

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

На правах рукописи

Иванова Алла Владимировна

**ПОТЕНЦИОМЕТРИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ АНТИОКСИДАНТНЫХ И
АНТИРАДИКАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ВЕЩЕСТВ**

02.00.02 – Аналитическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени доктора химических наук

Научный консультант:
доктор химических наук, профессор
Брайнина Хьена Залмановна

Екатеринбург – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	21
1.1 Активированные кислородные метаболиты и их роль в жизнедеятельности организма.....	21
1.2 Система защиты организма от избытка АКМ	27
1.3 Подходы к исследованию антиоксидантных свойств веществ	38
1.3.1 Оценка интегральных антиоксидантных параметров, основанная на реакции с переносом электрона.....	41
1.3.2 Оценка интегральных антиоксидантных параметров, основанная на реакции с переносом атома водорода	56
1.3.3 Оценка интегральных антиоксидантных параметров, основанная на реакции образования комплексов	72
1.4 Вопросы, касающиеся терминологии и единиц измерения антиоксидантных свойств	82
1.5 Сравнение результатов исследования антиоксидантных свойств различными методами	86
1.6 Перспективы развития способов исследования антиоксидантных свойств.....	92
ГЛАВА 2 АППАРАТУРА И ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТА	97
2.1 Оборудование и средства измерений.....	97
2.1.1 Оборудование для проведения электрохимических исследований.....	97
2.1.2 Оборудование для проведения спектроскопических измерений.....	98
2.1.3 Другое вспомогательное оборудование	98
2.2 Реактивы и приготовление растворов.....	100
2.3 Объекты исследования	101

2.4 Методики эксперимента.....	116
2.4.1 Определения АОА методом фотохемилюминесценции.....	116
2.4.2 Хемилюминесцентный метод определения сверхслабого свечения продуктов ПОЛ	118
2.4.3 Метод определения общего антиоксидантного статуса (Total Antioxidant Status (TAS)).	118
2.4.4 Метод определения гематокрита.....	119
2.4.5 Определение противорадикальной активности колориметрическим методом с использованием радикала DPPH.....	120
2.4.6 Определение общего содержания полифенолов колориметрическим методом с использованием реактива Фолина–Чокальтеу	122
2.4.7 Статистическая обработка результатов.....	123
2.4.8 Оценка предела обнаружения потенциометрического способа	124
ГЛАВА 3 ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕГРАЛЬНОГО ПАРАМЕТРА АОЕ, ОСНОВАННОГО НА РЕАКЦИИ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА.	125
3.1 Потенциометрия в оценке АОЕ индивидуальных соединений и интегральной величины АОЕ, теоретические подходы.....	125
3.2 Обоснование и выбор рабочих условий проведения измерений АОЕ	141
3.2.1 Выбор материала рабочего электрода при определении АОЕ.....	141
3.2.2 Выбор раствора фонового электролита при определении АОЕ	145
3.2.3 Выбор рабочих концентраций компонентов системы и степени разбавления анализируемых образцов при определении АОЕ.....	147
3.3 Исследование взаимодействия водорастворимых модельных АО природного происхождения с выбранным окислителем	149
3.3.1 Определение стехиометрических коэффициентов реакции АО с гексацианоферратом (III) калия.....	149
3.3.2 Оценка точности, правильности и предела обнаружения АОЕ.....	153

3.3.3 Изучение кинетических параметров реакции АО с гексацианоферратом (Ш) калия	154
3.4 Исследование взаимодействия жирорастворимых модельных АО природного происхождения с выбранным окислителем на примере α -токоферола	159
3.4.1 Исследование возможности переноса электрона в гетерогенной системе (эмульсии органическая фаза/водная фаза).....	159
3.4.2 Определение антиоксидантной емкости α -токоферола в мицеллярной системе, полученной путем замены растворителя	161
3.5 Оценка влияния хелатирующей способности АО на определение АОЕ .	165
ГЛАВА 4 ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕГРАЛЬНОГО ПАРАМЕТРА АРЕ, ОСНОВАННОГО НА РЕАКЦИИ ПЕРЕНОСА АТОМА ВОДОРОДА	171
4.1 Исследование кинетики генерирования свободных радикалов потенциометрическим методом.....	173
4.1.1 Выбор акцептора радикалов	175
4.1.2 Исследование кинетики генерирования пероксильных радикалов с использованием $K_4[Fe(CN)_6]$	181
4.2 Потенциометрическое определение антирадикальной емкости.....	193
4.2.1 Исследование закономерности изменения окислительно-восстановительного потенциала в процессах генерирования радикалов и ингибирования их антиоксидантами	196
4.2.2 Исследование и выбор условий для определения АРЕ.....	199
4.2.3 Определение периода индукции	203
4.2.4 Определение АРЕ модельных антиоксидантов	206
4.2.5 Оценка предела обнаружения АРЕ	210
ГЛАВА 5 ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ И АНТИРАДИКАЛЬНОЙ ЕМКОСТИ РЕАЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ	212

5.1	Определение АОЕ природных окси- и бензо- производных кумаринов .	212
5.2	Интегральная оценка АОЕ пищевых продуктов	215
5.2.1	Определение АОЕ алкогольных продуктов	216
5.2.2	Определение АОЕ фруктов и овощей.....	222
5.3	Определение АОЕ и АРЕ экстрактов растительного сырья.....	227
5.3.1	Определение АОЕ и АРЕ чая.....	227
5.3.2	определение АОЕ и АРЕ экстрактов лекарственных трав	230
5.4	Определение АОЕ биологических объектов	247
5.4.1	Определение АОЕ раствора, моделирующего состав плазмы крови	247
5.4.2	Выбор рабочих концентраций компонентов системы и степени разбавления анализируемых образцов при определении АОЕ биологических объектов	248
5.4.3	Исследование и выбор способа антикоагуляции цельной крови и гемолиза эритроцитов.....	252
5.4.4	Определение АОЕ образцов крови и ее фракций и оценка достоверности полученных результатов	255
5.4.5	Определение АОЕ биологических образцов в процессе процедуры гемодиализа	259
5.5	Определение АОЕ и АРЕ витаминных препаратов.....	262
5.6	Определение АОЕ растворов для офтальмологического применения....	263
5.7	Определение АОЕ и АРЕ синтезированных соединений	268
5.7.1	Определение АОЕ производных пирогаллола, пирокатехина и гидрохинона.....	268
5.7.2	Определение АОЕ и АРЕ синтезированных аддуктов азолазинов с фенольными фрагментами	272
5.8	Антиоксиданты и механизмы химических превращений.....	282
5.9	Определение метрологических характеристик потенциометрических способов определения антиоксидантной и антирадикальной емкости.....	283

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	290
СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ	296
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	299
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	346
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	348
ПРИЛОЖЕНИЕ 3	350

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Процессы жизнедеятельности организма неразрывно связаны с образованием активных кислородных метаболитов (АКМ) радикальной и нерадикальной природы, являющихся промежуточными продуктами реакции четырех-электронного восстановления кислорода до воды. АКМ вовлекаются в два глобальных типа процессов: с одной стороны, реализация защитных реакций организма; с другой стороны, избыточное образование АКМ и их вторичных продуктов приводит к состоянию, называемому «окислительный стресс» организма. Развитию «окислительного стресса» в организме препятствуют вещества с антиоксидантными свойствами как эндогенного, так и экзогенного происхождения. На сегодняшний день, пожалуй, нельзя найти ни одной области медицины, биохимии, биофизики, фармации, пищевой технологии, в которой не изучались бы процессы свободно-радикального окисления и антиоксидантного действия. Тематика исследования антиоксидантных свойств веществ носит междисциплинарный характер и направлена на улучшение здоровья человека и увеличение продолжительности жизни. Одним из актуальных направлений в этой области является создание подходов к определению интегральных параметров антиоксидантной и антирадикальной емкости/активности, т.к. эффективность функционирования антиоксидантной системы организма может быть не связана с содержанием конкретного соединения, а отражает свойство системы в целом.

В условиях техногенного развития общества, ухудшения экологической ситуации, роста патологических состояний населения риск возникновения окислительного стресса резко возрастает, а, следовательно, исследования антиоксидантных свойств различных объектов, как биологических жидкостей, так и продуктов питания, становятся еще более востребованными.

К настоящему времени круг существующих подходов к определению интегральных параметров антиоксидантной/антирадикальной

емкости/активности достаточно широк и по способу регистрации сигналообразующей реакции чаще всего используются спектральные методы (спектрофотометрия, флюорометрия, хемилюминесценция, электронный парамагнитный резонанс). Однако, принимая во внимание, что с химической точки зрения действие антиоксидантов сводится к электронно-протонно-донорному механизму, применение электрохимических методов исследования для интегральной оценки антиоксидантных свойств является более целесообразным. Помимо соответствия принципов методов природе антиоксидантного действия, электрохимические методы обладают рядом преимуществ перед спектроскопическими, такими как доступность, простота эксплуатации, экспрессность, чувствительность, возможность исследования мутных и окрашенных соединений, возможность реализации как в портативном, так и в проточном вариантах анализа.

Степень разработанности темы диссертационной работы

Методики определения интегральных параметров антиоксидантной/антирадикальной емкости/активности базируются в основном на применении моделей окислителей (i) с участием свободных радикалов, которые можно подразделить на модели с использованием стабильных радикалов и радикал – генерирующих систем, или (ii) с участием химических реагентов нерадикальной природы, изменяющих какие-либо физико-химические свойства системы при взаимодействии с АО исследуемого образца. Разработанные для удобства использования и быстрого скрининга большого количества объектов, многие современные подходы к исследованию интегральных антиоксидантных параметров имеют как концептуальные, так и технические ограничения. Поскольку результаты исследования антиоксидантных свойств и выводы относительно эффективности АО в конечном итоге необходимо интерпретировать по отношению к живым организмам, то подходы к исследованию антиоксидантных свойств целесообразно рассматривать не с позиции метода регистрации

сигналообразующей реакции, а с позиции механизмов образования АКМ и действия АО в биологических средах. В целом, можно сформулировать следующие основные требования, которые желательно учитывать при разработке методик определения интегральных параметров антиоксидантной/антирадикальной емкости и от которых, в конечном итоге, будет зависеть широта их распространения:

1. обоснованность выбора модели окислителя;
2. физиологичность условий проведения измерения, включая используемые реагенты, рН и т.д.;
3. реализация одного из механизмов действия антиоксидантов в организме;
4. качество аналитических характеристик методик (простота реализации, доступность аппаратного оформления, воспроизводимость, чувствительность, экспрессность измерения, возможность анализа широкого круга объектов, в том числе мутных и окрашенных).

Существующие методики интегральной оценки антиоксидантных свойств редко ориентируются на удовлетворение всех требований. Таким образом, проблема потребности в методиках, дающих надежные и корректные результаты, остается до конца нерешенной, а создание новых подходов для определения интегральных параметров антиоксидантной/антирадикальной емкости/активности до сих пор является востребованным.

Целью работы является развитие теории и практики потенциометрического метода в комплексной оценке антиоксидантных и антирадикальных свойств веществ и создание новых методологических подходов для количественного определения антиоксидантной/антирадикальной емкости различных объектов, основанных на механизмах химического действия АО в организме.

Достижение поставленной цели требует решения следующих **задач**:

- сформулировать общие принципы, теоретические и практические подходы к использованию потенциометрии в интегральной оценке антиоксидантных/антирадикальных свойств веществ;

- теоретически обосновать и экспериментально подтвердить выбор модели окислителя в реакциях электронного и электронно-протонного переноса с АО;

- обосновать использование потенциометрии для количественной оценки результата реакций электронного и электронно-протонного переноса с АО на модельный окислитель в виде параметров антиоксидантной и антирадикальной емкости (АОЕ и АРЕ), установить взаимосвязь структура АО – АОЕ/АРЕ;

- разработать экспрессные методики определения АОЕ и АРЕ индивидуальных веществ и многокомпонентных объектов;

- разработать методики определения интегральных параметров АОЕ и АРЕ различных объектов (лекарственных средств, экстрактов растительного сырья, пищевых продуктов, биологических жидкостей), рассчитать основные аналитические и метрологические характеристики;

- провести корреляционные исследования антиоксидантных свойств с использованием новых и известных методик, основанных на разных физико-химических принципах регистрации аналитического сигнала.

Научная новизна работы

1. Сформулированы и теоретически обоснованы критерии выбора модельной системы окислителя для исследования антиоксидантных свойств веществ.

2. Развита концепция применения потенциометрии в изучении реакций электронного и электронно-протонного переноса для решения конкретных аналитических задач, связанных с определением интегральных параметров АОЕ и АРЕ различных объектов.

3. Изучены закономерности протекания реакции $K_3[Fe(CN)_6]$ с АО, показана возможность использования изменения окислительно-восстановительного потенциала системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ для количественной оценки антиоксидантных свойств веществ, установлена взаимосвязь структуры АО и его антиоксидантной емкостью.

4. Исследовано влияние хелатирующей способности АО на величину интегрального параметра АОЕ.

4. Изучены закономерности изменения окислительно-восстановительного потенциала системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ при протекании реакции генерирования пероксильных радикалов, показана возможность использования потенциометрии для количественной оценки кинетических параметров этой реакции (скорости и константы скорости генерирования).

5. Изучены закономерности изменения окислительно-восстановительного потенциала радикал генерирующей системы на модели 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорида (ААРН) в качестве источника пероксильных радикалов в процессах их генерирования и ингибирования антиоксидантами, показана возможность использования потенциометрии для количественной оценки этих процессов.

6. Предложены новые подходы для потенциометрического определения интегральных параметров АОЕ и АРЕ различных объектов.

Новизна предлагаемых подходов подтверждена 4 патентами РФ.

Теоретическая и практическая значимость работы

1. На основании сформулированных принципов разработана методология потенциометрического исследования антиоксидантной/антирадикальной емкости объектов, основанная на закономерном изменении окислительно-восстановительного потенциала системы, состоящей из модельного окислителя и исследуемого образца, в процессе реакций электронно-протонного переноса.

2. Сформулированы и теоретически обоснованы критерии выбора модельной системы для исследования антиоксидантных/антирадикальных свойств веществ.

3. Разработана оригинальная потенциометрическая методика определения АОЕ индивидуальных АО и многокомпонентных объектов, основанная на реакции АО с окисленным компонентом системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$, рассчитаны стехиометрические коэффициенты реакций.

4. Предложен новый подход к определению скорости и константы скорости реакции генерирования пероксильных радикалов, подобных радикалам, образующимся в организме с использованием потенциометрического метода.

5. Разработана оригинальная потенциометрическая методика определения АРЕ индивидуальных АО и многокомпонентных объектов, основанная на реакции АО с генерируемыми пероксильными радикалами, образующимися в результате термического распада ААРН, рассчитаны коэффициенты ингибирования.

6. Разработаны и запатентованы алгоритмы количественного определения АОЕ, АРЕ, кинетических параметров реакции генерирования пероксильных радикалов с использованием потенциометрии, определены рабочие условия проведения анализа, исследовано большое количество объектов (индивидуальные вещества природного происхождения и синтезированные, экстракты растительного сырья, лекарственные препараты, пищевые продукты, биологические жидкости), проведены корреляционные исследования с привлечением независимых способов.

7. Оценены аналитические и метрологические характеристики разработанных методик.

8. Аттестованы методики количественного определения антиоксидантной емкости пищевых продуктов, продовольственного сырья,

БАД, витаминов, биологических материалов (крови и ее фракций) по ГОСТ Р 8.563.

9. Получен акт внедрения разработанных методик в образовательный процесс.

Методология и методы диссертационного исследования

Методологической основой при выполнении диссертационного исследования послужили теоретические знания и современные методы исследования антиоксидантных / антирадикальных свойств соединений с использованием моделей окислителей радикальной и нерадикальной природы.

При выборе модельных окислителей руководствовались современными наработками в области исследования механизмов химических реакций АО с АКМ, данными по термодинамическим и кинетическим характеристикам. При исследовании электрохимической обратимости систем и окислительно-восстановительных свойств соединений использовали метод циклической вольтамперометрии. В качестве основного метода исследования АОЕ, АРЕ и кинетики генерирования радикалов использован потенциометрический, как наиболее простой, информативный, более полно отвечающий природе изучаемых процессов. В корреляционных исследованиях в качестве методов сравнения использованы спектрофотометрический метод исследования противорадикальной активности на модели стабильного радикала DPPH, спектрофотометрический метод оценки общего содержания полифенолов с использованием реактива Фолина-Чокальтэу (Folin–Ciocalteu), как наиболее точные, утвержденные ГОСТ методы анализа, фотохемилюминесцентный метод определения антиоксидантной активности на модели фотоокисления глицил-триптофана (Gly-Trp) с использованием рибофлавина (RF) в качестве фотосенсибилизатора, хемилюминесцентный метод определения сверхслабого свечения продуктов перекисного окисления липидов, спектрофотометрический метод определения общего антиоксидантного статуса TAS Randox.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Методология комплексного исследования антиоксидантных свойств веществ, основанная на механизмах действия АО в организме.
- Обоснование выбора потенциометрии и модельных окислителей $K_3[Fe(CN)_6]$ и ААРН в реакциях переноса электрона и атома водорода соответственно, для определения интегральных параметров антиоксидантной/антирадикальной емкости.
- Результаты исследования взаимодействия АО с выбранными окислителями методом потенциометрии, определение стехиометрических коэффициентов в реакциях электронного переноса и коэффициентов ингибирования в реакциях электронно-протонного переноса.
- Закономерности изменения окислительно-восстановительного потенциала системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ при протекании реакции окисленного компонента с индивидуальными АО, количественная оценка этого взаимодействия в виде параметра АОЕ, измеренная потенциометрическим методом.
- Результаты исследования кинетики генерирования пероксильных радикалов на модели термического распада азоинициатора ААРН потенциометрическим методом в условиях, близких к физиологическим, количественная оценка скорости и константы скорости генерирования.
- Закономерности изменения окислительно-восстановительного потенциала радикал генерирующей системы на модели ААРН в качестве источника пероксильных радикалов в процессах их генерирования и ингибирования антиоксидантами, количественная оценка этого взаимодействия в виде параметра АРЕ, измеренная потенциометрическим методом.
- Новые потенциометрические методики количественного определения интегральных параметров АОЕ и АРЕ, отличающиеся простотой,

экспрессностью, точностью, воспроизводимостью и их применение в анализе широкого круга модельных веществ и реальных объектов.

- Результаты определения АОЕ и АРЕ индивидуальных АО и реальных объектов (индивидуальные вещества природного происхождения и вновь синтезированные, экстракты растительного сырья, лекарственные препараты, пищевые продукты, биологические жидкости).

- Результаты корреляционных исследований антиоксидантных свойств, полученных с использованием новых потенциометрических и известных методик, основанных на разных физико-химических принципах регистрации аналитического сигнала.

Степень достоверности и апробации результатов

Достоверность научных положений, полученных результатов и сформулированных в работе выводов обеспечена использованием современных методов исследования и оборудования для электрохимических и спектроскопических измерений, высокой степенью корреляции полученных экспериментальных результатов с теоретически ожидаемыми и с независимыми методами исследования, согласованностью с литературными данными, высокими показателями метрологических характеристик.

Разработанные методики количественного определения антиоксидантной емкости пищевых продуктов, продовольственного сырья, БАД, витаминов, биологических материалов (крови и ее фракций) аттестованы по ГОСТ Р 8.563 и внедрены в образовательный процесс.

Основные положения диссертационной работы доложены на XV, XVI научно-технической конференции «Датчик» (Судак, 2003, 2004 гг); на VI, VII, VIII и IX Всероссийских конференциях с международным участием «Электрохимические методы анализа» (Уфа, Екатеринбург, Россия, 2004, 2008, 2012, 2016 гг.); 6 - м симпозиуме «Биосенсоры и биоаналитическая техника в экологическом и клиническом анализе» (Рим, Италия, 2004 г.); на Научно-технической конференции «Высокоэффективные пищевые

технологии, методы и средства для их реализации» (Москва, 2004 г.); на Всероссийской научной конференции с международным участием «Электроаналитика-2005». (Екатеринбург, 2005 г.); на 4-ой научно-практической конференции с международным участием «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека», (Смоленск, 2005 г.); на I Международной конференции «Traditional medicine and dietology – a way to caucasian longevity» (Likani, Georgia, 2006 г.); на Международном конгрессе по аналитическим наукам ICAS-2006 (Москва, Россия, 2006 г.); на XVIII, XX Менделеевских съездах по общей и прикладной химии (Москва, Екатеринбург, Россия, 2007, 2016 гг.); на Международных симпозиумах «Последние достижения в анализе пищевых продуктов» (Prague, Czech Republic, 2007, 2015 гг.); на II Международном Форуме «Аналитика и Аналитики» (Воронеж, 2008 г.); на III Всероссийской конференции с международным участием «Аналитика России» (Краснодар, 2009 г.); на XV конференции по электроанализу (Инсбрук, Австрия, 2009 г.); на симпозиуме с международным участием «Теория и практика электроаналитической химии (Томск, Россия, 2010 г.); на VIII Международной конференции «Биоантиоксидант» (Москва, 2010 г.); на IV химическом конгрессе (Prague, Czech Republic, 2012 г.); на IX, X Всероссийской конференции «Химия и медицина» (Уфа, Россия, 2013, 2015 гг.); на II, III Съездах аналитиков России (Москва, 2013, 2017 гг.); на Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (Новосибирск, 2013 г.); на конференции «Электроанализ 2015» (Бордо, Франция, 2015 г.); на I Всероссийской конференции с международным участием «Химический анализ и медицина» (Москва, 2015 г.); на XX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Екатеринбург, 2016 г.); на международной конференции «Analytical and Bioanalytical Chemistry» (Барселона, Испания, 2018 г.); на III, IV Междисциплинарном Симпозиуме по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике

МОБИ-ХимФарма (Севастополь, Новый Свет, Судак, Крым, 2017, 2018, 2019 гг.).

