

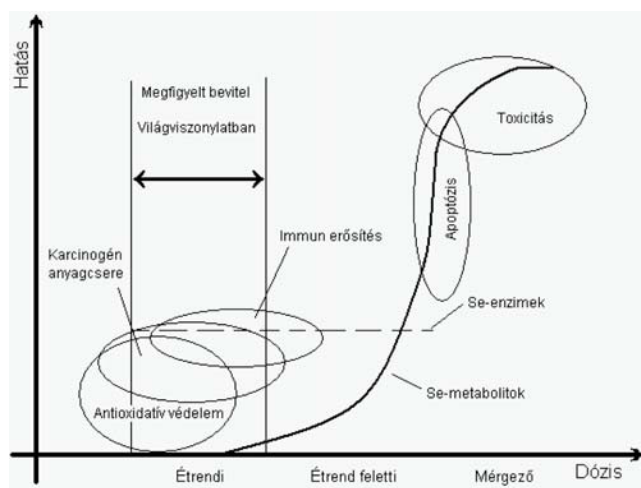
Néhány szelénvegyület viselkedése standard antioxidáns tesztekben

BORS István, KAIZER József, PAP József Sándor és SPEIER Gábor*

Pannon Egyetem, Szerves Kémia Intézeti Tanszék, Egyetem u. 10., 8200 Veszprém

1. Bevezetés

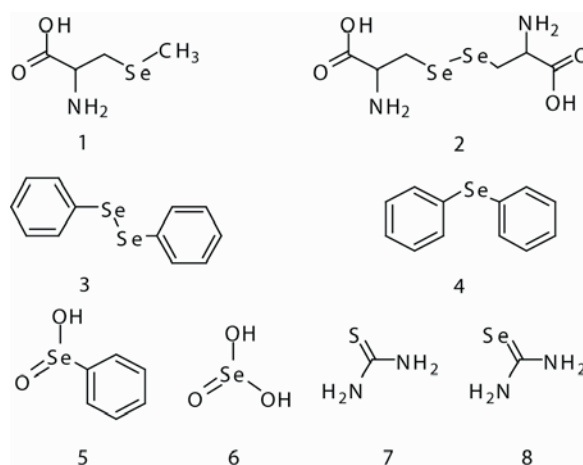
Az antioxidánsok jelentős szerepet játszanak a szervezetben termelődő reaktív oxigén és nitrogénszármazékok (ROS, RNS) okozta károsodások mérséklésében és az antioxidáns enzimek által is kontrollált redoxi folyamatok szabályozásában.¹ Az elmúlt majd két évtizedben az érdeklődés – ha a témában közölt cikkek számát tekintjük – az antioxidánsok standardizált, kvantitatív vizsgálatának módszerei iránt töretlenül nőtt. Viszonylag hosszú idő elteltével sem találtak még tökéletes módszereket az antioxidatív kapacitás meghatározására, akár növényi extraktumokat, akár egyedi vegyületeket vizsgáltak. Ez nem is meglepő, ha az antioxidáns hatású vegyületek hatásmechanizmusának sokszínűségét tekintjük. A tisztánlátást ezen felül az a járulékos ok is nehezíti, hogy enzimatisz antioxidánsok (tehát antioxidatív hatású enzimek) esszenciális építőelemeinek tápanyaggal történő felvétele is – biológiai megközelítésben végső soron – antioxidatív hatást vált ki. A vonatkozó irodalom¹⁻⁹ áttekintése után megállapítottuk, hogy a standardizált módszereket eddig hiányosan alkalmazták szerves szelén-származékok körében.



