibben B., Young I.S., Woodside J.V.* // Int. J. Vitam. Nutr. Res., 2007, v.77, №1, p. 66.
- [13] *Stocker P., Lesgards J.F., Vidal N., Chalier F., Prost M.* // Biochim. Biophys. Acta, 2003, v.1621, p. 1.
- [14] *Gliszczyn'ska-S'wiglo A.* // Food Chem., 2007, v. 101, p. 1480.
- [15] *Sarna L.K., Wu N., Wang P., Hwang S.Y., Siow Y.L., Karmin O.* // Can. J. Physiol. Pharmacol., 2012, v.90, p.155.
- [16] *Гордон А., Форд Р.* Спутник химика. М., Мир, 1976, 514 с.
- [17] *Roginsky V., Lissi E.A.* // Food Chem., 2005, v. 92, p.235.
- [18] *Тавадян Л.А., Саакян А.Д., Арутюнян Л.А., Тоникян А.К., Манукян З.О.* // Изв. Акад. наук РФ, сер. хим., 2013, т.7, 1586с.
- [19] <http://www.originlab.com/>