Публикации. По результатам диссертации опубликовано 132 работы, в том числе 16 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК, 4 патента РФ, 2 учебных пособия и тезисы более 100 докладов всероссийских и международных научных конференций.

Личный вклад автора в исследования, проводимые в рамках диссертационной работы, заключается в обосновании методологии исследования антиоксидантных свойств веществ на основании действия АО в организме, развитии теории потенциометрического исследования реакций электронно-протонного переноса, в теоретическом обосновании выбранных моделей окислителей и создании на этой основе новых подходов к определению антиоксидантной и антирадикальной емкости индивидуальных веществ и объектов со сложной матрицей. Работы, выполненные в соавторстве и включенные в диссертацию, состояли в постановке целей и решении задач исследования, интерпретации полученных экспериментальных данных, систематизации результатов исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке: Международной ассоциации по содействию сотрудничеству с учёными независимых государств бывшего Советского Союза INTAS (проект № 00-273, 2001 – 2004 гг.), Министерства Образования РФ (проект № 14024, 2005 г.), Международного научно-технического центра МНТЦ (проект № 2132, 2003-2005 гг.), Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект № 07-03-96071-р_урал_a, 2007-2009 гг.), Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно - технической сфере (ГК № 4140р/6479, 2006 – 2007 гг.), в рамках госбюджетной темы Н687.42Г.002/12 (проект № 4.9514.2017/БЧ, 2017-2019 гг.), Российского Научного Фонда (проект № 16-13-00008, 2016-2018 гг.)

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, заключения, списка литературы, приложений. Текст диссертации изложен на 350 страницах, содержит 89 рисунков, 85 таблиц, 3 приложения и 412 библиографических ссылок.

Во введении сформулирована актуальность и степень разработанности темы диссертационной работы, поставлены цели и задачи исследования, показана научная новизна и практическая значимость, а также положения, выносимые на защиту.

Первая глава посвящена обзору литературы, в котором раскрыты механизмы биологического действия АО, показана связь с механизмами химического превращения АО и рассмотрены основные подходы к исследованию антиоксидантных свойств веществ, которые классифицированы в соответствии с механизмами. Проведен анализ существующих способов и обоснована необходимость разработки новых подходов в исследовании интегральных параметров антиоксидантных свойств веществ.

Во второй главе описаны применяемые методы исследования, приборы и используемые методики. Представлены сведения о используемых реактивах и объектах исследования, а также способах математической обработки полученных результатов.

Третья глава посвящена развитию теоретических подходов к исследованию реакций переноса электрона с АО на модельный окислитель с использованием потенциометрии. Теоретически и экспериментально обоснован выбор модели окислителя для определения интегрального параметра антиоксидантной емкости, основанного на реакции переноса электрона, а также условий реализации данной реакции. Представлены результаты исследования модельных индивидуальных АО, показано, что величина АОЕ коррелирует с числом функциональных антиоксидантных групп изучаемых молекул. На основании проведенных исследований предложена новая потенциометрическая методика определения АОЕ.

Исследовано влияние хелатирующей способности АО в величину интегрального параметра АОЕ.

В четвертой главе описаны теоретические подходы к исследованию реакций переноса атомов водорода с АО на модельный окислитель с использованием потенциометрии. Обоснован выбор радикал-генерирующей системы и изучена кинетика реакции термического распада 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорида (ААРН) (определены скорость и константа скорости реакции). Изучены закономерности изменения окислительно-восстановительного потенциала радикал генерирующей системы на модели ААРН в качестве источника пероксильных радикалов в процессах их генерирования и ингибирования антиоксидантами. Предложены новые потенциометрические методики определения кинетических параметров реакции генерирования радикалов и величины антирадикальной емкости. Приведены экспериментальные данные по определению АРЕ индивидуальных АО на модели выбранной радикал-генерирующей системы, изучено влияние различных факторов (ионная сила раствора, буферная емкость) на результаты определения.

В пятой главе представлены результаты определения АОЕ и АРЕ различных реальных объектов— индивидуальных природных АО, синтезированных АО, продуктов питания (ягод, фруктов, овощей, чая, спиртных напитков), лекарств, витаминов, экстрактов растений, биологических объектов (плазма, сыворотка, эритроцитарная масса, диализная жидкость). Осуществлен выбор рабочих условий проведения анализа и разработаны алгоритмы определения АОЕ и АРЕ. Оценены аналитические и метрологические характеристики разработанных методик: величина относительного стандартного отклонения, показатели повторяемости и воспроизводимости, интервал относительной систематической погрешности. Представлены результаты корреляционных исследований, полученных с использованием новых потенциометрических и известных методик, основанных на других физико-химических принципах.

В *заключении* диссертации резюмированы результаты и подведены итоги проведенного исследования.

В приложениях к диссертации представлены «Методика определения антиоксидантной активности пищевых продуктов, продовольственного сырья, БАД и витаминов методом потенциометрии с применением анализатора МПА-1» (свидетельство УНИИМ - № 224.04.10.063/2007), «Методика определения антиоксидантной активности проб биологических материалов методом потенциометрии с применением анализатора МПА-1» (свидетельство УНИИМ - № 224.11.10.067/2007), акт внедрения разработанных методик в учебный процесс.

ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Активированные кислородные метаболиты и их роль в жизнедеятельности организма

Интерес к изучению антиоксидантных свойств различных объектов вызван рядом причин, связанных с потреблением живыми организмами молекулярного кислорода. Около 90% вдыхаемого человеком молекулярного кислорода вовлекается в метаболический путь, при котором энергия, образовавшаяся при окислении питательных веществ, запасается в митохондриях клеток в виде аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ). Этот процесс называется окислительным фосфорилированием и осуществляет энергетическое жизнеобеспечение клеток. Вместе с тем, наряду с жизненно необходимым для организма процессом, во всех живых организмах протекают реакции образования из молекулярного кислорода активированных кислородных метаболитов (АКМ), таких как $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , RO^{\cdot} , H_2O_2 , ROO^{\cdot} , 1O_2 , OCl^{\cdot} , NO^{\cdot} , $ONOO^{\cdot}$, NO_2^{\cdot} [1]. В процессе эволюции во всех живых организмах выработались целые ферментативные системы, участвующие в реакциях одно-, двух- и четырех-электронного восстановления молекулярного кислорода (рисунок 1.1) [2, 3].

По данным Гельмута Эстербауэра [4] человек за 70 лет жизни потребляет 17000 кг молекулярного кислорода, за это время нарабатывается от 800 до 1700 кг АКМ.

Среди образующихся АКМ присутствуют вещества как радикальной, так и нерадикальной природы. Большинство исследователей при изучении роли АКМ на организм человека рассматривают, в основном, образование свободных радикалов, однако АКМ нерадикальной природы являются высоко реакционными окислителями и способны генерировать радикалы, поэтому информация о метаболитах нерадикальной природы также очень важна. Термин «активированные кислородные метаболиты» успешно объединяет

соединения как радикальной, так и нерадикальной природы. Комплекс соединений такого рода иллюстрируется диаграммой из приведенной выше книги (рисунок 1.2) [1].

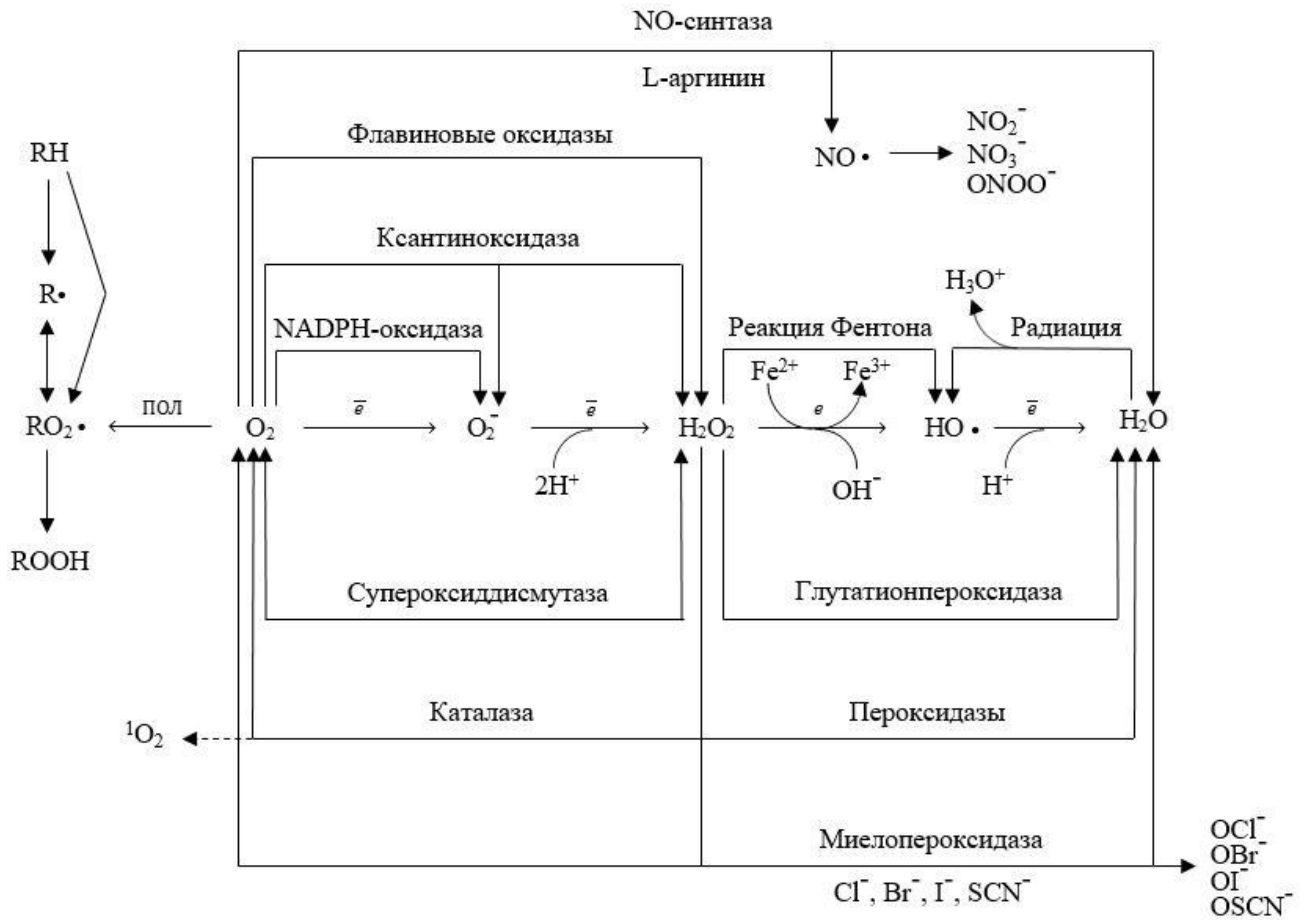


Рисунок 1.1 - Основные пути ферментативной генерации АКМ в организме человека и животных

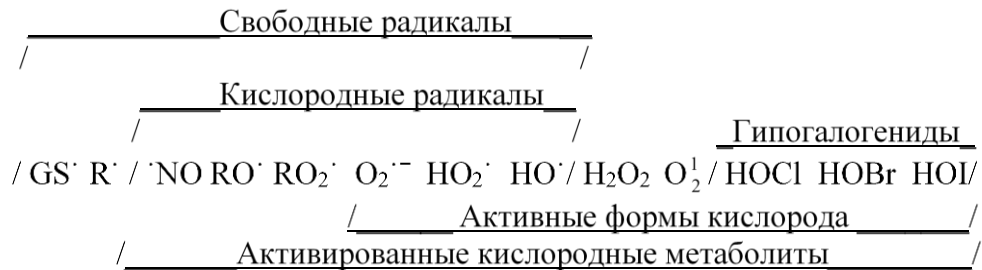


Рисунок 1.2 - Активированные кислородные метаболиты, активные формы кислорода и свободные радикалы

АКМ вовлекаются в два глобальных типа процессов в организме. С одной стороны, одной из главных функций АКМ является реализация защитных реакций организма [5]. Активированные кислородные метаболиты являются необходимым элементом фагоцитоза, при котором происходит разрушение поврежденных, старых или иммунологически несовместимых клеток, а также злокачественных клеток и клеток, пораженных вирусами и бактериями [6]. Кроме того, АКМ выполняют функции сигнальных трансдьюсеров и межклеточных медиаторов в процессах биорегуляции [6]. С другой стороны, избыточное образование АКМ и их вторичных продуктов приводит к состоянию, называемому «окислительный стресс организма». Окислительный стресс (ОС) является важным фактором возникновения и развития многих заболеваний, таких как воспаление, атеросклероз, канцерогенез, ишемическое поражение тканей, диабет, бронхолегочные и нейродегенеративные патологии, нарушение репродуктивной функции и др. [7]. В настоящее время известно более 100 патологий, вызванных избыточной генерацией АКМ [1]. Несмотря на разнообразие факторов, которые могут привести к возникновению ОС, все они сопровождаются окислительной модификацией макромолекул (нуклеиновых кислот, белков, липидов и углеводов), составляющих основу структурно-функциональной организации живой материи [8].

АКМ характеризуются коротким временем жизни и относительно небольшим радиусом воздействия (таблица 1.1), несмотря на это они играют колоссальную роль в разнообразных метаболических процессах.

В таблице 1.2 представлены механизмы образования основных АКМ и их биологическое действие.

Приведенные данные демонстрируют, что образование АКМ может происходить различными путями, а излишнее их генерирование приводит к негативному воздействию на живые организмы. Ситуация осложняется тем, что практически все АКМ имеют короткое время жизни, что сильно

усложняет, а в ряде случаев делает невозможным, осуществление контроля уровня АКМ в биологических жидкостях, клетках и тканях.

Таблица 1.1 – Характерные значения времен жизни и радиусов диффузии АКМ в биологических субстратах [2, 9-11]

Форма АКМ	Время жизни, с	Радиус диффузии, мкм
$O_2^{\cdot-}$ супероксидный анион-радикал	10^{-6}	0,3
HO^{\cdot} - гидроксильный радикал	10^{-9}	< 0,01
RO^{\cdot} - алкоксильный радикал	10^{-6}	Зависит от R
H_2O_2 - перекись водорода	Зависит от наличия каталазы и глутатионпероксидазы	
ROO^{\cdot} - перекисный радикал	$10^{-2} \div 10^1$	Зависит от R
1O_2 – синглетный кислород	10^{-6}	0,3
HO_2^{\cdot} - пергидроксильный радикал	10^{-3}	10
NO^{\cdot} - оксид азот	10^{-1}	100
$ONOO^{\cdot}$ - пероксинитрил	2	600
NO_2^{\cdot} - диоксид азота	$< 10^{-5}$	0,2
OCl^{\cdot} OI^{\cdot} - гипогалогенные кислоты OBr^{\cdot} OCN^{\cdot}	Зависит от субстрата	

Таблица 1.2 – АКМ в живых системах: механизм образования и биологическое действие [1]

Форма АКМ	Механизм образования	Биологическое действие
1	2	3
$O_2^{\cdot-}$	Одноэлектронное восстановление O_2 ксантинооксидазой, НАДФН – оксидазой фагоцитов, оксидазами аминокислот; образование в цепи транспорта митохондрий и микросом; при окислении оксигемоглобина [3, 12-14]	Усиление пролиферации лимфоцитов; угнетение синтеза белка; индукция ПОЛ; высвобождение железа из ферритина; разрушение мембран эритроцитов; образование HO^{\cdot} , HO_2^{\cdot} , H_2O_2 , 1O_2 ; восстановление цитохрома C; внутриклеточная регуляция; вазомоторное действие [15-19]
HO_2^{\cdot}	Присоединение H^+ к $O_2^{\cdot-}$ в кислой среде ($pK=4,8$); реакция H_2O_2 с органическими радикалами; промежуточный продукт в реакциях восстановленных флавинов с O_2 [20,21]	Индуктирует ПОЛ, переходит в H_2O_2 (при взаимодействии с органическими молекулами) или в $O_2^{\cdot-}$; обладает цитотоксическим действием [14,16,21]
H_2O_2	Двухэлектронное восстановление O_2 ксантинооксидазой и флавиновыми оксидазами; реакция дисмутации $O_2^{\cdot-}$ с участием или без участия СОД [22,23]	Цитотоксичность; локальное закисление среды; сосудосуживающее действие; образование HO^{\cdot} в реакциях типа Фентоновской; ингибирование пролиферации лимфоцитов [13, 24-27]

Форма АКМ	Механизм образования	Биологическое действие
1	2	3
HO•	Разложение H ₂ O ₂ ионами металлов переменной валентности (реакция Фентона); действие ионизирующего излучения на H ₂ O; образование при микросомальном окислении, при взаимодействии OCl ⁻ с O ₂ ⁻ [14, 28, 29]	Сильный окислитель; разрывает любую C-H-связь; повреждает нуклеиновые кислоты и белки; индуцирует процессы ПОЛ; обладает сильным цитотоксическим, мутагенным и канцерогенным действием [28, 30, 31]
NO•	Окисление L-аргинина NO-синтазами [32]	Релаксация гладкомышечных клеток; цитотоксичность; ингибирование пролиферации лимфоцитов; нейрорегуляция [33-35]
¹ O ₂	Сопутствующий продукт в реакции с пероксидазами, при спонтанной дисмутации O ₂ ⁻ , при взаимодействии H ₂ O ₂ с NO•; фотоиндуцированные реакции [36,37]	Индуцирует процессы ПОЛ; обладает цитотоксическим и мутагенным действием; переход в O ₂ сопровождается излучением при 1260 нм [38-40]
ROO•	Взаимодействие O ₂ с органическими радикалами; реакция O ₂ ⁻ , ¹ O ₂ , HO•, RO• с ненасыщенными липидами и жирными кислотами [41]	Взаимодействует с ненасыщенными липидами с образованием R• и ROOH; реакция рекомбинации сопровождается биохемилюминесценцией [42]

Форма АКМ	Механизм образования	Биологическое действие
1	2	3
RO [•]	Разложение органических перекисей ионами металлов переменной валентности [14]	Индукцирует процессы ПОЛ; обладает цитотоксическим и канцерогенным действием [42,43]
OCI ⁻ OI ⁻ OBr ⁻	Реакция H ₂ O ₂ с миелпероксидазой лейкоцитов и пероксидазой эозинофилов [44-46]	Как индуцируют, так и ингибируют ПОЛ; инактивируют ингибиторы протеаз; вызывают мобилизацию цинка из металлопротеинов; обладают цитотоксическим действием [47-49]

1.2 Система защиты организма от избытка АКМ

Функционирование и развитие клеток в кислородсодержащем окружении не могло бы быть возможным без существования защитных систем, способных ингибировать избыточное образование АКМ. Постоянное образование АКМ в живых организмах должно быть уравновешено их дезактивацией, поэтому для обеспечения нормальной жизнедеятельности организма (гомеостаза) необходима непрерывная регенерация веществ, взаимодействующих с АКМ, снижая их окислительную активность. Отсутствие или сбой этой непрерывности сопровождаются накоплением окислительных повреждений и приводят к возникновению окислительного стресса, который является основным элементом целого ряда физиологических и патофизиологических процессов [1]. Система защиты организма от

избыточной генерации АКМ достаточно сложна и отличается многообразием реакций, в которые вовлекаются ингибиторы АКМ.

Процесс свободнорадикального окисления (СРО) в организме принято делить на стадии: зарождение цепей, развитие цепных реакций и их разветвление, обрыв цепей [50]. Нумерация и последовательность реакций, которыми принято описывать свободнорадикальное окисление представлена в таблице 1.3.