1. Ábra. Szelénvegyületek dóziszfüggő élettani hatásai.²

Az régóta ismert, hogy a szelén több létfontosságú enzimszálád alkotórésze, és ezek közül a glutation-peroxidáz enzimben (GPx) kimondottan, mint az antioxidatív hatásért felelős prosztetikus csoport egyik része van jelen. Újabb kutatások rávilágítottak arra is, hogy a szelénnek a GPx enzim telítésén túl is van egyfajta kedvező, rákmegelőző hatása.^{2,3,4,5} További vita tárgyát képezi annak eldöntése is, hogy az egyedi szelénvegyületek, valamint azok átalakított termékei a szervezetben – oxidációs állapotuktól és a bevitt

dózistól függően – pro- vagy antioxidáns hatással bírnak. A feltételezések szerint prooxidánsként apoptózist indukálnak a rákos sejtekben, antioxidánsként pedig az oxidatív stressz ellen védenek^{2,6} (1. Ábra). Klinikai vizsgálatokkal azonban az állításokat alátámasztani csak hosszadalmas kísérletek után lehet a szelénvegyületek mérgező mivolta miatt. Egyes növény és gombafajok kivonatait vizsgálva bizonyították, hogy a szelén-gazdag táptalaj jelentősen növeli az extraktum gyökfogó képességét.^{7,8} Vizsgálatok támasztják továbbá alá, hogy egyedi szelénvegyületek is fejtenek ki antioxidáns hatást. E vizsgálatoknál jellemzően nem standardizált módszereket alkalmaztak.⁹⁻¹¹ A standardizált módszereknek viszont azért van nagy jelentősége, mert segítségükkel olyan adatbázisokat lehet létrehozni, melyekből könnyedén kiválogathatóak azon termékek, melyek táplálék-kiegészítőként hozzájárulnak az alacsony antioxidáns-szinttel kapcsolatos betegségek megelőzéséhez.



2. Ábra. A vizsgálatra kiválasztott szelénvegyületek.

Ezen felül új (jelen esetben szeléntartalmú) táplálék-kiegészítők esetén csak a valóban releváns standard módszerek segítségével nyílhat mód antioxidáns tulajdonságaik meghatározására és összehasonlítására.

A 2. Ábrán láthatjuk a méréseinknél felhasznált származékokat, nevezetesen a Se-metil-seleno-ciszteint, szelenociszteint, difenil-diszelenidet, difenil-szelenidet, fenil-szelenessavat, szelenessavat, tiokarbamidot és a szelenokarbamidot. (A tiokarbamid létjogosultságát lásd a 3.2. fejezetben). A vegyületek kiválasztásánál diverzitásra törekedtünk mind szerkezetükben, mind oxidációs állapotunkban és csupán arra kerestünk választ, hogy a fenti vegyületek antioxidáns hatása mérhető-e az irodalomban

*Tel.: +36 88 624720; fax: +36 88 624469; e-mail: speier@almos.uni-pannon.hu

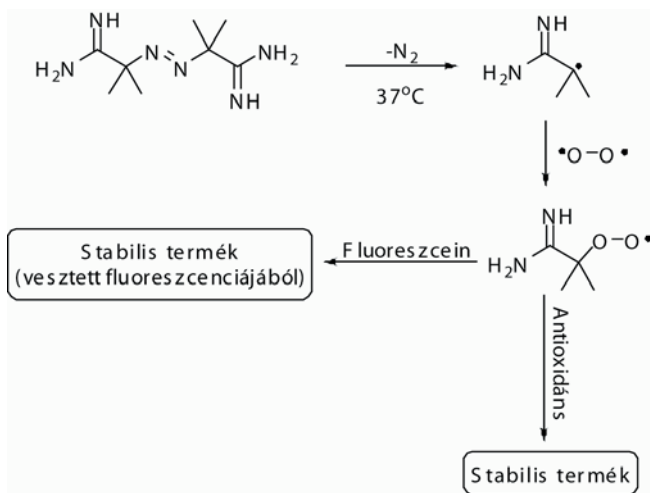
fellelhető standardizált módszerekkel, illetve, hogy a kapott eredmények korrelálnak-e egymással. A vegyületek biológiai relevanciáját nem vettük figyelembe, ugyanis azok e tesztekkel való mérhetősége volt a kérdés.