Таблица 1.3 - Характерные реакции, протекающие при окислении субстрата (RH) в присутствии кислорода и ингибитора InH [50]

Зарождение цепей окисления	(0)	$RH \rightarrow R^{\bullet}$
Продолжение цепей окисления	(1)	$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow RO_2^{\bullet}$
	(2)	$RO_2^{\bullet} + RH \rightarrow ROOH + R^{\bullet}$
Вырожденное разветвление цепей	(3)	$ROOH \rightarrow RO^{\bullet} + \bullet OH$
	(3')	$ROOR' \rightarrow RO^{\bullet} + \bullet OR'$
Обрыв цепей окисления	(4)	$R^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow RR$
	(5)	$RO_2^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow ROOR$
	(6)	$RO_2^{\bullet} + RO_2^{\bullet} \rightarrow ROOR + O_2$
	(7)	$RO_2^{\bullet} + InH \rightarrow ROOH + In^{\bullet}$
	(7')	$RO^{\bullet} + InH \rightarrow ROH + In^{\bullet}$
	(7'')	$R^{\bullet} + InH \rightarrow RH + In^{\bullet}$
Прочие реакции с участием ингибитора	(8)	$RO_2^{\bullet} + In^{\bullet} \rightarrow ROOIn$
	(-7)	$ROOH + In^{\bullet} \rightarrow RO_2^{\bullet} + InH$
	(9)	$In^{\bullet} + In^{\bullet} \rightarrow \text{молекулярные продукты}$
	(10)	$In^{\bullet} + RH \rightarrow InH + R^{\bullet}$
	(11)	$InH + ROOH \rightarrow In^{\bullet} + RO^{\bullet} + H_2O$
	(12)	$InH + O_2 \rightarrow In^{\bullet} + HO_2^{\bullet}$
	(13)	$ROOIn \rightarrow RO^{\bullet} + InO^{\bullet}$

Ингибиторы СРО составляют основу системы защиты организма от избыточной генерации АКМ. По сути дела, защита организма от АКМ представляет собой универсальную сложную систему химических и биохимических реакций, реализуемых на разных биологических уровнях и протекающих по разным механизмам, в которые вовлекаются различные высоко- и низкомолекулярные соединения, такие как окислительно-восстановительные ферменты, полипептиды, некоторые витамины, аминокислоты, полифенолы и т.д. [1, 8, 51]. Все эти соединения объединили в понятие «антиоксиданты» [52]. Первые упоминания о веществах с антиоксидантным действием относятся еще к 1934 г [53]. Слово «антиоксидант» становится все более популярным в современном обществе, поскольку оно всегда «на слуху» в средствах массовой информации, постоянно мы слышим о пользе антиоксидантов для здоровья. Международный словарь английского языка определяет термин «антиоксидант» как «вещество, которое противодействует окислению или ингибирует реакции с кислородом или пероксидами, многие из этих веществ (такие как токоферолы) используются в качестве консервантов в различных продуктах (жирах, маслах, пищевых продуктах, мылах для замедления развития прогорклости, в бензине и других нефтепродуктах для замедления смолообразования и других нежелательных изменений, в резине для замедления старения)» [54]. Антиоксидантами считают также синтетические или природные вещества, добавленные к продуктам для предотвращения или замедления их разрушения под действием кислорода воздуха. В биохимии и медицине антиоксидантами принято считать «ферменты или другие органические вещества, такие как витамин Е или β -каротин, которые способны противодействовать разрушающим эффектам окисления в тканях животных» [55]. В зависимости от научной дисциплины и объекта защиты от АКМ определение термина «антиоксидант» может существенно различаться. В химической промышленности к антиоксидантам часто относят соединения, которые замедляют автоокисление химических продуктов, таких как резина и

пластмассы. В пищевой науке антиоксиданты представлены более широким кругом соединений, которые нам известны под названием «диетические антиоксиданты». По определению национальной академии наук США – «диетические антиоксиданты – это вещества, содержащиеся в продуктах питания, которые значительно уменьшают неблагоприятное воздействие реактивных форм кислорода и азота при нормальной физиологической функции людей» [56]. Как и другие определения, это определение не дает понимания относительно механизма действия антиоксидантов в организме человека.

В дальнейшем появилось новое понятие «**биоантиоксидант**», под которым понимают полифункциональные соединения в зависимости от механизма действия подразделяемые на **(i) антирадикальные ингибиторы**, взаимодействующие с органическими радикалами; **(ii) антиокислители**, разрушающие органические перекиси; **(iii) хелаторы** – вещества, связывающие катализаторы окисления (ионы металлов переменной валентности); **(iv) тушители** – соединения, безызлучательно инактивирующие возбужденные триплетные состояния кислородных форм [1]. В своей книге [57] авторы Берри Холливелл и Джон Гаттеридж предложили определение, которое удачно объединяет вещества с различными механизмами действия и принято мировым научным сообществом: *«антиоксидант – это любое вещество, которое, присутствуя в низких по сравнению с окисляемым субстратом концентрациях, существенно задерживает или ингибирует его окисление»*.

В современной литературе часто под понятиями «**антиоксидант**» и «**биоантиоксидант**» подразумевают одно и то же, что по мнению авторов [58] не совсем корректно, или, как минимум, требует дополнительных пояснений. Дело в том, что, первоначально термин «**антиоксидант**» появился и стал общепринятым в 60-х годах прошлого столетия в разделе химической кинетики и был связан с со свойствами соединений ингибировать реакции СРО различных углеводов, масел, полимеров и т.д. [50, 59, 60]. Однако,

если речь идет о действии веществ в живых организмах, то целесообразно использовать приставку «**био-**» [58]. Добавление этой приставки означает наличие у антиоксидантов таких дополнительных свойств, как (i) низкая токсичность самих антиоксидантов и продуктов их превращений, (ii) высокая эффективность в ингибировании процессов СРО в живых организмах [58]. Далее в этой работе термин «**антиоксиданты**» будет использоваться именно в таком контексте.

Т.к. вещества с антиоксидантными свойствами представлены широким кругом химических соединений, то подвергнуть их единой строгой классификации затруднительно. С точки зрения ферментативной активности АО можно разделить на 2 группы: ферменты с оксидо-редуктазной функцией (СОД, каталаза, ГПО) и неферментативные соединения. В зависимости от растворимости выделяют липофильные АО (витамины Е, А, К, убихинон) и гидрофильные (витамины С, РР, цистеин, глутатион) [61]. По молекулярной массе можно разделить АО на низкомолекулярные (аскорбиновая кислота, токоферол, флавоноиды, глутатион, мочевая кислота) и высокомолекулярные (альбумин, трансферрин, ферритин и указанные выше ферменты) [62] (рисунок 1.3).



Рисунок 1.3 - Классификация АО по молекулярной массе и растворимости

В зависимости от направленности действия в биологических системах АО делят на вещества косвенного (опосредованного) и прямого (направленного) действия [63]. Данное разделение принимается во внимание

при изучении патологических процессов, сопровождающихся возникновением ОС. Соединения, способствующие выработке эндогенных АО, нормализации метаболических процессов, стабилизации клеточных структур относят к АО косвенного действия. Эффективность этих АО можно оценить только *in vivo*. К соединениям прямого действия относят АО, которые непосредственно вступают в реакции с АКМ, следовательно, напрямую подавляют развитие ОС. Эффективность прямых АО можно оценить как *in vivo*, так и *in vitro*. По природе возникновения в организме АО можно разделить на три группы: эндогенные (вырабатываются системами организма), экзогенные (поступают в организм с продуктами питания, БАДами, растительными экстрактами) и метаболиты.

Авторы [51, 64] предлагают схему классификации, которая учитывает разделение АО сразу по нескольким параметрам – молекулярной массе, ферментативной активности, природе возникновения (эндогенные, экзогенные, метаболиты) и направленности действия (прямое и косвенное) (рисунок. 1.4).

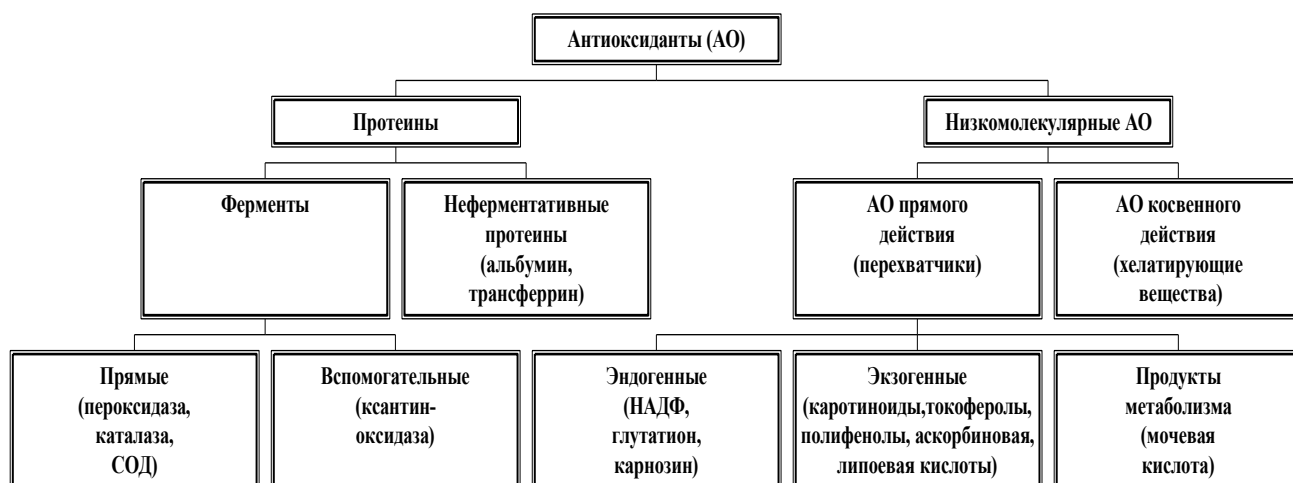


Рисунок 1.4 - Классификация АО

Следует отдельно отметить разнообразие низкомолекулярных АО по своему химическому строению, которые можно разделить на енольные соединения (включая фенольные соединения, каротиноиды, аскорбиновую

кислоту), тиольные соединения (цистеин, глутатион, метионин, липоевая кислота), биогенные амины (мочевая кислота).

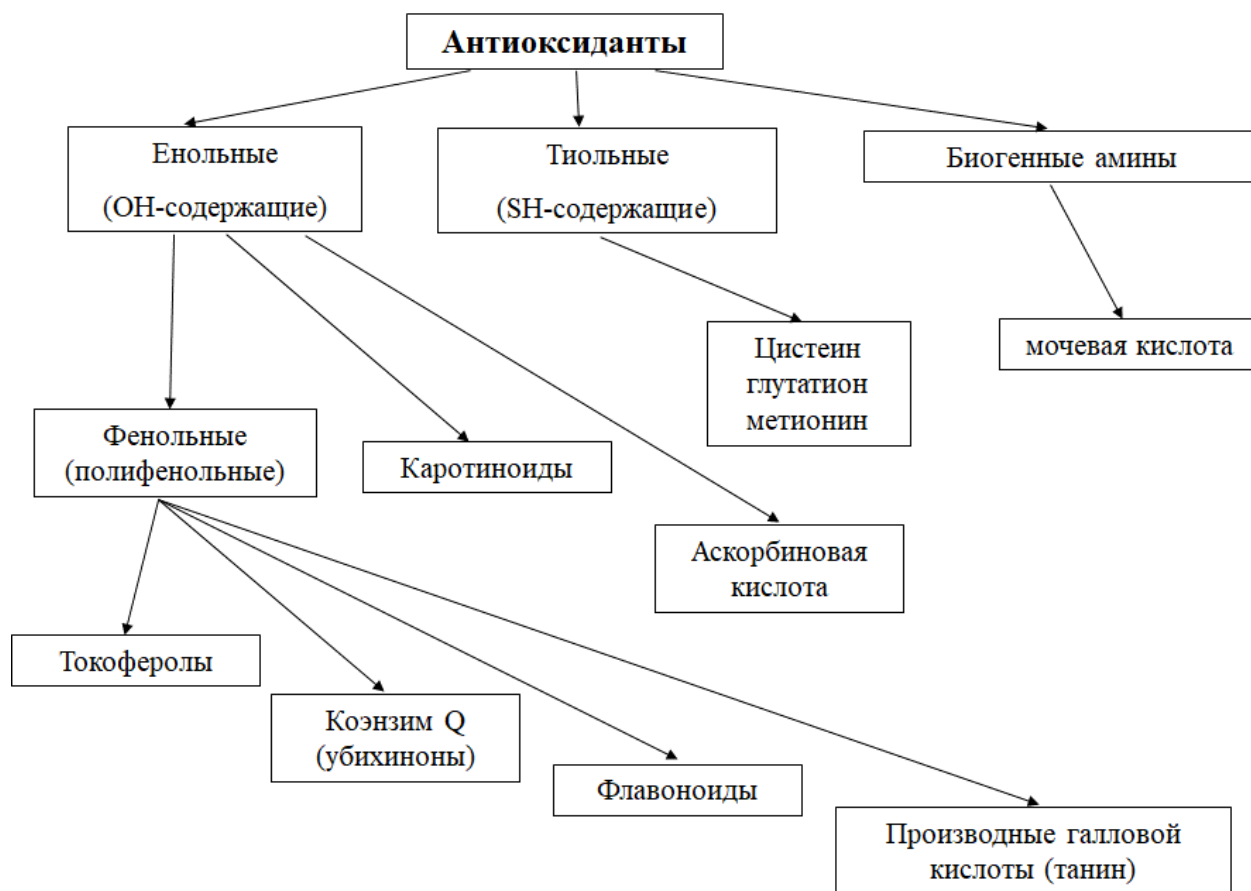
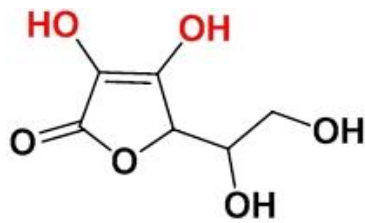


Рисунок 1.5 - Классификация низкомолекулярных АО по химическому строению

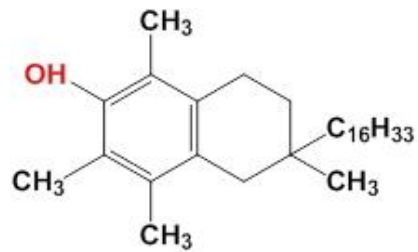
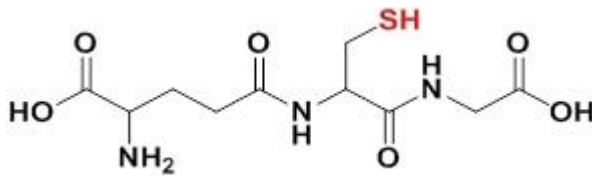
На рисунке 1.6 представлена структура некоторых представителей низкомолекулярных АО енольной, тиольной и аминной природы с выделением их функциональных групп. Все эти соединения объединяет наличие подвижного атома водорода в составе $-OH$ или $-SH$ группы, за счет чего проявляется их активность в окислительно-восстановительных реакциях. Кроме того, для мочевой кислоты характерна бидентатная координация в реакциях комплексообразования за счет кислорода депротонированной гидроксигруппы имидазольного кольца атома азота в 9 положении этого кольца [65]. Реакции комплексообразования характерны также и для многих

полифенольных соединений за счет атомов кислорода депротонированных гидроксогрупп бензольного кольца.

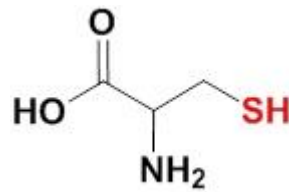
На сегодняшний день известно шесть механизмов биологического действия АО (рисунок 1.7) [1]. В отношении веществ, действующих посредством механизмов II, III, V, VI говорят о превентивности АО, тогда как действие АО по механизмам I и IV, может иметь специфический характер.



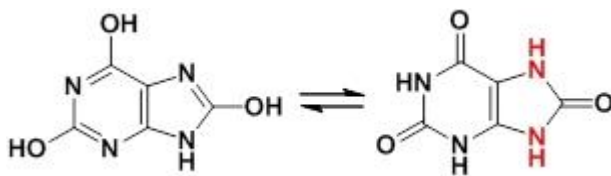
Аскорбиновая кислота

 α -токоферол

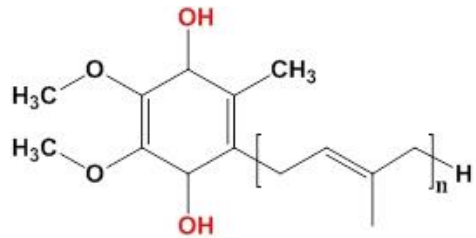
Глутатион



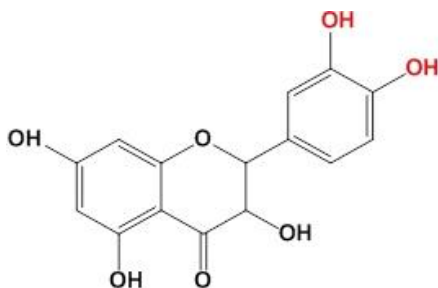
Цистеин



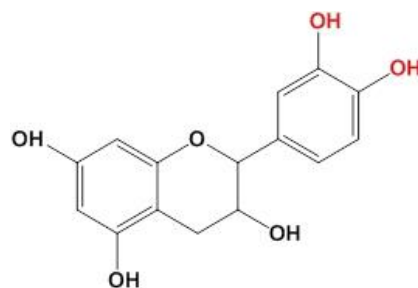
Мочевая кислота



Убихиноны (n=6-10)



Кверцетин



Катехин

Рисунок 1.6 - Структура некоторых низкомолекулярных АО

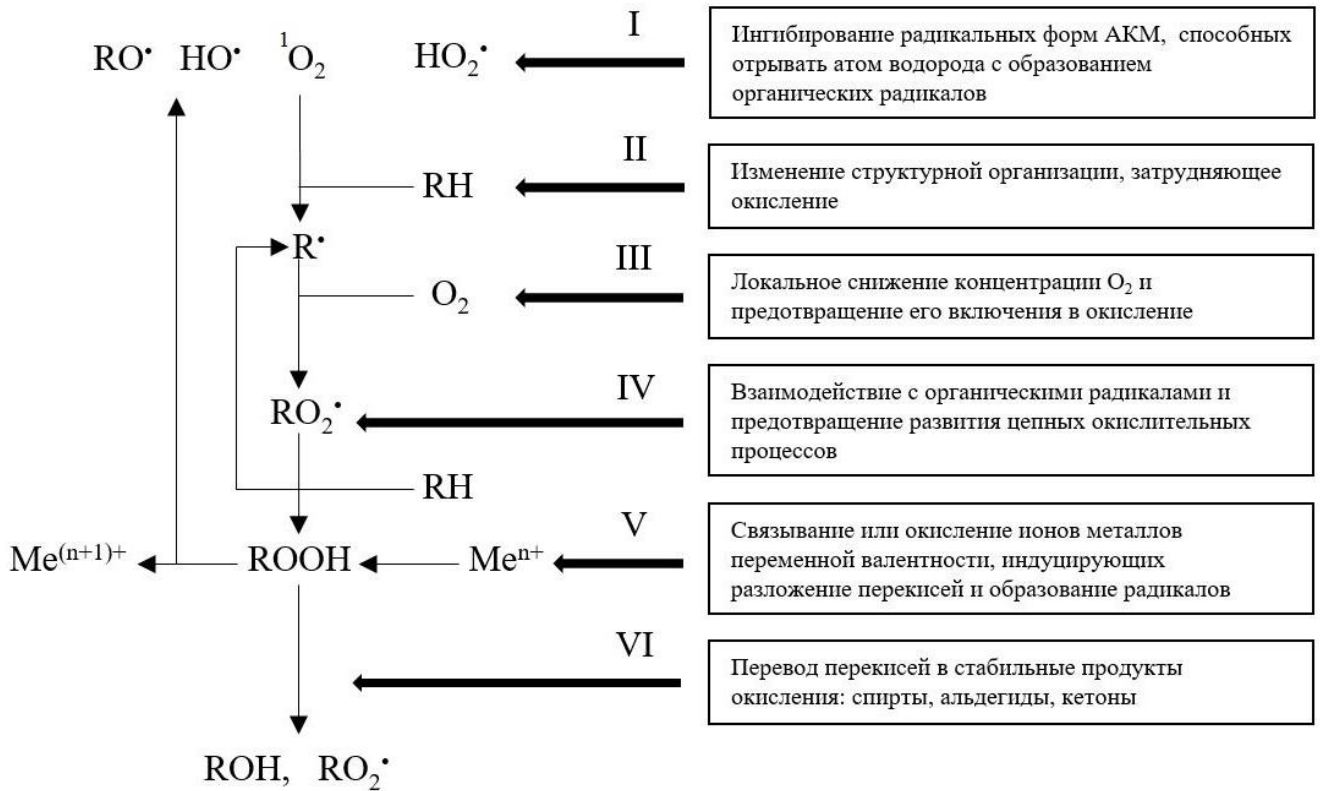


Рисунок 1.7 - Механизмы биологического действия АО

Действие АО реализуется на всех уровнях живой материи – от составляющих клеток до тканей организма. Таблица 1.4 демонстрирует характерную локализацию, направление активности некоторых АО и прямую или опосредованную реализацию биологического механизма.

Система антиоксидантной защиты организма формируется преимущественно за счет собственной выработки АО (эндогенные АО), но в поддержании этой системы большое значение имеют также и АО экзогенного происхождения. Источником их поступления являются продукты питания, биологически активные добавки (БАД), экстракты растительного сырья, а в последнее время стремительно развивается индустрия фармацевтических препаратов антиоксидантного действия.

Таблица 1.4 - Основные АО живых систем [1,8]

Компонент	Тип соединений	Локализация	Действие	Механизм биологического действия
1	2	3	4	5
Ферменты				
СОД	Cu/Zn-СОД	Цитозоль, ядро	Дисмутирует $O_2^{\bullet-}$ до H_2O_2	I
	Mn-СОД	Митохондрии	Дисмутирует $O_2^{\bullet-}$ до H_2O_2	I
	Cu-СОД	Плазма	Дисмутирует $O_2^{\bullet-}$ до H_2O_2	I
Каталаза	Гемобелок	Пероксисомы, цитозоль	Разлагает H_2O_2 до H_2O	VI
Глутатион-пероксидаза	Se-содержащий белок	Цитозоль, митохондрии	Катализирует восстановление H_2O_2 и LOOH	VI
Глутатион-редуктаза	Димерный белок	Цитозоль, митохондрии	Восстанавливает окисленный глутатион, Низкомолекулярные дисульфиды	I, VI
Липофильные компоненты				
α -Токоферол	Жирорастворимый витамин	Мембраны, межклеточная жидкость	Переводит $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} и LOO^{\bullet} в неактивные формы, прерывает цепь ПОЛ	I, IV
β -каротин	Предшественник витамина А	Мембраны	Ловушка $O_2^{\bullet-}$, реагирует с ROO^{\bullet} частицами	I, II, IV
Билирубин	Продукт катаболизма гемсодержащих белков	Кровь, ткани	Прерывает цепь перекисного окисления липидов, взаимодействует с ROO^{\bullet}	IV

1	2	3	4	5
Стероидные гормоны	Продукт превращения холестерина	Внутренняя сторона мембраны	Взаимодействуют с ROO^\bullet	IV
Гидрофильные компоненты				
Аскорбиновая кислота	Водорастворимый витамин	Внутри и вне клеток	Утилизирует O_2^\bullet , HO^\bullet , восстанавливает α -токоферол	I, III, VI
Цистеин	Аминокислота	Повсеместно	Восстанавливает окисленные SH-группы	I, VI
Глутатион	Трипептид	Клетки и межклеточное пространство	Участвует в редокс-цикле, взаимодействует с O_2^\bullet , HO^\bullet , H_2O_2 , органическими радикалами	I, VI
Мелатонин	Белок	Межклеточная жидкость	Связывает свободные радикалы	I, IV
Церулоплазмин	Медьсодержащий белок	Плазма крови	взаимодействует с O_2^\bullet , OCl^- окисляет Fe^{2+} до Fe^{3+}	I, V
Трансферрин	белок	Плазма крови	взаимодействует с OCl^- Хелатирует ионы металлов переменной валентности	I, V
Лактоферрин	белок	Плазма крови	Хелатирует ионы металлов переменной валентности	V
Альбумин	белок	Плазма крови	взаимодействует с O_2^\bullet , OCl^-	I
Мочевая кислота	Биогенный амин	Плазма крови	Хелатирует ионы металлов переменной валентности	V

Таким образом, для поддержания в организме необходимого окислительно-восстановительного баланса, необходим контроль антиоксидантной системы защиты организма. Процесс функционирования антиоксидантной системы защиты организма – это постоянное противостояние АКМ-АО. Принимая во внимание сложности, связанные с контролем уровня АКМ в организме (глава 1.1), вполне логично, что усилия исследователей в этой области направлены на создание способов изучения антиоксидантных свойств биологических материалов, продуктов питания, фармпрепаратов, в том числе БАДов, экстрактов растительного сырья и синтетических лекарственных препаратов.

1.3 Подходы к исследованию антиоксидантных свойств веществ

По данным SCOPUS, количество публикаций, в которых рассматриваются вопросы по исследованию антиоксидантных свойств различных объектов неуклонно растет и достигает в 2018 году значение около 20000 работ. (рисунок 1.8). Такое количество публикаций говорит об очень высокой актуальности затрагиваемой темы.

Авторами предлагаются различные подходы для исследования антиоксидантных свойств объектов. С точки зрения концептуальных подходов можно выделить три группы способов: (i) количественное определение индивидуальных АО по отдельности, (ii) оценка содержания продуктов перекисного окисления макромолекул (липидов, белков и т.д.) и (iii) оценка интегральных параметров, учитывающих антиоксидантные свойства исследуемых объектов в совокупности.

Исследования последних десятилетий доказывают, что эффективность функционирования системы защиты организма от окислительного повреждения связана не столько с концентрацией того или иного антиоксиданта, сколько с совокупностью этих веществ. Оценка совокупных или интегральных показателей антиоксидантного действия представляется

наиболее целесообразной и перспективной. Определение продуктов перекисного окисления макромолекул, в частности ПОЛ, можно отнести к интегральным параметрам, однако уровень содержания этих продуктов демонстрирует работу антиоксидантной системы «*post factum*».

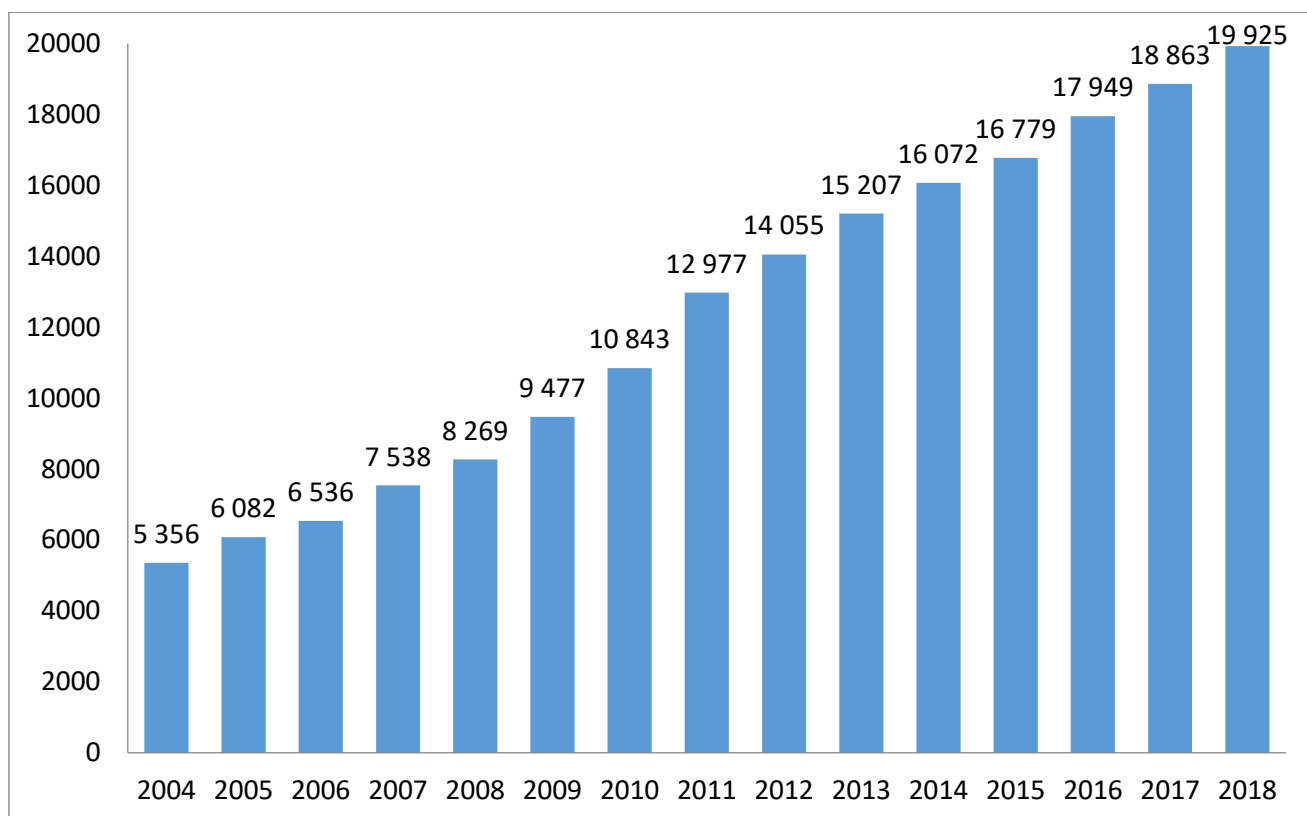


Рисунок.1.8 - Рост количества публикаций, посвященных исследованию антиоксидантных свойств различных объектов за последние 15 лет

В настоящее время круг существующих методик интегральной оценки антиоксидантных свойств достаточно широк и по способу регистрации сигналообразующей реакции используются спектральные методы (спектрофотометрия, флуорометрия, хемилюминесценция), электрохимические методы (вольтамперометрия, амперометрия, потенциометрия, кулонометрия), электронный парамагнитный резонанс и некоторые другие физико-химические методы исследования. Способ регистрации зависит, как правило от свойств индикаторного вещества,

концентрация которого меняется в процессе протекания сигналообразующей реакции.

Методики определения интегральных параметров антиоксидантной/антирадикальной емкости базируются, в основном, на применении моделей окислителей (i) с участием свободных радикалов, которые можно подразделить на модели с использованием стабильных радикалов и радикал – генерирующих систем [66, 67], или (ii) с участием химических реагентов нерадикальной природы, изменяющих какие-либо физико-химические свойства системы при взаимодействии с АО исследуемого образца [67, 68].

Разработанные для удобства использования и быстрого скрининга большого количества объектов, многие современные подходы к исследованию интегральных антиоксидантных параметров имеют как концептуальные, так и технические ограничения.

Поскольку результаты исследования антиоксидантных свойств и выводы относительно эффективности АО в конечном итоге необходимо интерпретировать по отношению к живым организмам, то в данном обзоре подходы к исследованию антиоксидантных свойств будут рассматриваться не с позиции выбранного режима регистрации сигналообразующей реакции, а с позиции **механизмов образования АКМ и действия АО в биологических средах.**

При рассмотрении действия АО в биологических средах (рисунок 1.7) с химической точки зрения превращения АО сводятся к трем механизмам [69,70]:

(i) реакции переноса электрона с АО на субстрат (реакция окисления АО);

(ii) реакции переноса атома водорода с АО на субстрат, которые в водных средах можно рассматривать как перенос протона, сопровождающийся переносом электрона (реакция окисления АО);

(iii) реакции переноса одной или нескольких пар электронов с образованием ковалентной связи по донорно-акцепторному механизму

(реакция комплексообразования АО с ионами металлов переменной валентности).

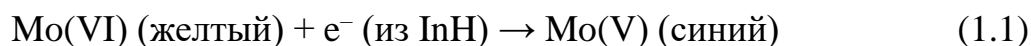
В зависимости от структуры соединения, окружения и различных других условий один тот же АО может участвовать либо по одному из трех механизмов, либо по двум или трем одновременно. Разнообразие механизмов биологического действия и химического превращения влечет за собой и разнообразие разработанных подходов для исследования антиоксидантных свойств соединений. Рассмотрим различные варианты интегральной оценки антиоксидантных свойств в соответствии с данными механизмами.

1.3.1 Оценка интегральных антиоксидантных параметров, основанная на реакции с переносом электрона

Варианты интегральной оценки антиоксидантных свойств, основанной на реакции с переносом электрона, представляют наиболее многочисленную группу, в которой антиоксидантное действие исследуемых образцов (модельных веществ или реальных объектов) моделируется с помощью реагента – окислителя. В большинстве таких способов, широко представленных в литературе, АО вступают в реакцию с флуоресцентным или окрашенным окислителем, что приводит к снижению интенсивности поглощения реагента. Степень уменьшения оптической плотности при заданной длине волны коррелирует с концентрацией АО в образце. Самыми распространёнными являются способ TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) на модели ABTS (2,2'-азино-бис-(этилбензтиазолино-6-сульфонат) [71] и способ DPPH (модель 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил) [72-74]. Напротив, в способах Фолина-Чокальтеу [75, 76], FRAP (Ferric reducing antioxidant power assay) [77, 78] и CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity) [79], наблюдается увеличение поглощения при заданной длине волны, когда АО реагирует с хромогенным реагентом. В способе CRAC (Ceric Reducing Antioxidant Capacity) нет видимого хромофора, оптическую

плотность оставшегося после реакции с АО Ce^{4+} регистрируют в разбавленном растворе серной кислоты при контролируемых условиях при 320 нм (то есть в УФ-области электромагнитного спектра) [80]. В подходах, основанных на реакции с переносом электрона измеряют термодинамическое превращение (окисление) АО по окончании окислительно-восстановительной реакции или в течение определенного периода. По сути дела, они направлены на измерение восстанавливающей способности соединений, которая хотя и напрямую не связана со способностью АО ингибировать АКМ, но тем не менее представляет собой очень важный параметр. Уравнения химических реакций, на которых базируются указанные способы можно представить следующим образом:

Метод Фолина-Чокальтеу (ФЧ):



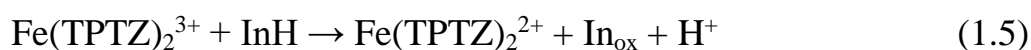
ABTS/TEAC:



DPPH:



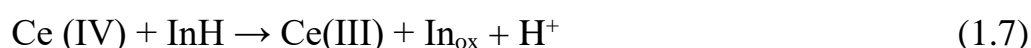
FRAP:



CUPRAC:



CRAC:



Рассмотрим основные способы, основанные на реакции с переносом электрона.

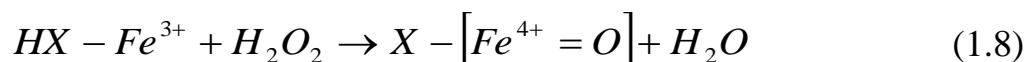
Способ Фолина-Чокальтеу (ФЧ). Известный реактив Фолина-Чокальтеу используется для определения общего содержания фенольных соединений. Реактив первоначально был предназначен для анализа тирозинсодержащих белков (содержащих остатки фенола) [75]. Много лет

спустя, был распространен на анализ общего количества фенолов в вине [76]. Способ Фолина-Чокальтеу приобрел высокую популярность и в настоящее время его обычно называют «методом определения общего содержания фенолов». В способе измеряется увеличение оптической плотности после взаимодействия реактива Фолина-Чокальтеу с различными фенолами. Реактив представляет из себя молибдофосфоровольфрамовая гетерополикислоту ($3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-13\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$). Последовательности обратимых одно- или двухэлектронных реакций восстановления приводят к синему окрашиванию раствора. Очевидно, что реактив Фолина-Чокальтеу неспецифичен для фенольных соединений и может быть восстановлен многими нефенольными соединениями (например, витамин С, Cu (I) и т. д.). Фенольные соединения реагируют с реактивом только в щелочных условиях ($\text{pH} \sim 10$). Диссоциация фенольного протона приводит к образованию фенолят-аниона, который также способен восстанавливать молибден. Этот факт еще раз доказывает механизм переноса электрона. Окрашенные соединения, образованные между фенолами и реактивом, не зависят от структуры фенольных соединений. Несмотря на неопределенный химический характер методика с применением реактива ФЧ удобна, проста и воспроизводима в отношении определения общего содержания фенолов. К сегодняшнему дню накоплен большой объем данных, и эта методика стала традиционно используется при изучении фенольных антиоксидантов. Однако авторами [81] показано, что анализ с использованием полифенолоксидазы для определения общего содержания фенолов является более специфичным.

К серьезным ограничениям этого подхода можно отнести то, что полученные данные не могут быть однозначно интерпретированы по отношению к организму, т.к. условия проведения анализа достаточно далеки от физиологических.

TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity* - антиоксидантная емкость в эквивалентах Тролокса). В основу этого подхода положена реакция образования катион радикалы $\text{ABTS}^{+\cdot}$ из 2,2-азинобис(3-

этилбензотиазолина-6-сульфоната), который интенсивно поглощает при длине волны 600 нм. АО исследуемого образца ингибируют развитие окраски образующихся $ABTS^{\bullet+}$. В оригинальной методике, разработанной Миллером и Райс-Эвансом [82, 83] (иногда ее называют ТЕАС I) использовалась двух ступенчатая реакция генерации катионного радикала $ABTS^{\bullet+}$ в системе метмиоглобин- H_2O_2 :



где $HX-Fe^{3+}$ – метмиоглобин;

$HX-[Fe^{4+}=O]$ – феррилмиоглобин.

Однако количественные антиоксидантные эффекты были двусмысленными, поскольку АО могли реагировать как с исходным окислителем (пероксидом водорода), так и с генерируемым радикалом $ABTS^{\bullet+}$, что приводило к получению заниженного результата величины антиоксидантной активности [84]. В дальнейшем способ ТЕАС был переработан с целью продуцирования чистого $ABTS^{\bullet+}$. В реализации этого подхода в качестве исходных окислителей использовали персульфат калия [85] и диоксид марганца [86, 87], после чего добавляли АО, которые напрямую реагировали с радикалом. В других вариантах этого подхода в качестве исходных окислителей использовали лакказу [88], $Br_2^{\cdot-}$ [89], H_2O_2 + пероксидаза хрена [90, 91] и пероксильные радикалы [92]. Предпочтительнее всего оказалось персульфатное окисление, при котором достигался высокий уровень выхода радикала $ABTS^{\bullet+}$ и относительная инертность к персульфату образовавшихся радикалов и исследуемых АО. Данная модификация используется в настоящее время (ТЕАС II, рисунок 1.9).

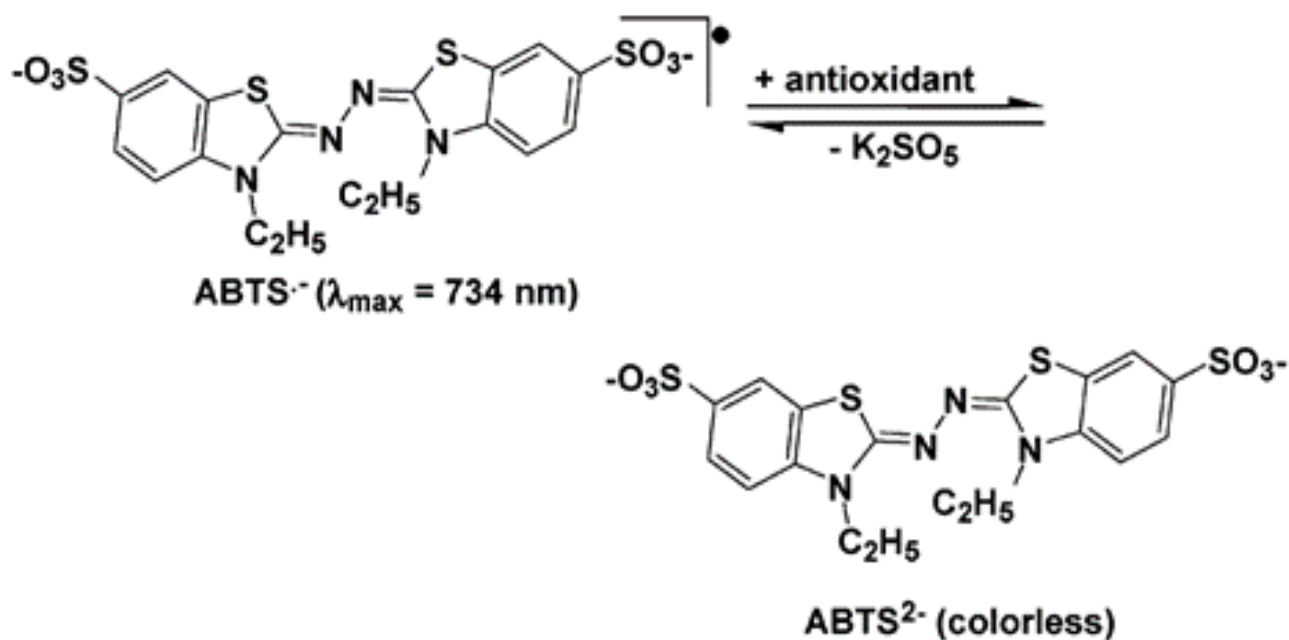


Рисунок 1.9 - Реакции генерирования $\text{ABTS}^{\bullet+}$ и его взаимодействия с АО (схема ТЕАС II)

Реализация способа ТЕАС II достаточно проста: регистрируют исходное поглощение реагента и поглощение раствора после добавления АО исследуемого образца в период времени реакции от четырех минут до нескольких часов. Значения АОЕ рассчитывают из соотношения измеренного уменьшения оптической плотности в реакции радикала с тестируемым соединением к уменьшению оптической плотности в реакции с Тролоксом (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбокси кислотой) - водорастворимым аналогом витамина E):

$$TEAC = \frac{\Delta A_{AO}}{\Delta A_{\text{Тролокс}}} \quad (1.10)$$

На практике ТЕАС рассчитывают несколькими способами, что создает проблемы при сравнении данных между лабораториями.

В целом, способ ТЕАС обладает множеством достоинств, которые способствуют его широкому применению при скрининге антиоксидантной активности широкого спектра объектов. Способ достаточно оперативен, прост, реакции с $\text{ABTS}^{\bullet+}$ протекают достаточно быстро и в широком диапазоне

pH. $ABTS^{\bullet+}$, являясь однозарядным положительным радикалом, растворим как в водных, так и в органических растворителях и не подвержен воздействию ионной силы раствора, поэтому он может использоваться в различных средах для исследования свойств АО как гидрофильной, так и липофильной природы. Реакции, на которых базируется способ, могут быть автоматизированы или адаптированы к микропланшетам [93], а также к проточно-инжекционному анализу [94].

Вместе с тем способ ТЕАС также имеет некоторые серьезные недостатки. Высокий коэффициент молярного поглощения $ABTS^{\bullet+}$ ($1,50 \cdot 10^4$ л·моль⁻¹·см⁻¹ при 734 нм [85]) ограничивает диапазон исследуемых концентраций антиоксидантов, которые могут быть достаточно точно определены оптическим методом (низкий предел обнаружения - 1,5-70 мкМ, узкий интервал линейности оптической плотности). Кроме того, для получения воспроизводимых результатов, многие факторы реакции должны тщательно контролироваться: окислитель, используемый для генерирования $ABTS^{\bullet+}$; контролирование pH и времени реакции генерирования $ABTS^{\bullet+}$; длина волны, выбранная для измерения; время и условия хранения раствора $ABTS^{\bullet+}$; температура анализа; концентрация кислорода в растворе. Все перечисленные факторы могут влиять на достоверность получаемых результатов.