2. Az alkalmazott módszerek antioxidáns hatás vizsgálatára

Három, alapelvben különböző standardizált módszert választottunk a 2. ábrán szereplő szelénvegyületek vizsgálatára. E módszerekkel – azok megalkotói szerint –, a reakciómechanizmus pontos ismerete nélkül is kapunk információt a vizsgált vegyületek antioxidáns hatásáról.

2.1. Az ORAC (Oxigén gyök megkötési képesség) módszere

Az ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) módszer alapelvét Cao és munkatársai szabadalmaztatták, majd Ou és munkatársai¹² fejlesztették tovább. Lényege a következő: egy azovegyületből, a 2,2'-azo-bis(2-amidino-propán)-dihidrokloridból (AAPH) a levegő dioxidigénje segítségével peroxigyököt generálunk, mely lumino-méterben vizsgált fluoreszcenciával (FL) reakcióba lép, elbontván azt csökkenti annak emisszióját, a mért hullámhosszon (3. Ábra). A reakcióelegybe antioxidánst juttatva, koncentrációjának megfelelően különböző mértékű degradáció-gátlás lesz tapasztalható.



3. Ábra. Az AAPH reakciója az ORAC módszer alapján.

A továbbiakban az összehasonlíthatóság kedvéért standard hígítási sort alkalmazunk egy kiválasztott gyakori antioxidánsból majd ehhez viszonyítjuk a vizsgált mintákat. A referencia antioxidáns az E-vitamin vízzoldható analógja, a trolox (6-hidrox-2,5,7,8-tetrametil-kromán-2-karbonsav). Az időben csökkenő intenzitás egy pontsót jelöl ki, melyet a percenként rögzített emisszió értékekből kapunk. A relatív ORAC értékeket az e pontsót által kijelölt görbe alatti területek (AUC) integrálásával lehet számítani. A numerikus integráláshoz használt formula (1),

$$\text{AUC} = 1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + \dots + f_{55}/f_0 \quad (1)$$

ahol f_n az 55 percig tartó mérés során adott percben mért fluoreszcencia. Először a vak – tehát antioxidáns nélküli, csak FL-t és AAPH-t tartalmazó – elegyet mérjük pH = 7,4 puffertelt acetón-víz elegyben oldva, majd a hígítási sornak

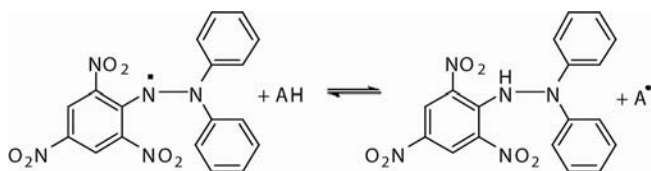
megfelelően a mintákat. Az adott koncentrációjú minta és a vak próba különbsége fogja adni a netAUC -t. Vagyis:

$$\text{netAUC}_{\text{minta}} = \text{AUC}_{\text{minta}} - \text{AUC}_{\text{vak}} \quad (2)$$

Az adott koncentrációjú minta és a vak közötti terület és a mintaközpont között lineáris összefüggés áll fenn. A kapott pontokra illesztett egyenesek meredekségét kell az ugyanilyen módon megmért troloxra kapott meredekséggel összehasonlítani.

2.2. A DPPH• módszer

Brand-Williams¹³ eredményeire alapul véve Sánchez-Moreno¹⁴ alkalmazta elsőként, mint standard módszert. A 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH•) az egyik legstabilisabb, szerves N-centrumú gyök. Stabilitása miatt nem a reakcióelegyben kell előállítani, mint az előbbi módszer esetén az AAPH-t. A DPPH• vizsgálat redukáló képességére alapoz, melyből következtetni lehet a gyökkel reagáltatott anyag antioxidáns kapacitására (AOC - antioxidant capacity) (4. Ábra).



4. Ábra. A DPPH• módszer alapreakciója.