Хотя способ ТЕАС в настоящее время широко используется в различных вариантах, его полезность и точность ставится под сомнение. Он скорее подходит для сравнительного изучения антиоксидантных свойств различных классов фенолов и экстрактов со смешанным составом как для возможного прогнозирования защитных эффектов, т.к. активность $ABTS^{\bullet+}$ в реакциях с фенолами контролируется прежде всего стерической доступностью фенольного –ОН фрагмента, а не химическими свойствами самого радикала; реакции $ABTS^{\bullet+}$ с АО сложны и трудно интерпретируются с точки зрения механизмов антиоксидантного действия; метод позволяет определить стехиометрию взаимодействия радикала с АО, но не может дать информации о скорости реакции, которая является одним из управляющим факторов в

реальных биологических объектах; возможно протекание неспецифических побочных реакций; сам радикал $ABTS^{+\bullet}$ не является точной моделью радикальных реакций в биологических системах; соединения, которые вносят значительный вклад в антиоксидантное действие *in vivo*, включая белки и глутатион (GSH), плохо реагируют или вообще не вступают в реакцию с $ABTS^{+\bullet}$.

Кроме того, значения ТЕАС для чистых модельных растворов АО не показывают четкой корреляции между значениями ТЕАС и количеством электронов, которые могут переноситься с АО на окисляемый субстрат. Так, значения ТЕАС для аскорбиновой кислоты (1.05), для α -токоферола (0.97), глутатиона (1.28), мочевой кислоты (1.01) почти одинаковы, хотя глутатион способен отдавать один электрон (с образованием димера - окисленного глутатиона), тогда как другие АО являются двухэлектронными восстановителями. Феруловая кислота (1.90) и п-кумариновая кислота (2.00) имеют сопоставимые значения ТЕАС. Однако, у кофейной кислоты значение ТЕАС 1.00, хотя ее структура аналогична структуре феруловой кислоте. Разность значений ТЕАС между кверцетином (3.00) и кемпферолом (1.00) также весьма удивительна, поскольку они имеют аналогичные химические структуры [56].

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил представляет собой стабильный радикал с глубокой фиолетовой окраской, реакция которого с другими радикалами или восстанавливающими агентами приводят к уменьшению поглощения при 515 нм и потере его парамагнитных свойств (рисунок 1.10), сопровождающийся падением сигнала ЭПР [95, 96].

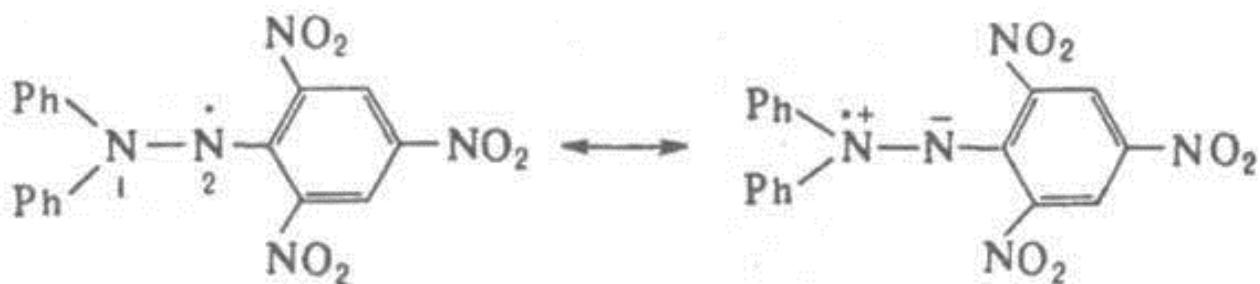


Рисунок 1.10 - Структура радикала 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила

Способ является одним из самых простых и менее дорогостоящих, за счет чего стал популярным и широко используется в различных лабораториях. Кристаллы DPPH растворяют в метаноле или этаноле, регистрируют исходную оптическую плотность раствора DPPH* и оптическую плотность после проведения химической реакции с исследуемыми АО в течение 30 минут. Результат может быть представлен, как процент неизрасходованного DPPH*:

$$\%DPPH_{\text{ост}} = 100 \cdot [DPPH]_{\text{ост}}/[DPPH]_{\text{исх}} \quad (1.11)$$

$\%DPPH_{\text{ост}}$ пропорционален концентрации АО в исследуемом образце.

Также результаты измерения могут быть представлены таким параметром, как EC50, показывающим сколько времени затрачивается на уменьшение концентрации DPPH* на 50 % (т.е. уменьшение оптической плотности или сигнала ЭП наполовину). Время рассчитывается из кинетической кривой и обозначается T_{EC50} . Авторы [97] классифицировали кинетическое поведение антиоксидантных соединений следующим образом: <5 мин (быстрое), 5-30 мин (промежуточное), > 30 мин (медленное) и предложили параметр, называемый «антирадикальная эффективность (АЭ)»:

$$АЭ = (1/EC_{50})T_{EC50} \quad (1.12)$$

Способ DPPH технически прост, но некоторые недостатки сильно ограничивают его применение. DPPH представляет собой долгоживущий радикал, который не имеет сходства с высокореактивными пероксильными и другими кислородными радикалами, участвующих в окислительных реакциях в организме. Многие АО, которые быстро реагируют с пероксильными радикалами, с DPPH могут реагировать медленно или даже могут быть инертным по отношению к нему. Так, например, значение T_{EC50} составляет 1,15 минут для аскорбиновой кислоты и 103 минуты для рутина. Следовательно, АЭ, определенная данным способом не пропорциональна ни концентрации АО, ни скорости их взаимодействия с радикалом, поэтому само значение антирадикальной эффективности не несет какой-либо определенной информации. Кроме того, известно, что с некоторыми АО, в частности, с

эвгенолом реакция носит обратимый характер [73]. Это может привести к получению заниженных результатов при анализе образцов, содержащих эвгенол и другие фенолы с аналогичной структурой (например, о-метоксифенол). Стоит также отметить, что DPPH[•] является стабильным радикалом и также, как радикал ABTS^{•+} не является точной моделью радикальных реакций в биологических системах. Нельзя не отметить также влияние pH, изменение которого приводит к существенному изменению ионизационного равновесия фенолов и влияет на величину константы скорости реакции [98].

FRAP (*Ferric reducing antioxidant power assay - железо-восстанавливающая антиоксидантная сила*). В способе FRAP в качестве модели окислителя используется комплексная соль трехвалентного железа $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]\text{Cl}_3$, (TPTZ лиганд 2,4,6-трипиридил-триазин) [77], который при переносе электрона с АО восстанавливается до $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]\text{Cl}_2$ интенсивно поглощающим при длине волны 593 нм. Рисунок 1.11 демонстрирует схему реакции переноса электрона.

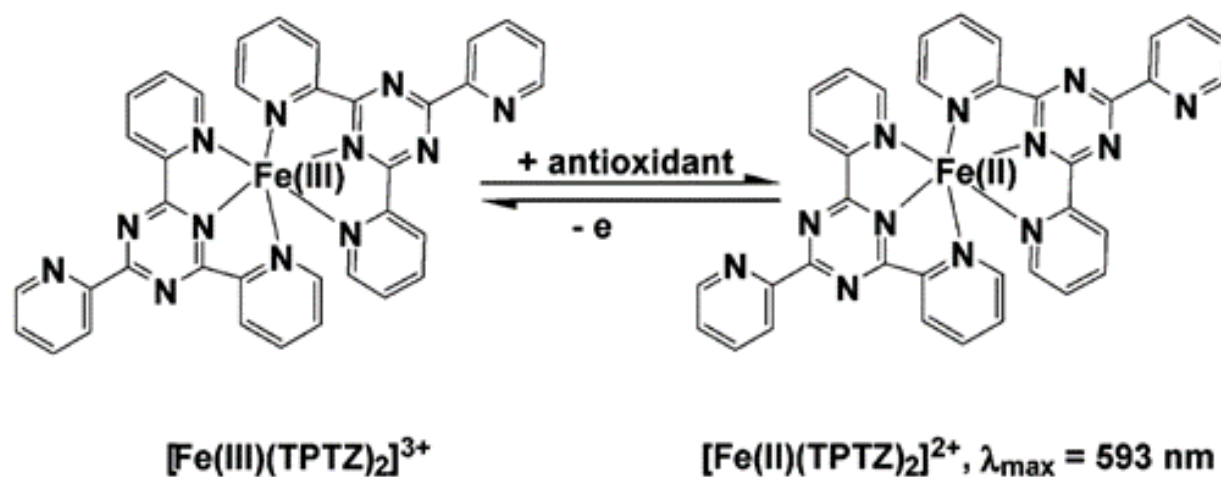


Рисунок 1.11 - Схема реакции восстановления иона $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$

Способ FRAP является достаточно простым в реализации. Приготовление «Реагента FRAP» осуществляют смешиванием 1,67 мМ Fe (III)

и 0,83 мМ ТРТЗ, при этом в конечном растворе присутствуют как комплекс $[\text{Fe}(\text{TRTZ})_2]^{3+}$, так и свободные ионы Fe(III) (стехиометрия в реакции комплексообразования между Fe(III) и ТРТЗ составляет от 1 до 2). Увеличение оптической плотности комплекса $[\text{Fe}(\text{TRTZ})_2]^{2+}$ при добавлении исследуемого образца фиксируют в течение 4 минут с интервалом в 15 секунд. Результат рассчитывают по отношению увеличения оптической плотности ΔA при добавлении стандартного раствора Fe(II). Изменение оптической плотности при этом прямо пропорционально концентрации антиоксиданта. Т.е. результат метода определяет количество АО восстанавливающих 1 моль Fe (III) до Fe (II). Так, по способу FRAP соотношения в реакции с $[\text{Fe}(\text{TRTZ})_2]^{3+}$ для аскорбиновой кислоты, R-токоферола и мочевой кислоты идентичны и составляют 2,0, а для билирубина – 4. Эти результаты противоречат тому, что и аскорбиновая кислота, и билирубин являются двухэлектронными восстановителями. Известно, что при окислении билирубина с передачей 2 электронов и 2 протонов образуется биливердин, который, по-видимому, также поглощает при 593 нм, причем молярный коэффициент поглощения биливердина составляет $\varepsilon_{593}=1 \cdot 10^4$, т.е. соизмерим с коэффициентом поглощения раствора $[\text{Fe}(\text{TRTZ})_2]^{2+}$ [99].

Наличие свободных ионов металлов переменной валентности, в частности Fe (III), может привести к потенциальным проблемам, так как в реальных образцах (биологических объектах и пищевых продуктах) содержится большое количество соединений, способных хелатировать ионы металлов, что может сказаться на погрешности измерения оптической плотности.

Способ FRAP реализуется в кислой среде при pH 3,6, что накладывает на способ, как минимум, следующие ограничения: сильное отклонение от физиологических условий организма и снижение реакционной способности АО фенольного происхождения. Исследование способом FRAP некоторых полифенолов в различных растворителях [100] показали, что увеличение оптической плотности не прекращается через 4 минуты, вместо этого ее

значения медленно увеличивались даже через несколько часов. К таким соединениям относятся кофейная, дубильная, феруловая, аскорбиновая кислоты и кверцетин. Значения FRAP этих соединений не могут быть получены точно при измерении оптической плотности в течение рекомендованных 4 минут. Также метод FRAP не позволяет определять тиольные антиоксиданты (цистеин и глутатион) [101, 102], которые являются важными компонентами антиоксидантной системы защиты организма.

В литературе также встречаются варианты способа FRAP, где в качестве модели окислителя используют комплексы ионов Fe (III) с фенантролином и феррицианид-ионами [103].

CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity - медь-восстанавливающая антиоксидантная способность). Способ определения антиоксидантной емкости [79], основанный на измерении поглощения хромофорного комплекса Cu (I) с неocupроином (Nc, 2, 9-диметил – 1, 10-фенантролин), образованного в результате окислительно-восстановительной реакции АО с реагентом CUPRAC (комплекс Cu (II) с неocupроином $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^{2+}$, рисунок 1.12). Максимум поглощения образованного комплекса $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+$ регистрируется при длине волны 450 нм.

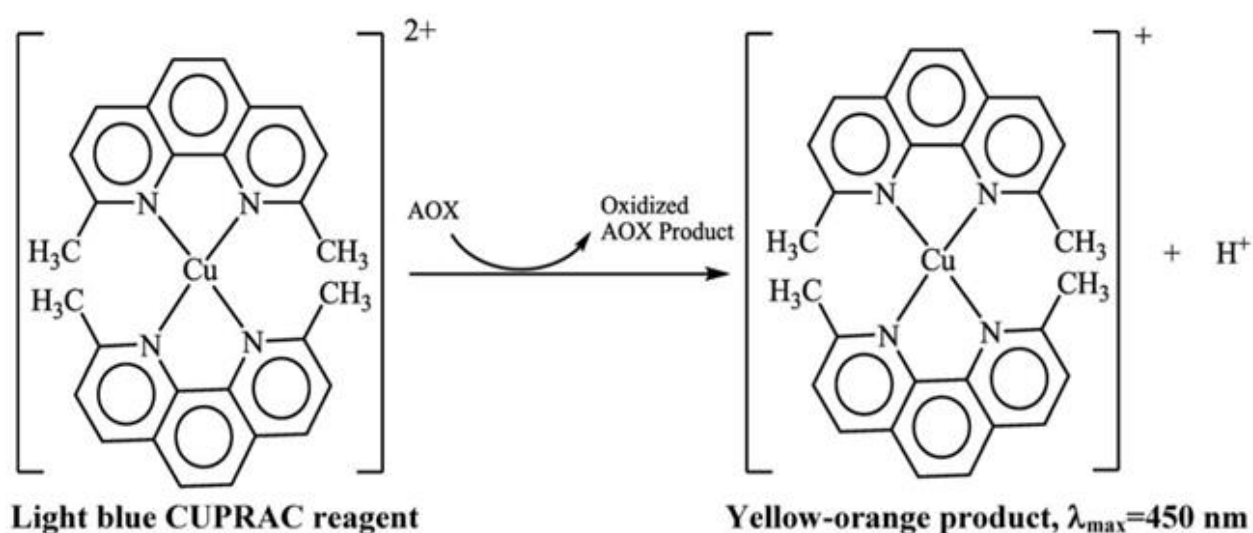
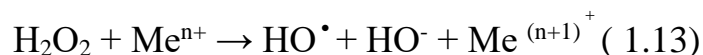


Рисунок 1.12 - Схема реакции восстановления реагента CUPRAC

Способ CUPRAC успешно применяется для измерения антиоксидантной емкости пищевых продуктов и биологических объектов. При анализе сыворотки крови АОЕ определяли как для гидрофильных, так и для липофильных АО. АОЕ гидрофильной фракции определяли после осаждения белков HClO_4 , АОЕ липофильной фракции, содержащей, такие АО как α -токоферол и β -каротин, определяли после экстрагирования гексаном с последующим выпариванием, оптическую плотность комплекса, образующиегося в реакции реагента CUPRAC с АО измеряли в дихлорметане [104].

В настоящее время способ CUPRAC имеет несколько модификаций. Одна из них – способность дезактивировать гидроксильные радикалы (hydroxyl radical scavenging activity). При измерении поглощающей способности гидроксильных радикалов для генерирования последних использовалась реакция Фентона [105]:



Константа скорости дезактивации гидроксильных радикалов гидрофильными АО определялись методом конкурентной кинетики [106]. В этом варианте способа реакцию Фентона останавливали в конце 10-й минуты добавлением каталазы для разложения перекиси водорода и прекращения генерации OH^\bullet [107]. В другом модифицированном способе CUPRAC генерируется супероксид анион-радикал в реакционной системе ксантин-ксантинооксидаза, ингибирование генерирования O_2^\bullet определяют при добавлении полифенолов к системе [108]. Активность в отношении дезактивации пероксида водорода (hydrogen peroxide scavenging (HPS) activity) полифенолами определяют в присутствии $\text{Cu}(\text{II})$ (в качестве катализатора) способом HPS-CUPRAC [109]. Путем иммобилизации $\text{Cu}(\text{II})$ - Nc реагента на перфторсульфонатную катионообменную полимерную мембранную матрицу (Nafion®) разработан оптический антиоксидантный датчик (датчик CUPRAC) [110].

Преимущества способа CUPRAC можно суммировать следующим образом [111, 112]:

- Реагент CUPRAC достаточно быстро реагирует с широким кругом АО, включая соединения тиольной природы.
- Способ прост в реализации, не требует сложного оборудования и высококвалифицированных операторов и может применяться в обычных лабораториях с использованием стандартных колориметров. Возможно исследовать как гидрофильные, так и липофильные фракции объектов.
- Реагент CUPRAC достаточно устойчив и может быть иммобилизован на поверхности катионообменного полимера для создания недорогого сенсора.
- Окислительно-восстановительная реакция осуществляется при значении рН близком к физиологическому (рН 7 аммоний-ацетатный буфер) в отличие от условий других способов (рН 3,6 для FRAP или рН 10 в способе Фолина). В более кислых условиях, чем физиологический рН, восстанавливающая способность АО снижается из-за реакции протонирования АО, в щелочных средах механизмы окисления АО носят другой характер, отличный от их превращений *in vivo*.
- Поскольку ион Cu (I), являющийся продуктом окислительно-восстановительной реакции CUPRAC, находится в хелатированном состоянии [то есть Cu (I) -Nc], он не может действовать как прооксидант, который может вызвать окислительное повреждение биологических макромолекул в жидкостях организма. В способе FRAP наличие свободных ионов железа в присутствии H₂O₂ может инициировать реакции типа Фентона с образованием OH[•] (уравнение 12), тем самым проявлять свойства прооксиданта. Показано, что стабильный комплекс Cu(I) с неocupроином не реагирует с H₂O₂, но возможна реакция окисления перекиси Cu (II) –Nc.

CRAC (Ceric Reducing Antioxidant Capacity - церий-восстанавливающая антиоксидантная способность). Способ церий-восстанавливающей антиоксидантной способности основан на изучении окисления антиоксидантов сульфатом церия (IV) в разбавленной серной кислоте при

комнатной температуре. Восстанавливающая способность исследуемого образца измеряется в подобранных особым образом условиях (концентрации окислителя и pH раствора). Спектрофотометрическое определение оставшегося Се (IV) проводят после завершения реакции с антиоксидантами при длине волны 320 нм [80]. В качестве стандартов для исследования флавоноидов и фенольных кислот используют кверцетин и галловую кислоту соответственно, а результаты антиоксидантных измерений рассчитываются в эквивалентах тролокса. Разработанная методика была успешно применена в оценке общей антиоксидантной способности растительных экстрактов [113]. Общая антиоксидантная способность рассчитывали в эквивалентах тролокса, галловой кислоты и кверцетина. Полученные результаты антиоксидантной способности образцов растительных экстрактов были сопоставимы со способами TEAC [82, 85] и CUPRAC [79, 104]. Способ CRAC, как другие вышеописанные оптические методы имеет ряд ограничений, связанных с возможным наложением спектров поглощения модельного окислителя и исследуемых проб, т.е. в видимой области существуют сложности с анализом окрашенных объектов, а в УФ области спектра - с анализом неокрашенных объектов.

Из вышеописанных примеров видно, что в литературе уделено большое внимание оптическим методам, основанным на реакциях АО с переносом электрона, тогда как механизм этого процесса имеет электрохимическую природу. По сути дела, в этих методах сигналообразующей является простая окислительно-восстановительная реакция между модельным окислителем и АО, которую в общем случае можно представить следующим образом:



Поэтому вполне логично, что для изучения процесса переноса электрона предпочтительнее использовать электрохимические методы. В последнее десятилетие эти методы очень активно развиваются [51, 114], опубликовано большое количество оригинальных работ, но, к сожалению, до сих пор в обзорных статьях по данной тематике электрохимические методы

недостаточно освещены. Кроме того, электрохимические методы отличаются простотой эксплуатации, низкой стоимостью оборудования, экспрессностью, низким пределом обнаружения [115-119], возможностью реализации как в портативном, так и в проточном вариантах анализа [120-122]. Так авторы [123] описывают вариант способа CRAC, применяя простую методологию изучения прямого переноса электрона с использованием метода хроноамперометрии, позволяющей регистрировать уменьшение концентрации ионов Ce(IV) . Альтернативой способу Фолина-Чокальтеу может служить способ электрохимического анализа [124], основанный на переносе электронов с фенольных антиоксидантов на стеклоуглеродный электрод. Поскольку фенольные АО имеют достаточно близкие потенциалы окисления, детектирование интегрального параметра обеспечивает ток окисления всех фенольных АО при заданном потенциале. Авторами [124] введен термин «полифенольный индекс», соответствующий суммарной концентрации фенольных соединений.

В литературе описаны и новые электрохимические подходы [125, 126], которые могут стать альтернативой способу на модели DPPH в оптическом варианте, как он распространён в настоящее время. О реакции переноса электрона с АО на молекулу DPPH в первом случае судят по падению амперометрического сигнала на стеклоуглеродном электроде, во втором – по изменению предельного диффузионного тока DPPH до и после взаимодействия, который регистрируют на вращающемся дисковом электроде. Исследованы антиоксидантные свойства как индивидуальных веществ, так и реальных образцов (чай, кофе, соки, вина, оливковое масло) [127-130]

Успешно развиваются кулонометрические методы исследования АО с электрогенерированными титрантами, в основу которых также положена реакция переноса электрона с АО на модельные окислители, полученные в результате электролиза при определенных условиях [131]. В качестве модельных окислителей в основном используют галогены [132-138], но в

последние годы опубликованы работы с электрогенерированием и других модельных окислителей, в частности гексацианоферрата железа [139]. Метод кулонометрии с электрогенерированными титрантами имеет большое преимущество перед другими методами, т.к. является безэталонным, не требует приготовления стандартных растворов, а соответственно и необходимости их хранения. При условии соблюдения 100% выхода по току при генерировании модельного окислителя, можно добиться очень высокой точности измерения.

1.3.2 Оценка интегральных антиоксидантных параметров, основанная на реакции с переносом атома водорода

В подходах, основанных на реакциях с переносом атома водорода, измеряется способность антиоксиданта «гасить/перехватывать» свободные радикалы (как правило, пероксильные радикалов, считающихся биологически более приближенными к реакционноспособным кислородным радикалам, образующихся в организме) посредством отрыва атома водорода. Механизм данного типа реакций в отношении антиоксидантного действия, который сводится к переносу атома водорода АО на радикал ROO^{\bullet} , можно суммировать следующим образом:



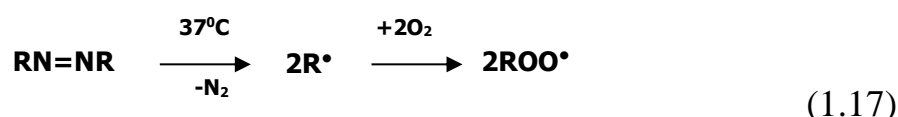
где ROO^{\bullet} - пероксильный радикал, $ROOH$ – органическая перекись.

Эффективные АО должны реагировать со свободными радикалами быстрее, чем биомолекулы, тем самым защищая последние от окисления. В основном, в подходах, основанных на реакциях переноса атома водорода используют окисляемые флюоресцирующие субстраты (фикоэритрин, флюоресцин, люминол), а антиоксиданты реагируют с ROO^{\bullet} , в результате чего происходит спад флюоресценции. В этой ситуации антиоксидантная активность может быть определена из кинетики конкурирующих реакций

путем измерения разности площади под кинетической кривой флуоресценции в отсутствие и присутствии антиоксидантов [140, 141].

К самым распространенным способам, основанным на реакциях с переносом атома водорода, относятся определение поглотительной способности кислородных радикалов (Oxygen radical absorption capacity - ORAC); определение общей способности к улавливанию радикалов (Total radical trapping parameter - TRAP) с использованием R-фикоэритрин (R-PE) в качестве флуоресцирующего агента; определение способности обесцвечивания кроцина (Crocin bleaching assay – CBA) с использованием в качестве генератора радикалов 2,2'-азобис-2-амидинопропана гидрохлорида (AAPH) и определения способности обесцвечивания β -каротина [140, 141].

ORAC (Oxygen radical absorption capacity - способность абсорбировать кислородные радикалы). Способ ORAC основан на работах Глейзера [142], Джизели с соавторами [143], и Као с соавторами [144]. В качестве модели генерирования радикалов используется азоинициатор AAPH в результате термического разложения которого (в присутствии достаточного количества кислорода) образуются пероксильные радикалы по реакции:



Затем пероксильные радикалы реагируют с флуоресцирующим агентом.



Если в исследуемом образце содержатся АО, то флуоресценция снижается за счет расходования пероксильных радикалов по реакциям (15, 16). Антиоксидантная активность определяется сравнением снижения флуоресценции в присутствии и отсутствие антиоксидантов. Измерения могут выполняться как вручную с использованием кюветы, так и могут быть автоматизированы с использованием микропланшетов.

Изначально способ ORAC был разработан с использованием флуоресцентного белка β -фикоэритрина (B-PE) в качестве радикальной

мишени [142-145]. Способ был автоматизирован с использованием центробежного анализатора Cobas Fara II [146] и применялся для определения антиоксидантной емкости чая и фруктов [147], экстрактов овса [148] и овощей [149]. Позже, из-за проблем со светочувствительностью и связыванием полифенолов, β -фикоэритрин был заменен флуоресцеином [150]. Эффекты радикального тушения отражаются в увеличении периода активного распада флуоресцеина и в снижении скорости распада. Типичные кривые флуоресценции приведены на рисунке 1.13.

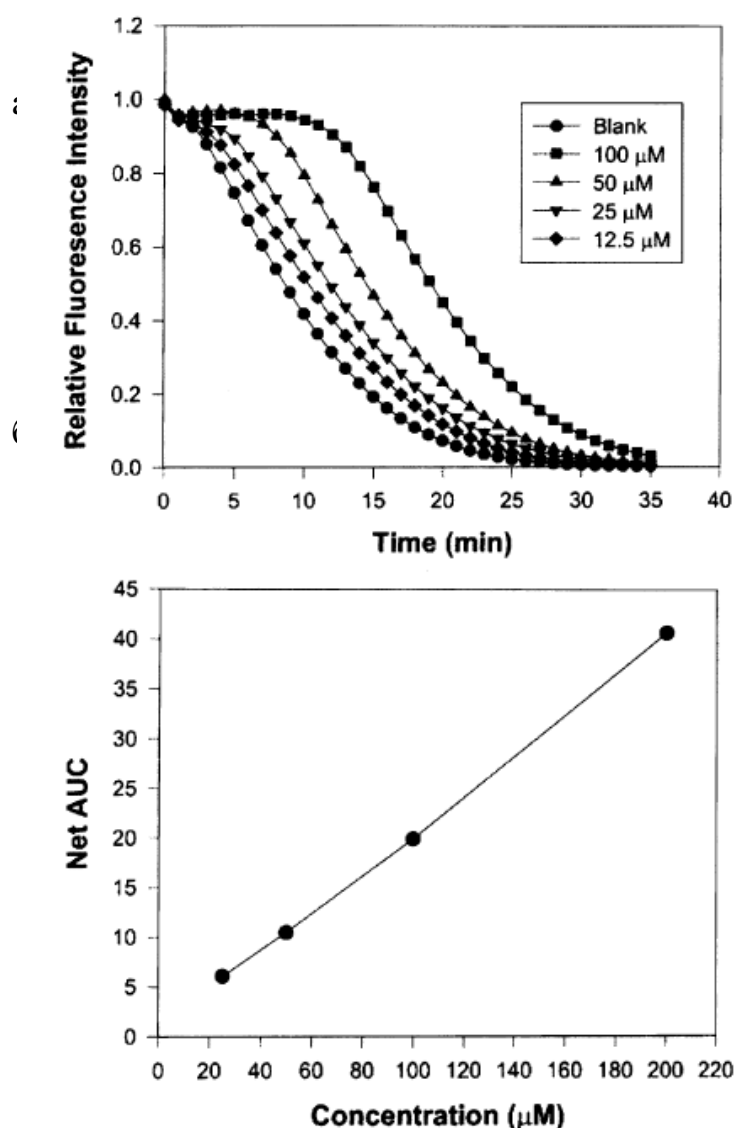


Рисунок 1.13 - Кинетическая кривая флуоресценции флуоресцеина в присутствии токоферола различной концентрации и ААРН (а). Линейный график зависимости площади под кривой флуоресценции от концентрации токоферола(б) [151]

Результаты анализа выражаются по отношению к стандартному образцу токоферола или тролокса следующим соотношением [150]:

$$\text{ORAC} = [(AUC_{\text{AO}} - AUC_0) / (AUC_{\text{Trolox}} - AUC_0)] M_{\text{Trolox}} / M_{\text{AO}} \quad (1.19)$$

где AUC – площадь под кривой (area under the curve), AUC_0 – в отсутствие, AUC_{AO} – в присутствии АО, AUC_{Trolox} – в присутствии тролокса.

или

$$\text{ORAC} = (AUC_{\text{AO}} - AUC_0) / (AUC_{\text{Trolox}} - AUC_0) \quad (1.20)$$

если молярная масса не известна.

В зависимости от модельной реакции генерирования радикалов различают модификации способа ORAC. Этими же авторами предложен вариант способа на модели генерирования гидроксильных радикалов [152]. Способ использован для определения липофильных антиоксидантов [151], анализа плазмы [153], биологических материалов и продуктов питания [154-156].

Одним из серьезных ограничений ORAC является способ выражения результата анализа - поглощающей способности кислородных радикалов. При анализе чистых модельных растворов он является достаточно простым. Однако, принимая во внимание возможность связывания тролокса с различными экстрактами, наличие образцов неизвестного состава и концентрации, данный расчет может стать источником одного из самых серьезных ограничений способа ORAC. В этих случаях единицы $\text{ORAC} = \text{ммоль тролокса}$, однако не понятно по отношению к какому количеству образца (мл, л, г и т.д.). Так, например, сухие продукты имеют значения ORAC на порядок выше, чем свежие продукты с высоким содержанием влаги. Данный факт затрудняет интерпретацию результатов.

TRAP (Total radical trapping parameter - общая способность к улавливанию радикалов). Способы TRAP основываются на оригинальных исследованиях Уайнера с соавторами, предложенных в 1985 [157-159]. В способе TRAP определяют способность антиоксидантов препятствовать реакции между пероксильными радикалами и флюоресцирующим агентом. Способы,

относящиеся к TRAP анализу можно рассматривать как варианты способа ORAC, в которых расширен круг используемых радикальных инициаторов и флюоресцирующих агентов. В качестве источника свободных радикалов/АКМ может также использоваться реакция термического разложения AAPH (источник пероксильных радикалов) [157-159], ферменты, такие как пероксидаза хрена (источник пероксида водорода) [160], система H₂O₂-гемин (источник гидроксильных радикалов) [161], NO[•] [162] или синглетный кислород [163]. В качестве флюоресцирующих агентов в способах TRAP используют диацетат дихлорфлуоресцеина [164], флуоресцин [163], фикоэритрин [165-166], люминол [160] и ABTS [167].

Типичная кинетическая кривая флуоресценции способа TRAP представлена на рисунке 1.14.

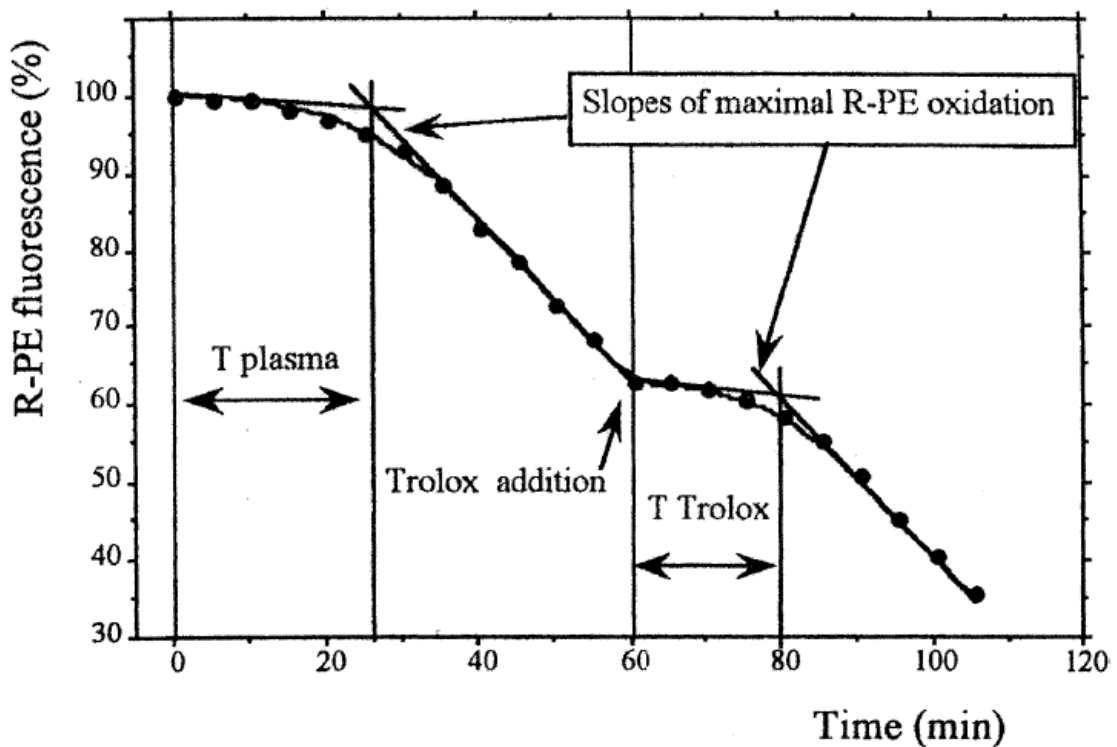


Рисунок 1.14 - Кинетика окисления R-фикоэритрина (R-PE), инициированная 5 мМ AAPH в присутствии плазмы до и после добавления Trolox [168]

Антиоксидантная емкость образцов рассчитывается сравнением периодов индукции, полученных в присутствии и в отсутствие тролокса.

$$C_{\text{тролокс}}/T_{\text{тролокс}} = X/T_{\text{плазма}} \quad (1.21),$$

где $C_{\text{тролокс}}$ - концентрация тролокса,

$T_{\text{тролокс}}$ – период индукции R-фикоэритина на кинетической кривой в присутствии тролокса,

X - антиоксидантная емкость плазмы,

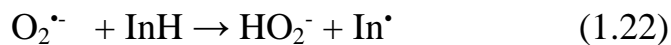
$T_{\text{плазма}}$ - период индукции R-фикоэритина на кинетической кривой в присутствии плазмы.

Тролокс добавляют к реакционной смеси, когда флуоресценция R-PE составляет 50% от исходного значения. Реакцию проводят до тех пор, пока скорость распада R-фикоэритина не выйдет на первоначальный уровень. Период индукции рассчитывают экстраполяцией кривых максимального окисления R-PE до и после введения Trolox (рис. 1.10.). Величина периода индукции зависит от силы АО, однако авторы [169] обнаружили, что измеренные периоды индукции для заведомо слабых АО приводят к завышенным результатам антиоксидантной емкости. Применение дихлорфлуоресцина в качестве флуоресцирующего агента сопровождается побочными процессами гидролиза [170]. Также стоит отметить, что способы TRAP имеют те же ограничения, что и способы ORAC.

Как уже отмечалось ранее, существует несколько основных видов АКМ (Таблица 1.1), вызывающих окислительное повреждение в организме человека. Противостояние этим АКМ осуществляется в организме путем вовлечения ферментативных и неферментативных АО. Например, супероксид-анион радикал ($O_2^{\cdot-}$) обезвреживается в организме супероксиддисмутазой (СОД), пероксид водорода (H_2O_2) – каталазой. Напротив, в основе повреждающего действия таких АКМ как пероксильный радикал (ROO^{\cdot}), гидроксил радикал (HO^{\cdot}), синглетный кислород (1O_2), пероксинитрил ($ONOO^{\cdot}$) лежат реакции с неферментативными АО, такими как витамины С и Е, которые обладают свойствами обезвреживать эти АКМ. Для

получения этой информации об антиоксидантных свойствах объектов, разработаны способы, основанные на реакции с данными АКМ. Наиболее часто используется пероксильный радикал, т.к. это ключевой радикал в автоокислении макромолекул, и он может быть сгенерирован удобным способом путем термического разложения азосоединений. Способы, основанные на изучении повреждающего действия таких АКМ как $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HO^{\cdot} , 1O_2 , $ONOO^-$ носят более специфический характер, именно поэтому некоторые авторы выделяют их в отдельную группу методов, тогда как по механизму взаимодействия с АО их можно отнести к способам, основанным на реакции переноса атома водорода [171]. Имеется ограниченное число работ, описывающих способы, основанные на определении способности дезактивировать $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HO^{\cdot} , NO^{\cdot} , $ONOO^-$. Рассмотрим некоторые из них.

Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) scavenging assays. (Определение способности дезактивации супер-оксиданион радикал). Способы определения способности дезактивации супероксид анион радикала основываются на использовании ферментативных систем для генерации $O_2^{\cdot-}$ с последующим измерением его расходования в реакциях типа



Наиболее часто для измерения расходования $O_2^{\cdot-}$ в биоаналитических методах используют систему ксантин-ксантинооксидаза при pH 7,4. Образующийся в реакции супероксид-анион радикал способен восстанавливать нитросиний тетразолий (НСТ) до формазана, который спектрофотометрически контролируют при 560 нм [172]. Способ был адаптирован к варианту использования с микропланшетами [173,174].

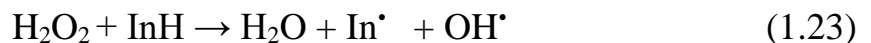
Кроме использования системы ксантин-ксантинооксидазы, известен способ, основанный на реакции с α -кетотиобарбитуровой кислотой и применением метода газовой хроматографии для измерения уменьшения концентрации $O_2^{\cdot-}$ [175, 176]. ЭПР спектроскопия также может быть использована для измерения поглощения $O_2^{\cdot-}$ [177, 178]. Опубликован способ, основанный на бесферментной системе генерации $O_2^{\cdot-}$ - реакции феназина

метосульфата в присутствии НАДФ. Для регистрации сигнала также используется реакция восстановления НСТ [172].

Другой подход для генерации $O_2^{\cdot-}$ - использование системы рибофлавин-метионин, в которой супер-оксиданион радикалы образуются из растворенного кислорода. Регистрацией сигнала также служит подавление окрашивания формазана при 560 нм, которое указывает на потребление $O_2^{\cdot-}$ [179].

Простота выполнения НСТ-теста долгое время способствовала достаточно широкому распространению этих способов, однако еще ранее установлено, что НСТ может легко восстанавливаться другими соединениями – донорами электронов (НАДФ, глюкозой, аскорбиновой кислотой, фруктозамин, мочевой кислотой, глутатионом, креатинином [180]. К завышенному результату также приводит и способность радикала НСТ восстанавливать молекулярный кислород с образованием супер-оксиданион радикала [181].

Hydrogen peroxide (H_2O_2) scavenging assays. (Определение способности дезактивации пероксида водорода). Реакцию неферментативных АО с H_2O_2 в общем виде можно представить следующим образом:



Один из наиболее распространенных способов оценки способности поглощения пероксида водорода основан на собственном поглощении H_2O_2 в УФ области при 230 нм [182-184]. Однако, вполне естественно, что компоненты образцов также могут поглощать при этой длине волны, что требует учитывать фоновое поглощение пробы [185]. Авторы [185] сообщают, что фоновое поглощение может сильно влиять на точность измерения. Кроме того, поглощение образцов может меняться после прохождения реакции с H_2O_2 .

В другом распространенном способе используется пероксидаза хрена, которая катализирует окисление пероксидом водорода флуоресцирующего реагента скополетина в нефлуоресцирующий продукт. В присутствии АО

окисление скополетина ингибируется, и результат реакции может быть зарегистрирован флуориметрически [186].

Hydroxyl radical (HO•) scavenging assays. (Определение способности дезактивации гидроксильного радикала). Реакцию АО с гидроксильным радикалом в общем виде можно представить следующим образом:



В организме гидроксильный радикал образуется в результате взаимодействия пероксида водорода с Fe (II) (реакция Фентона). Данную реакцию используют для генерации OH• в методах, измеряющих расходование гидроксильных радикалов. Однако использование смеси Fe (II) / H₂O₂ имеет существенные недостатки, поскольку многие АО могут изменять активность Fe (II) в модельной реакции в результате хелатирования. Этот приводит к тому, что различить хелатирующую способность АО и способность дезактивировать OH• становится практически невозможно. Кроме того, некоторые АО, находящиеся в пробе, могут действовать как прооксиданты посредством восстановления Fe (III) до Fe (II) и способствовать тем самым новой продукции OH•. Авторами [187] предложена реакция, подобная Фентону, но с использованием органических реагентов: смесь тетрагидрохинона (главного метаболита, широко используемого пентахлорфенола) и пероксида водорода. Изучено влияние некоторых хелатирующих агентов и показано, что на протекание реакции не оказывали влияние хелаторы металлов, таких как диэтиленetriаминпентауксусная кислота, батофенантролиндисульфоновая кислота, фитиновая кислота.

Гидроксильные радикалы относятся к самым реакционноспособным АКМ, мгновенно вступая в реакции с окружающими макромолекулами. Поэтому прямое удаление гидроксильного радикала антиоксидантами в биологической системе нереально, поскольку клеточная концентрация АО незначительна по сравнению с концентрацией других биологических молекул. Константы скорости для реакций OH• с АО были определены методом импульсного радиолиза [188], величина которых составила порядка 10⁸-10⁹ M⁻¹

$^1\text{c}^{-1}$. Однако, способность АО реагировать с гидроксильным радикалом вряд ли обеспечит защиту биологических молекул.

Nitric oxide radical (NO \cdot) scavenging capacity assays. (Определение способности дезактивации радикала оксида азота). Оксид азота NO \cdot относится к радикальным частицам и является важной клеточной сигнальной молекулой в организме млекопитающих [189], он обладает высокой реактивностью и имеет несколько секунд жизни. Радиус оксида азота (NO \cdot) играет важную роль в регуляции различных физиологических и патофизиологических процессах [190]. Авторами [191] разработан относительно простой способ количественной оценки NO-поглощающей способности серосодержащих соединений в водном растворе с использованием амперометрического NO-датчика. Авторы отметили, что значительной разрушающей способностью в отношении NO \cdot обладали только соединения, содержащие тиольную группу. В данном способе используется неконкурентный механизм реакции, так как в реакционной среде присутствует только реакционноспособный радикал и молекулы-перехватчики.

Разработан способ оценки поглощающей способности NO \cdot с использованием ЭПР-спектromетрии [192,193]. Оксид азота генерировали из 3-(2-гидрокси-1-метилэтил-2-нитрозогидразино)-N-метил-1-пропанамина, затем окисляли до NO $_2$ 2-(4-карбоксифенил)-4,4,5,5-тетраэтил имидозалин-1-окси-3-оксидом с образованием соответствующего радикала, дающий ЭПР сигнал. Способ был применен в исследовании действия нестероидных противовоспалительных препаратов. Основное ограничение этого способа состоит в его труднодоступности, длительности (время проведения реакции около 2 ч.).