A reakció lefolyását UV-Vis spektrofotometriás módszerrel lehet követni. Az adott hullámhosszon intenzív elnyelést mutató szerves gyök abszorbancia csökkenésének mértékéből lehet a gyökfogó képességre következtetni. Az antioxidáns hatás a lejátszódott reakció után maradó DPPH• koncentráció meghatározásán alapul, melyet a (3) képlettel lehet kiszámítani.

$$\% \text{DPPH}^{\bullet}_{\text{maradó}} = 100 \cdot \frac{[\text{DPPH}^{\bullet}_{\text{maradó}}]}{[\text{DPPH}^{\bullet}_{t=0}]} \quad (3)$$

A fenti százalékérték arányos az antioxidáns koncentrációjával. Számítható EC_{50} -érték is, mely a kezdeti DPPH• mennyiségének megfelelő részéhez szükséges antioxidáns koncentráció. A visszamaradó DPPH• a (4) modell egyenletet követi:

$$\ln [\text{DPPH}^{\bullet}_{\text{maradó}}] = b \ln idő + \ln a \quad (4)$$

Minél meredekebb a fenti egyenlettel kapott egyenes, annál kevesebb antioxidáns szükséges a DPPH• 50%-ának elfogyasztásához. EC_{50} azonban csak egy statikus mérőszám, mert független az időtől. A képletből az is látszik, hogy EC_{50} csak a reakció sztöchiometriájára utal, viszont tudjuk, hogy egy antioxidáns hatékonyságát a reakciósebesség is befolyásolhatja, ezért szükség van egy dinamikus mérőszámra is. Sánchez-Moreno és munkatársai¹⁴ ezt $T_{\text{EC}_{50}}$ -el jelezték, mely az egyensúlyi állapot eléréséhez szükséges időt jelenti. Ez az az időtartam, amely az EC_{50} -koncentrációjú alkalmazott antioxidáns esetében a reakcióegyensúlyi állapot eléréséhez szükséges. Ennek megfelelően a szerző három kvalitatív besorolási kategóriát állított fel az antioxidánsoknak: <5 perc (gyors), 5-30 perc (közepes), >30 perc (lassú). Szintén Sánchez-Moreno és munkatársai¹⁴ vezettek be később egy újabb paramétert az

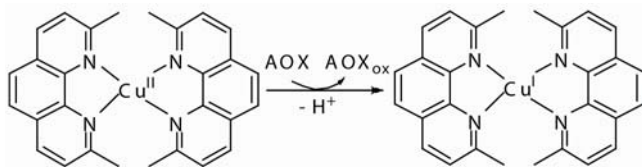
antioxidáns-kapacitásra, melyet gyökfogó képességnek (AE - antiradical efficiency) neveztek el. Ebben megjelenik mind a statikus EC_{50} mind a dinamikus jelzőszám is. AE-t az (5) egyenlet szerint definiálták:

$$AE = \frac{1}{EC_{50} \cdot T_{EC_{50}}} \quad (5)$$

Erre is alkalmaztak kvalitatív mérőszámokat: $AE \leq 10^{-3}$ alacsony; $10^{-3} < AE \leq 5 \times 10^{-3}$ közepes; $5 \times 10^{-3} < AE \leq 10^{-2}$ magas; $AE > 10^{-2}$ nagyon magas.^{13,14} Ezenkívül az EC_{50} troloxhoz viszonyított értékével is számoltunk.

2.3. A CUPRAC módszer

A módszer neve angol rövidítéséből (cupric ion reducing antioxidant capacity) ered és Reşat Apak és munkatársai¹⁶ dolgozták ki és alkalmazták elsőként 2004-ben. A teszt bisz(2,9-dimetil-1,10-fenantrolin)-réz(II)-t alkalmaz alapvegyületként. A központi ion redukciójával vörösbarna komplex képződik, melynek keletkezését UV-Vis spektroszkópián követhetjük (5. Ábra).