Для оценки выработки NO \cdot клетками или ферментами также используют хорошо известную реакцию Грисса [194,195]. Реакция Грисса (рисунок 1.15) представляет собой двухступенчатое диазотирование, в котором NO-производный нитрозирующий агент (например, N $_2$ O $_3$), реагирует с сульфаниловой кислотой с образованием иона диазония, который затем

связывается с N-(1-нафтил) этилендиамином с образованием хромофорного продукта, поглощающего при 548 нм [196]. Хромофорный продукт, образованный из нитрита после реакции Грисса затем измеряют спектрофотометрически при 548 нм. Стандартные кривые были получены с использованием нитрита натрия, а результаты были выражены в процентах изменения NO^{\bullet} [197].

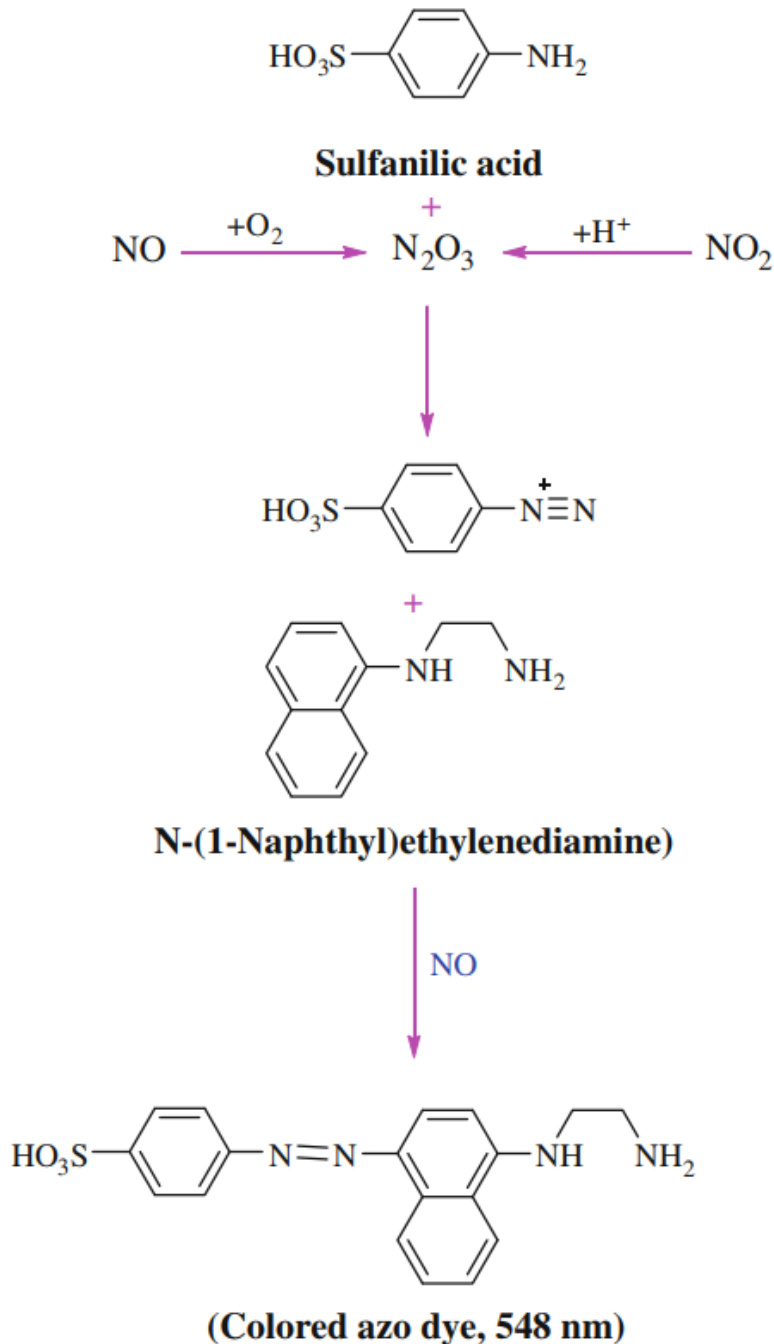


Рисунок 1.15 - Механизм детектирования оксида азота с использованием реактива Грисса

Для обнаружения NO• in vivo может использоваться флуоресцирующий агент 4,5-диаминофлуоресцеин [198]. Нитрозирование слабой флуоресцентной мишени 4,5-диаминофлуоресцеина производными NO, приводит к образованию сильно флуоресцирующего продукта триазолофлуоресцеина. Результаты выражаются в процентах ингибирования окисления 4,5-диаминофлуоресцеина как функция концентрации соединения, поглощающего NO. Тем не менее, результаты, полученные с использованием 4,5-диаминофлуоресцеин в качестве мишени для количественной оценки NO следует интерпретировать с осторожностью, поскольку некоторые АО (такие соединения, как аскорбиновая кислота и дегидроаскорбиновая кислота) могут реагировать непосредственно с 4,5-диаминофлуоресцеином и образовывать соединения с эмиссионными спектрами, аналогичными продукту зелено-флуоресцентного триазолофлуоресцеина [199].

Peroxynitrite (ONOO⁻) scavenging assays. (Определение способности дезактивации пероксинитрита). Супероксид-анион радикал и оксид азота реагируют с контролируемой диффузией скоростью ($k > 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) с образованием пероксинитрита [200].



O₂^{•-} и NO[•] сами по себе не являются сильными окислителями, их стандартные окислительно-восстановительные потенциалы составляют -0.33 и 0.39 В соответственно. Аддукт их взаимодействия ONOO⁻ также не является сильным окислителем, но протонированная форма пероксинитрита (ONOOH - пероксиазотистая кислота) является очень сильным окислителем (E° = 2,10 В). При физиологическом рН 7,4 соотношение пероксинитрита и пероксиазотистой кислоты составляет от 4 до 1. ONOO⁻ и ONOOH часто вызывает нитрование ароматических соединений, в частности тирозина (до нитротирозина). Существует не так много работ по определению повреждающей способности ONOO⁻. В основном используются два подхода: (1) изучение ингибирования реакции нитрования тирозина [201] и (2) изучение ингибирования реакции окисления дигидрородамина [202]. Авторы [201] исследовали способность

катехина и других полифенолов ингибировать реакцию нитрования тирозина. Предложенный подход основан на разделении и количественном определении методом ВЭЖХ и, следовательно, является очень длительным. Авторы [202] разработали другой способ, основанный на изучении ингибирования реакции окисления дигидрородамина пероксинитритом. Предложенным способом была изучена способность чаев ингибировать реакцию окисления дигидрородамина [203]. Первоначально этот подход был использован для количественного определения пероксинитритов. Авторы [204] использовали его для изучения повреждающей способности пероксинитрита и цитозащитной емкости экстрактов морских водорослей.

К способам, основанным на переносе атома водорода, также можно отнести некоторые способы с электрохимической детекцией результата этого переноса, которые подобно способам, основанным на реакциях с переносом электрона, недостаточно освещены в современной литературе, особенно в обзорных работах, хотя, несомненно они заслуживают большего внимания, т.к. обладают рядом преимуществ перед оптическими (люминесцентными) методами. Возможно это связано еще и с тем, что способы исследования антиоксидантных свойств с использованием электрохимических методов достаточно молодые по сравнению с оптическими. Рассмотрим некоторые из них.

В литературе описан вольтамперометрический метод определения суммарной антиоксидантной активности, где в качестве модельной реакции используется процесс электровосстановления кислорода, который реализуется в несколько стадий с генерацией на поверхности электрода активных форм кислорода [205]:



Результатом протекания реакции АО с образующимися кислородными радикалами (реакции 1.26, 1.27) являются уменьшение тока восстановления

молекулярного кислорода и смещение потенциала процесса в область положительных значений [206, 207].

Взаимодействие АО с протонированным супероксиданион радикалом происходит по механизму переноса атома водорода:



Разработанным новым способом изучен широкий ряд индивидуальных АО различной химической природы (полифенолы, витамины), а также экстракты из растительного сырья и биологические объекты [208, 209]. Показана высокая степень корреляции результатов, полученных предложенным вольтамперометрическим способом с результатами независимого спектрофотометрического способа на модели генерирования супероксид аниона в системе никотинамидадениндинуклеотид - феназинметасульфат [210].

Для оценки антиоксидантных свойств новым вольтамперометрическим способом введено два новых критерия: емкостной и кинетический [211]. Емкостной критерий показывает уменьшение интенсивности процесса электровосстановления кислорода при введении АО в раствор фонового электролита и определяется как:

$$K = \frac{I_j}{I_0} \cdot \frac{1}{C_{AO}} \quad (1.29),$$

где I_j – ток электровосстановления кислорода в присутствии АО, мкА, I_0 – ток электровосстановления кислорода в отсутствие АО в растворе, мкА; C – концентрация АО в растворе, г/мл.

Кинетический критерий показывает сколько кислородных радикалов ингибировано АО пробы в единицу времени и определяется как:

$$K = \frac{C_0}{t} \cdot \left(1 - \frac{I}{I_0}\right) \quad (1.30),$$

где I – ток электровосстановления кислорода в присутствии АО, мкА, I_0 – ток электровосстановления кислорода в отсутствие АО в растворе, мкА; C_0 – исходная концентрация кислорода в растворе, мкмоль/л, t – время протекания реакции, мин.

К недостаткам предложенного способа можно отнести то, что время жизни супероксид-анион радикала в приэлектродном пространстве в водных средах достаточно мало, поэтому для исследований предпочтительнее использовать апротонные среды [212].

Существует целая группа амперометрических ферментных биосенсоров для определения суммарных антиоксидантных свойств исследуемых образцов. На рисунке 1.16 представлена в общем виде схема анализа.

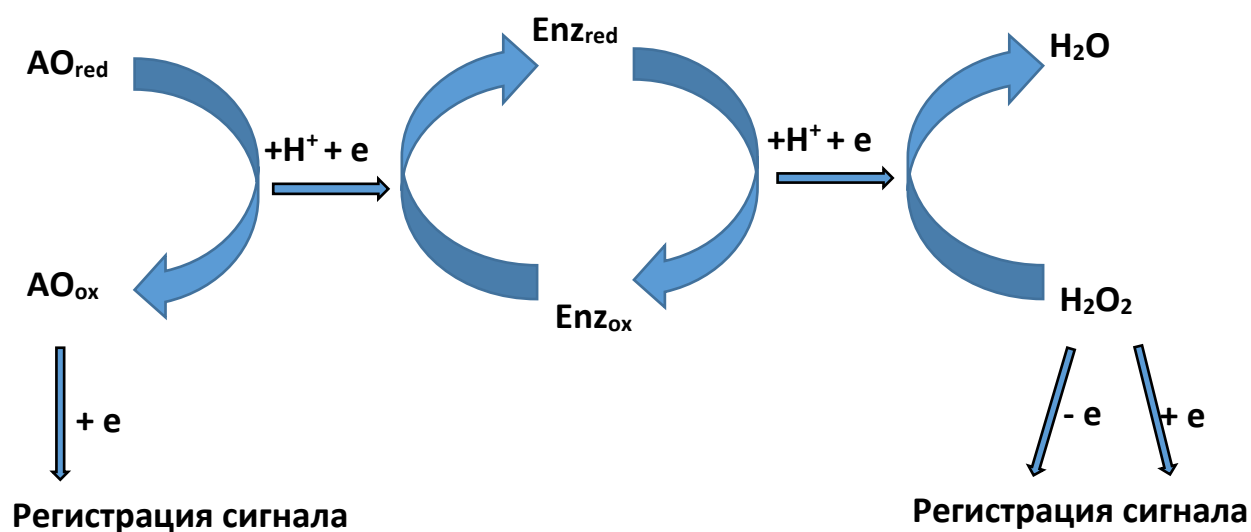


Рисунок 1.16 - Схема амперометрического отклика биосенсоров на основе пероксидаз на соединения с антиоксидантными свойствами или пероксид водорода (Enz – фермент, АО - антиоксидант)

В этих способах регистрацию амперометрического отклика можно зарегистрировать как по току восстановления окисленного антиоксиданта, так и по кинетике потребления пероксида водорода. Пероксид водорода относится к АКМ, а реакции пероксида водорода с АО протекают также по механизму протонно-электронного переноса, но с участием окислительно-восстановительных ферментов.

Амперометрические биосенсоры успешно применяются для определения суммарного содержания полифенолов в продуктах питания (чай, вино и др.). Содержание фенольных АО выражается в единицах катехина [213,

214] или хлорогеновой кислоты [215]. Показано, что общее содержание фенольных АО коррелирует с общей антиоксидантной емкостью, измеренной на модели стабильного радикалаДФПГ [215].

Общие антиоксидантные свойства также можно оценивать и по кинетике потребления пероксида водорода с использованием амперометрических ферментных сенсоров. Однако общим существенным недостатком этих сенсоров является необходимость использования ферментов. С одной стороны, ферменты являются неотъемлемым звеном антиоксидантной системы защиты организма, с другой стороны, их нестабильность и дороговизна сдерживает широкое применение таких способов.

Новый амперометрический способ определения АОА, где в качестве модели окислителя используется также перекись водорода, предложен авторами [216], в котором вместо ферментов используется берлинская лазурь (гексацианоферрат железа). Авторами показаны преимущества предложенного биосенсора перед ферментными такие как увеличение на три порядка константы скорости окисления и восстановления пероксида водорода, увеличение на три порядка селективности по отношению к восстановлению пероксида водорода [217]. Информацию об АОА получают на основании измерения уменьшения тока восстановления пероксида водорода. Полученные результаты хорошо согласуются со стандартным способом на модели перекисного окисления липидов, но при этом новый предлагаемый подход отличается простотой использования, дешевизной, что выгодно отличает его от ферментативных аналогов.

Предложен полярографический способ определения общей АОА, основанный на модели потребления пероксида водорода [218]. АОА оценивали по кинетике расходования пероксида водорода, аналитическим сигналом служил ток окисления H_2O_2 . Результаты анализа алкогольных напитков коррелировали с результатами, полученными на модели свободного

радикала 1,1-дифенил-2-пикрилгидразида (ДФПГ) и с общим содержанием полифенолов, определенных по методу Фолина-Чокальтеу [219, 220].

Авторами [221, 222] предложен способ исследования антиоксидантных свойств на модели электрогенерированных гидроксильных радикалов (Hydroxyl radical (HO[•]) scavenging assays). Причем электрохимическое генерирование радикалов имеет ряд преимуществ перед другими способами. Помимо известных преимуществ электрохимических методов, таких как низкая стоимость и простота автоматизации, степень и скорость реакции генерирования могут контролироваться природой анодного материала [223, 224]. В работе изучена кинетика взаимодействия гидроксильных радикалов с АО и продуктами их окисления, что представляет собой тоже очень важную информацию.

Аналогов способам ORAC и TRAP (основанных на модели генерирования пероксильных радикалов) с применением электрохимических методов регистрации переноса атома водорода к настоящему времени в литературе не найдено.

1.3.3 Оценка интегральных антиоксидантных параметров, основанная на реакции образования комплексов

Ранее показано, что большое внимание исследователей привлекает создание подходов к оценке антиоксидантных свойств объектов, основанных на реализации двух основных механизмов химического действия АО, связанных с переносом электрона и с переносом атома водорода. Существует еще третий механизм действия, связанный со способностью АО образовывать комплексы с ионами металлов переменной валентности [70]. Дело в том, что ионы металлов переменной валентности могут облегчать генерирование АКМ в организме животных и человека, а способность веществ хелатировать эти ионы может существенно влиять на процессы генерирования АКМ. Эффективные хелаторы ионов металлов переменной валентности могут также

обеспечить защиту от окислительного повреждения биологических макромолекул, так как ионы металлов участвуют в реакции генерирования $\text{HO}\cdot$ (реакции типа Фентона: Fe(II) с пероксидом водорода), являющиеся самыми высокореактивными радикалами и способствующие развитию окислительному стрессу [225].



Ионы Fe(III) также могут участвовать в реакции образования радикалов из пероксидов, хотя скорость этих реакций на порядок меньше, чем с ионами Fe(II) [226].

Еще в 1984 году Генри Фентон обнаружил, что в присутствие низкой концентрации солей железа и H_2O_2 , винная кислота окисляется до дигидроксималеиновой кислоты [105]. Затем авторы [227] предположили, что в разложении H_2O_2 , катализируемой солями железа, образуется промежуточный продукт $\text{OH}\cdot$, который представляет собой гораздо более реакционно способное соединение в реакция окисления, чем исходный пероксид водорода [228]. Позднее было обнаружено, что многочисленные ионы металлов в их нижних степенях окисления, такие как Cu^+ , Ti^{3+} , Cr^{2+} , Co^{2+} и их комплексы реагируют с пероксидом водорода по аналогии с реакцией Фентона [149, 152]. Исследования показали, что реакция переноса электронов между переходным металлом и пероксидом водорода происходит не по механизму передачи электронов с внешней сферы, а по механизму переноса электрона с внутренней сферы, при котором происходит образование промежуточного комплекса H_2O_2 с переходными металлами до процесса переноса электрона [229]. Поэтому, если переходный металл является координационно насыщенным, то он не реагирует с H_2O_2 с образованием гидроксильного радикала. Действительно, Халивел [230] показал, что хелаторы ионов железа ингибируют реакцию Фентона и, следовательно, предотвращают окислительный ущерб, вызванный образованием гидроксильного радикала в реакции Fe(II) с пероксидом водорода [149, 152].

Известно, что некоторые АО фенольной природы, содержащие в своей структуре катехоловые и галловые фрагменты, могут образовывать стабильные комплексы с металлами переменной валентности (рисунок 1.17), тем самым тормозить окислительные процессы на стадии разветвления цепей [58].

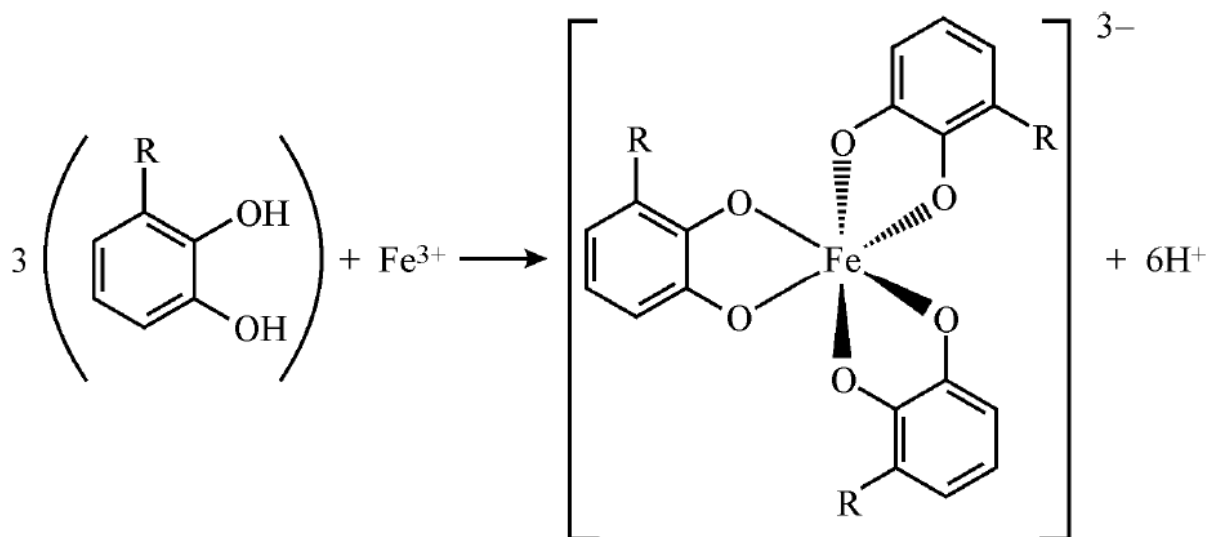


Рисунок 1.17 - Схема реакции комплексообразования ионов железа с катехолами

Согласно схеме 1.17 ионы железа способны координировать до трех молекул полифенолов. В таблице 1.5. приведены значения показателей ступенчатых и общих констант устойчивости некоторых комплексов фенолов, содержащих катехоловый и галловый фрагменты, с ионами железа.

Как видно из таблицы 1.5, значения показателей суммарных констант устойчивости для некоторых природных фенолов составляют от 13 до 46, что свидетельствует об их высокой комплексообразовательной способности. Для сравнения можно сказать, что значения показателя констант устойчивости ионов некоторых металлов (Cu, Zn, Co, Fe, Mn) с «классическим» комплексообразователем этилендиаминтетрауксусной кислотой составляет от 13 до 19. Полифенолы растительного сырья (особенно чая) являются эффективными хелаторами ионов металлов, так как содержат в своей структуре фрагменты эфиров галловой кислоты.