5. Ábra. A CUPRAC vizsgálat alapreakciója.

Minél nagyobb egy vegyület vizsgált antioxidáns hatása adott koncentrációnál, annál nagyobb lesz a képződő réz(I)-komplex abszorbanciája a mért hullámhosszon és így a hígítási sorra felvett pontok alapján kijelölt egyenes is meredekebb lesz. A felvett egyenesek meredekségét itt is a troloxra felvett egyenes meredekségéhez viszonyítjuk.

3. Vizsgálati eredmények

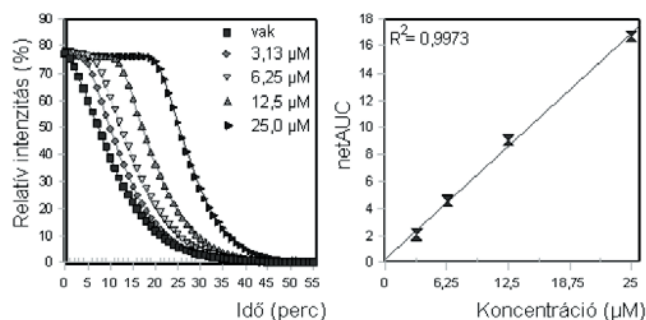
A vizsgált vegyületek közül az ORAC vizsgálat esetében a szelenocisztin (2), difenil-diszelenid (3), difenil-szelenid (4) és szelenokarbamid (8) adott pozitív eredményt. Metil-szeleno-cisztein (1) a mérésekkor még nem állt rendelkezésre. A DPPH• -tesztnél csak 8 bizonyult gyökfogónak, a többi vegyület nem mutatott aktivitást. A CUPRAC módszernél az 5 és 6 kivételével mindegyik vegyület mérhető antioxidáns hatást mutatott.

3.1. Az ORAC módszerrel kapott eredmények

A 6. ábrán a referenciaként használt troloxal szemben mért kemolumineszcencia lefutásokat lehet látni, mely jó egyezést mutat az irodalmi adatokkal. A pozitív ORAC eredményt adó minták esetében egy, az 55 perces időlimitbe már bele nem férő nagyobb koncentrációval is végrehajtottuk a mérést – így állítván be a határkoncentrációkat. 8 kivételével mindenhol a szokványos irodalmi lefutást tapasztaltuk.

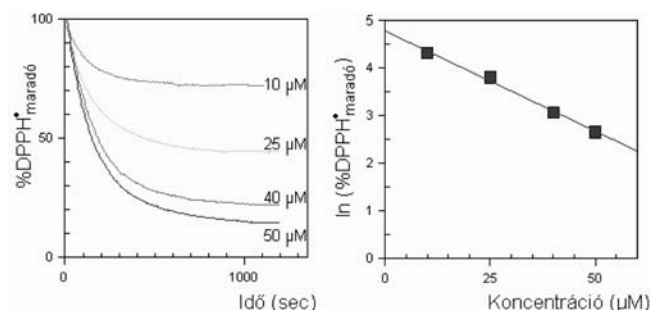
3.2. A DPPH• vizsgálat eredményei

Mivel csak a 8 vegyület reagált DPPH• -vel, a tioanalógját is megvizsgáltuk, hogy legyen mivel összehasonlítani a kapott eredményt. A 8 vegyület esetében az irodalomból



6. Ábra. Trolox viselkedése AAPH-val szemben.

megszokott lefutású görbét kaptunk. A DPPH• -koncentráció egy ideig csökken, majd egy jól kivethető határértékhez tart. Az idő, amíg beáll az egyensúly, egyre több a növekvő koncentrációval, de az összefüggés láthatóan nem lineáris. A maradék gyök és a bevitt szelenokarbamid koncentráció között az irodalom¹³ által leírt logaritmikus összefüggés volt tapasztalható (4. egyenlet).



7. Ábra. Szelenokarbamid viselkedése DPPH• -val szemben.

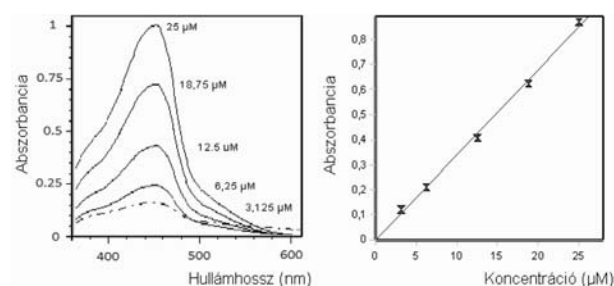
A 8 vegyülettel azonos koncentrációt alkalmazva nem tapasztaltunk változást, ezért jóval nagyobb mennyiséget mértünk be a 7 vegyületből, amit annak kiváló oldhatósága tett lehetővé. (1. Táblázat)

1. Táblázat. A DPPH• vizsgálat eredményei.

Vegyület	EC_{50} (g/kgDPPH•)	$T_{EC_{50}}$ (perc)	AE ($\times 10^{-3}$)	Besorolás
7	2545	39,4	0,01	alacsony
8	64,4	8,1	1,92	közepes

3.3. A CUPRAC módszer eredményei

Ennél a mérési módszerrel az irodalmi leíratot¹⁰ annyiban kellett kiegészítenünk, hogy az 1, 3, 4 vegyületek esetén



8. Ábra. CUPRAC vizsgálatra alkalmazott trolox hígítási sor.

tízszertöményebb oldattal hajtottuk végre a mérést. Ezzel a mérőhatár is egy nagyságrenddel kitolódott. A vegyületek nagy része így mérhetővé vált. (2. táblázat)

4. Az eredmények értékelése

Az összefoglaló 2. táblázatból látható, hogy az egyes, különböző módszerrel kapott mérési eredmények egymással nem egyeznek meg. A 7 vegyület hozzávetőleg 50-szer volt aktívabb a CUPRAC módszerrel mérve, mint a DPPH• módszerrel. A 8 vegyület ORAC módszerrel a két lépcsős lefutás miatt nem volt kiértékelhető. Igaz ez 3 és 4 vegyület esetében is, ahol az ORAC és CUPRAC módszerek között nagyjából 30-szoros eltérést tapasztaltunk. Ennek ellenére érdemes figyelni arra, hogy a 4 vegyülethez képest sztöchiometriailag kétszeres szeléntartalmú 3, mind az ORAC mind a CUPRAC módszernél megközelítőleg kétszeres trolox ekvivalens értéket mutatott. Ez lehet a véletlen műve is, de véleményünk szerint a kapott eredményeket – és azt a tényt, hogy a Se-Se kötést tartalmazó 2 trolox ekvivalens értéke jóval közelebb van a másik ugyanilyen kötést tartalmazó vegyülethez – figyelembe véve, egy kimondottan a sztöchiometriai arányokra épülő kísérletsorozat felállítása is indokolt lehet.

2. Táblázat. A vizsgált vegyületek eredményeinek összefoglalása trolox-ekvivalensben.

Vegyület	ORAC	CUPRAC	*DPPH•
1	–	0,032	0
2	0,777	0	0
3	0,862	0,027	0
4	0,411	0,014	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	–	2,402	0,042
8	+	1,092	1,672
trolox	1	1	1

+ : pozitív, de mérhetetlen - : nem meghatározható *EC₅₀-ból meghatározva
0 : zéró AOC – : nem állt rendelkezésre

A 2. táblázatból kitűnik, hogy egyértelmű következtetések levonására egy módszer alkalmazása nem elégséges. Az eltérő mechanizmusok miatt rendre más és más eredményeket kapunk és ez individuális vegyületek esetén még sarkítottabban jelentkezik.¹⁵ ORAC módszer esetében nem, de a másik két protokollnál lehetőség adódott – az antioxidáns koncentrációk felől és a technikai kivitelezésen belül – a mérőhatárok kitolására. A DPPH• módszernél a mérőhatár extrém kitolása (a szokványosnál két nagyságrenddel kisebb AE érték) a tiokarbamid kiváló oldhatósága miatt sikerülhetett.

Összefoglalásként megállapíthatjuk, hogy a vizsgált szelénvegyületek jó része mérhető volt a három bemutatott módszer valamelyikével, leszámítva a +4-es oxidációs fokú szelént tartalmazó 5 és 6 vegyületeket. Ennek ellenére az egyes módszerek között nagyságrendbeli eltérések is jelentkeztek, ezért az egyedi vegyületek antioxidáns hatásának összehasonlítása ezekkel a standardizált módszerekkel is nehézkes és indokolatlan.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozunk az anyagi támogatásért az (OTKA K67871, OTKA K75783 és OTKA PD75360)-nak, a TÉT-nek, a COST-nak.

Hivatkozások

1. Sohal R.S. *Free Radical Biology & Medicine*, **2002**, 33, 573–574.
2. Spallholz J.E. *The Bulletin of Selenium-Tellurium Development Association*, **2001**.
3. Shamberger R.J. *Journal of the National Cancer Institute*, **1970**, 47, 931–936.
4. Shapiro J. R. *Annals of the New York Academy of Science*, **1972**, 192, 215–219.
5. Devillanova F. Ed. *Handbook of Chalcogen Chemistry – New Perspectives in Sulfur, Selenium and Tellurium*. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, **2007**; Vol. 1, pp 700–701.
6. Drake E.N. *Medical Hypotheses*, **2006**, 67, 318–322.
7. Turlo J.; Gutkowska B.; Herold F. *Food and Chemical Toxicology*, **2010**, 48, 1085–1091.
8. Xia Y, Hill KE, Byrne DW, Xu J, Burk RF. *American Journal of Clinical Nutrition*, **2005**, 81, 4, 829–34.
9. Mughesh G.; Panda A.; Singh H.B.; Puneekar N.S and Butcher R.J. *Journal of the American Chemical Society*, **2001**, 123, 839–850.
10. Takahashi H. et. al. *Life Sciences* **2005**, 76, 2185–2192.
11. Luchese C.; Stangherlin E.C.; Gay B.M. and Nogueira C.W. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2009**, 72, 248–254.
12. Ou B. and Hampsch-Woodill M. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49, 4619–4626.
13. Brand-Williams W.; Bondet V.; Berset C. *Lebensmittelwissenschaft & Technologie*, **1997**, 30, 609–615.
14. Sánchez-Moreno C., Larrauri J. A., Saura-Calixto F. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1998**, 76, 270–276.
15. Zulueta A.; Esteve M.J. and Frigola A. *Food Chemistry*, **2009**, 114, 310–316.
16. Özyürek M.; Bektaşoğlu B.; Güllü K.; Güngör N. and Apak R. *Analytica Chimica Acta*, **2008**, 630, 28–39.

Measuring the antioxidative capacity of some selenium compound with standard methods

Antioxidant compounds play an important role as a health-protecting factor. In this article we have introduced three worldwide-used assays to measure antioxidant capacity (AOC) of selenium compounds. Selenium is incorporated into the enzyme called glutathione peroxidase (GPx). This vital enzyme protects cell membranes against undesirable reactions with soluble peroxides. Limited data are available on the AOC of this kind of selenium compounds. The antioxidant capacity

of selenium compounds were measured by three different analytical methods: 1.) oxygen radical absorbance capacity (ORAC), 2.) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) assay and 3.) cupric ion reducing antioxidant capacity assay (CUPRAC). It can be concluded that the best method to evaluate selenium

compound's AOC is the CUPRAC assay. Among the compounds selenourea was the strongest reductant in CUPRAC assay. In addition, selenourea had an effective DPPH• scavenging activity and positive but immeasurable ORAC activity, too. The comparison of results obtained by the various methods seems to be very difficult.