Таблица 1.5 - Показатели констант устойчивости комплексов некоторых полифенолов с ионами железа

Соединение	Fe ⁿ⁺ , n=	lgK ₁	lgK ₂	lgK ₃	lgβ	ссылка
+(-) Катехин	3	21.8	15.7	9.9	47.4	[231]
Катехол	2	7.95	5.55		13.5	[232]
	3	20.01	14.69	9.06	43.76	[233]
4-Нитрокатехол	3	18.29	14.17	9.2	41.66	[233]
Протокатеховая кислота	3	19.50	14.32	8.70	42.52	[234]
2,3-дигидробензойная кислота	3	7.7	4.0	24.0	35.7	[233]
3,4-дигидрофенилуксусная кислота	3				43.9	[235]
2,3-дигидрокси-N,N-диметилбензамид	3	17.8	13.9	8.5	40.2	[236]
4,5-дигидроксибензол-1,3-дисульфонат (тайрон)	3	20.4	15	10.4	45.8	[232]
Галловая кислота	2	7.0				[237]
	3	14	8.5	5	27.5	[328]
Метилгаллат	3	12.4	11.7	9.93	34.03	[239]
Кверцетин	2	9.44	3.86		13.3	[240]
	3				44.2	[241]
Рутин	3				44.1	[241]

K_n – константа устойчивости n-ной ступени реакции комплексообразования

β – суммарная константа устойчивости

Таким образом, изучение хелатирующих свойств биосоединений также может служить хорошим подходом при исследовании антиоксидантных свойств. Это подтверждают многочисленные данные исследования

взаимосвязи между повышенным уровнем содержания свободных ионов железа в организме человека и животных с повышенным риском различных заболеваний, таких как сосудистые болезни, рак и некоторые неврологические состояния [242, 243]. Показано, что железо-индуцированные свободные радикалы приводят к повреждению ДНК (рисунок 1.18), что, по-видимому, является существенным звеном в развитии рака, так как раковые клетки, быстро растут в ответ на увеличение содержания железа [244, 245].

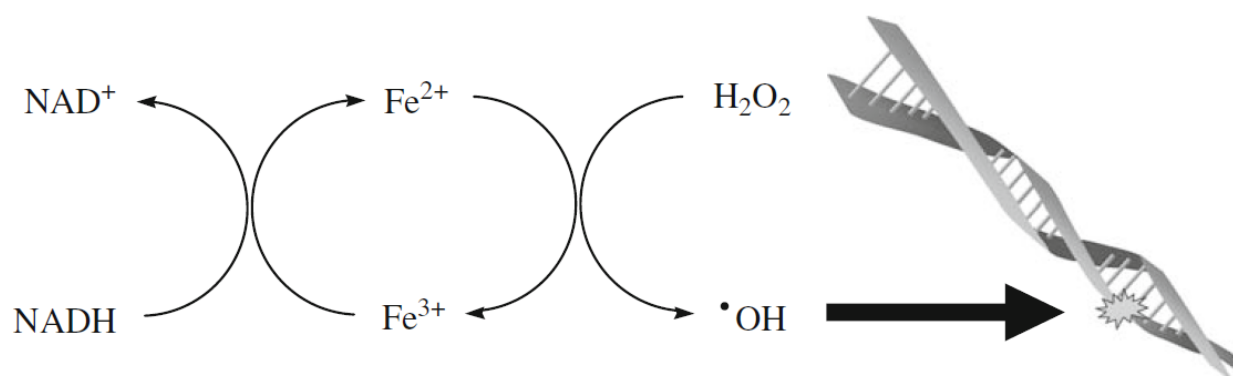
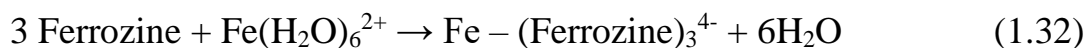


Рисунок 1.18 - Механизм повреждения ДНК гидроксильными радикалами, вырабатываемыми в реакции Фентона [246]

Железо является важным элементом для всех живых клеток и играет жизненно важную роль как компонент гемсодержащих белков и как кофермент для негемсодержащих ферментов [247, 248]. В составе всех окислительно-восстановительных ферментов, которые участвуют в метаболизме молекулярного кислорода, входят переходные металлы, такие как железо, меди, никель, цинк, молибден, кобальт и др. Эти элементы являются чрезвычайно опасными, если присутствуют в виде свободных ионов. Эффективные хелаторы свободных ионов обеспечивают защиту от окислительного повреждения. Ионы железа Fe²⁺ являются наиболее мощными прооксидантами среди различных видов ионов металлов [249, 250]. Как форма для обеспечения безопасности его доступности и защиты от токсических эффектов свободных ионов железа, металл связан с различными пептидами и

белками, среди которых наиболее важным является железосодержащий белок ферритин [247, 251].

Измерение уменьшения концентрации свободных ионов Fe^{2+} может дать информацию о хелатирующей способности веществ. Так называемый Феррозин-способ может обнаруживать ионы железа до наномолярных концентраций после предварительного концентрирования на смолах [252].



Способ основан на том, что в присутствие хелатирующих агентов, образование комплексов с феррозином нарушается, что приводит к уменьшению интенсивности красной окраски при длине волны 562 нм. Таким образом, измерение уменьшения поглощения позволяет оценить металл-хелатирующую активность конкурирующего хелатора. Более низкое значение поглощения указывает на более высокую активность хелатирования металлов. По сути дела, способ основан на реализации конкурирующих реакций комплексообразования, в которых за ионы железа конкурируют антиоксидант и феррозин. С одной стороны, при использовании этого способа можно недооценить АО со слабым хелатирующим эффектом, с другой стороны, интерес представляют как раз АО с высокими значения констант комплексообразования с ионами переменной валентности. В любом случае, эта реакция может служить как сигналообразующая в способах, изучающих хелатирующую активность АО.

Авторами [253, 254] описан способ определения железосвязывающей емкости кукурмина. Показано, что куркумин в качестве пищевой добавки ингибировал реакцию образования феррозинового комплекса за счет более высокого значения константы комплексообразования. Куркумин может хелатировать ион железа за счет $-\text{OH}$ и $-\text{OCH}_3$ функциональных групп (рисунок 1.19).

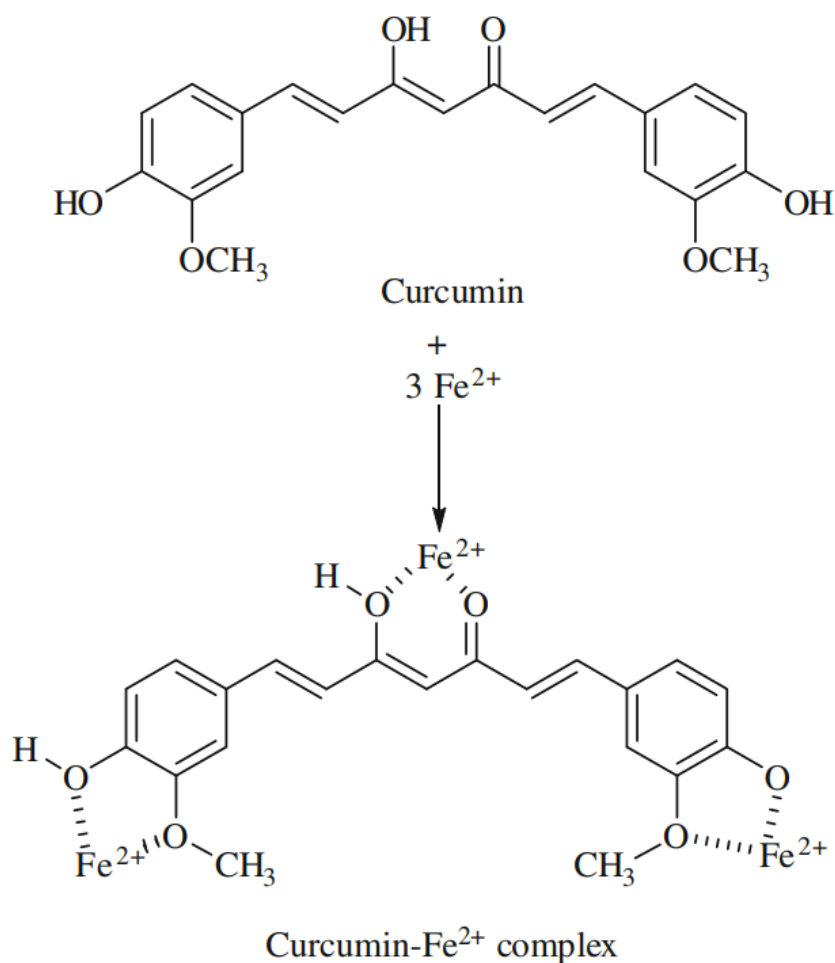


Рисунок 1.19 - Механизм хелатирующей способности кукурмина [253]

Хелатирующий эффект оценивали по формуле:

$$\text{MCE \%} = [(A_0 - A_1) / A_0] \cdot 100\% \quad (1.33),$$

где MCE – эффект хелатирования металла (Metal chelating effect), A_0 – начальное поглощение комплекса феррозина с Fe^{2+} , A_1 – поглощение в присутствии исследуемого образца или стандартного АО.

Известно, что соединения со структурами, содержащими функциональные группы C-OH и C=O, также являются эффективными хелаторами ионов металлов [255]. Соединения со структурами, содержащими две или более следующих функциональных групп: -OH, -SH, -COOH, -PO₃H₂, C=O, -NR₂, -S- и -O- проявляют хелатирующую активность [256, 257]. Показано, что соединения ряда кверцетинов проявляют высокую хелатирующую способность [258]. В зависимости от структуры АО, реакции

комплексообразования отличаются механизмами и стехиометрией. На рисунке 1.21 приведены механизмы реакций комплексообразования ресвератрола и розмариновой кислоты. В первом случае 2 молекулы ресвератрола связывают один ион железа, а во втором наоборот, одна молекула розмариновой кислоты связывает 2 иона железа (рисунок 1.20).

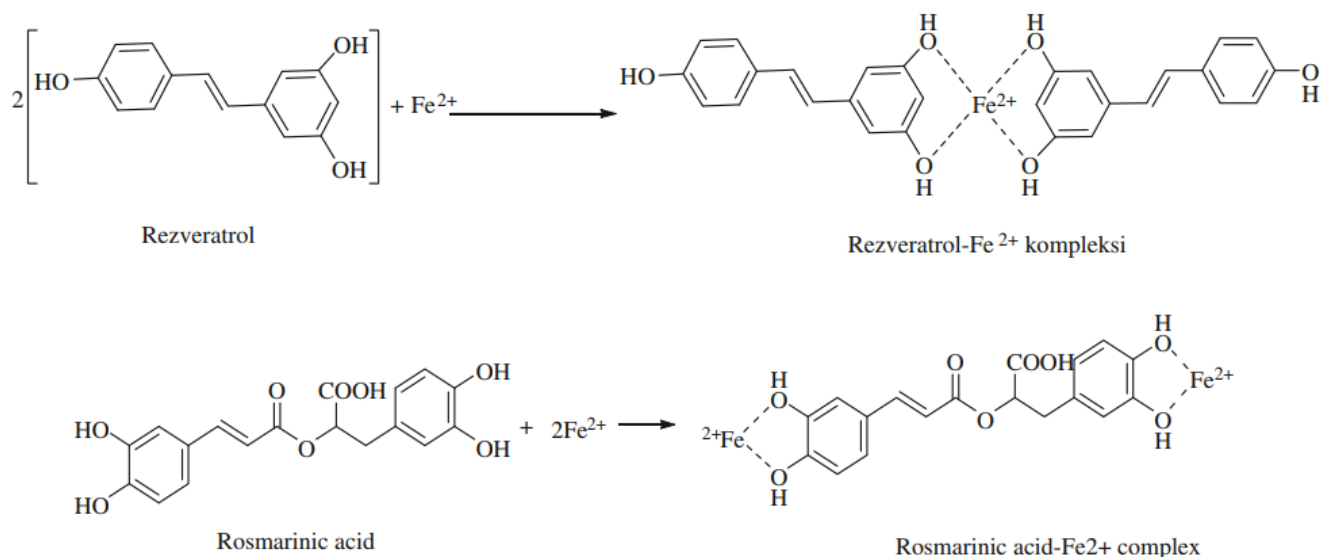


Рисунок 1.20 - Хелатирующая активность молекул ресвератрола и розмариновой кислоты

Другой подход исследования хелатирующей способности АО основан на изучении степени повреждения ДНК или дезоксирибозы [259-261]. Изменение степени повреждения ДНК при добавление веществ полифенольной природы изучают с использованием стандартного метода гель-электрофореза, а степени повреждения дезоксирибозы путем спектроскопического определения малонового диальдегида (продукта окислительной деградации дезоксирибозы при действии гидроксильных радикалов, образовавшихся в реакции Фентона). Малоновый диальдегид при этом определяют по реакции с тиобарбитуровой кислотой.

Основным преимуществом способа, основанного на определении повреждения дезоксирибозы является то, что он позволяет проводить достаточно быстрый скрининг соединений, однако условия реализации

способа далеки от биологической системы. Кроме того, многие комплексы Fe-полифенол поглощают вблизи длины волны продукта дезоксирибозной деградации (при 532 нм), что делает этот способ по своей сути проблематичным для измерения опосредованного действия полифенолов на степень деградации субстрата. С этой точки зрения гель-электрофорез, пожалуй, имеет преимущества, т.к. в этом способе непосредственно определяется повреждение ДНК и условия реализации способа близки к биологическим (таких как pH, буферная емкость и ионная сила).

Методом гель-электрофореза была показана высокая степень защиты ДНК от повреждения для трех флавоноидных соединений (включая кверцетин) [262]. Способ деградации дезоксирибозы использовали авторы [259], чтобы показать высокий защитный эффект таннинов в реакции Фентона путем хелатирования Fe^{2+} .

Авторы [263] установили, что вербаскозид ингибирует деградацию ДНК от реакции Фентона в дозозависимой форме и связали эту антиоксидантную активность со способностью полифенолов связывать ионы железа. В продолжении этой работы, авторы [264] исследовали 12 различных фенольных соединений и установили, что все соединения с катехольным или галловым фрагментом ингибировали 50% повреждения ДНК от реакции Фентона (IC50) в концентрациях от 1 до 59 мкМ. Кроме того, эти же авторы установили, что соединения с галловым фрагментом являлись более мощными антиоксидантами по сравнению с катехольными, а значения IC50 для двенадцати полифенолов коррелировали со значениями констант кислотности (pKa) полифенольных соединений (таблица 1.6). На основании полученных данных представлена модель, при помощи которой можно прогнозировать антиоксидантные свойства полифенолов по механизму комплексообразования на основании значений констант их кислотности.

Таблица 1.6 - Значения IC50 в реакции ингибирования полифенолами Fe²⁺/H₂O₂ индуцированным повреждением ДНК и pKa соответствующих полифенолов

Соединение	IC50 (мкМ)	pKa	ссылка
(-)эпигаллокатехин-3-галлат	1,1	7,55 ± 0,03	[265]
(-)эпикатехин-3-галлат	2,3	7,6	[265]
		7,74	[266]
Метил 3,4,5-тригидроксибензоат	4,0	7,92	[267]
		8,03	[268]
Пропил галлат	5,1	7,77 ± 0,04	[269]
(-)эпигаллокатехин	9,83	8,51 ± 0,04	[265]
		7,87	[266]
Галловая кислота	14,0	8,80 ± 0,02	[270]
		8,70 ± 0,02	[271]
		8,45 ± 0,06	[271]
Метил 3,4-дигидроксибензоат	15,6	8,12 ± 0,18	[272]
Протокатеховая кислота	34,4	8,90 ± 0,03	[270]
		8,79 ± 0,05	[237]
		8,64 ± 0,05	[271]
		8,81 ± 0,01	[273]
(-)эпикатехин	59,1	8,76 ± 0,02	[265]
		8,72 ± 0,01	[273]
		8,91 ± 0,23	[274]
Ванильная кислота	140,0	9,39	[275]
		9,391	[276]
		9,17	[277]

Таким образом, в данном разделе показана важность исследований хелатирующей способности АО, которые базируются на изучении переноса электронной пары с АО на окислитель, где в качестве окислителя опосредованно выступают ионы металлов переменной валентности. Следует отметить, что этой группе способов, в отличие от двух других, описанных выше, в литературе уделено очень мало внимания, тогда как хелатирующая способность АО напрямую связана с защитой ДНК организма от окислительной деградации индуцируемой гидроксильными радикалами, образующимися в реакции Фентона. Также следует отметить, что реакции комплексообразования очень удобно изучать электрохимическими методами, т.к. эти реакции сопряжены с изменением электрохимических свойств системы, а именно сдвигом окислительно-восстановительного (потенциометрия [278 - 281]) или электродного потенциала (вольтамперометрия [282-284]). Методы потенциометрии и вольтамперометрии при исследовании реакций комплексообразования используются достаточно давно и их применение для исследования хелатирующих свойств АО является очень перспективным, однако в литературе таких методов не встречается.

1.4 Вопросы, касающиеся терминологии и единиц измерения антиоксидантных свойств

Как видно из предыдущей главы, термины, применяемые для обозначения антиоксидантных свойств веществ очень разные. Основные используемые понятия «Антиоксидантная активность», «Антиоксидантная емкость», «Антирадикальная активность», «Антирадикальная емкость», «Антиоксидантная сила», «Восстанавливающая способность», «Эффективность АО» и т.д. При этом, одним и тем же терминам, авторы могут придавать разное значение, и наоборот, одно и то же называть различными терминами [285]. Так, например, под термином АОА может подразумеваться

константа скорости взаимодействия АО с радикалами, период индукции, % ингибирования радикальной реакции, суммарная концентрация АО. То же самое касается и других терминов. Способы выражения результатов исследования антиоксидантных свойств вне зависимости от применяемого термина также отличаются разнообразием [286] (таблица 1.7). В качестве единиц измерения, как правило, используют относительные единицы, выраженные в %, граммах или молях аскорбиновой кислоты, тролокса, рутина и т.д.

Таким образом, существующая в настоящее время ситуация, связанная с отсутствием единого терминологического подхода и общепринятых единиц измерения, ограничивает необходимую для промышленности и медицины информацию; осложняет понимание результатов исследования антиоксидантных свойств, полученных различными авторами; существенно затрудняет интерпретацию полученных данных и сравнение результатов, полученных разными способами.

В 2013 году Департаментом аналитической химии Международного союза теоретической и прикладной химии (IUPAC) были рекомендованы следующие термины:

«The terms “antioxidant activity” and “antioxidant capacity” have different meanings: antioxidant activity deals with the kinetics of a reaction between an antioxidant and the prooxidant or radical it reduces or scavenges, whereas antioxidant capacity measures the thermodynamic conversion efficiency of an oxidant probe upon reaction with an antioxidant» (Термины «антиоксидантная активность» и «антиоксидантная емкость» имеют разные значения: антиоксидантная активность связана с кинетикой реакции между антиоксидантом и прооксидантом или кинетикой восстановления или поглощения радикалов, тогда как антиоксидантная емкость измеряет эффективность термодинамического преобразования модельного окислителя в реакции с антиоксидантом.) [287]. Таким образом «АОА» является кинетическим критерием, а «АОЕ» - термодинамическим.

Таблица 1.7 - Способы выражения результатов исследования антиоксидантных свойств

Способ выражения	Единицы измерения
Период индукции	с, мин, ч
Скорость окисления субстрата	моль/л·с
Константа скорости взаимодействия АО со свободными радикалами	л·с/моль
Суммарная концентрация АО, измеренная после определенного времени реакции	М
Суммарная концентрация функциональных групп АО, измеренная после определенного времени реакции	Моль-экв/л
Количество продукта окисления или восстановления, измеренная после определенного времени реакции	М, г, г/л, г/г
Степень повреждения стабильных радикалов	% ингибирования
	EC ₅₀ – концентрация АО, снижающая концентрацию радикалов на 50 %
	T _{EC50} – время, за которое уменьшается концентрацию радикалов на 50 %
Воздействие на генерирование радикалов	мкМ дезактивированных радикалов
	мМ тролокса
Изменение оптической плотности раствора окрашенного реагента	%
	мг галловой кислоты, аскорбиновой кислоты, пирокатехина

Основной конфликт вокруг понятия «антиоксидантная активность» обусловлен, на мой взгляд, устоявшейся терминологией в различных областях химии. Понятия «Активность» и «коэффициент активности» введены в химическую термодинамику американским учёным Г. Н. Льюисом в 1907 [288], чтобы иметь возможность формально описывать свойства реальных и идеальных растворов одинаковыми уравнениями. Под активностью как правило понимается «эффективная (кажущаяся) концентрация компонентов с учётом различных взаимодействий между ними в растворе, то есть с учётом отклонения поведения системы от модели идеального раствора» [289]. Параллельно с химической термодинамикой развивалась химическая кинетика, в которой уже использовался термин «активность» по отношению к катализаторам реакции. Один из основных разделов химической кинетики изучает кинетику биологических реакций, этот раздел принято называть биокинетикой. Биокинетика является пограничной наукой, возникшей на стыке биохимии и химической кинетики, в которой термин «активность» используется по отношению к ферментам и выражается как «скорость накопления продукта или скорость убыли субстрата в пересчете на количество материала, содержащего фермент» [290].

$$\text{Активность} = \frac{\text{количество полученного продукта или исчезнувшего субстрата}}{\text{время работы фермента} \cdot \text{масса или объем пробы}}$$

Таким образом, исторически, термин «Активность» по отношению к антиоксидантам заимствован из раздела химической кинетики и в этой области его принимают как кинетический параметр, характеризующий кинетические характеристики реакции АО с модельным окислителем. В подтверждение этому можно отметить, что первое упоминание «антиоксидантная активность» по данным базы SCOPUS принадлежит неизвестному автору и появляется еще в 1945 году в издании «Обзор питания» [291]. Начиная с 1954 года появляется серия работ японских ученых,

изучающих антиоксидантную активность на модели ингибирования реакций окисления жиров и масел витаминами и производными катехолов [292-294], т.е. основанный на изучении кинетических характеристик этих реакций.

Исходя из вышеизложенного, в данной работе в части, касающейся разработки авторских методик исследования антиоксидантных и антирадикальных свойств, используется терминология, рекомендованная IUPAC в 2013 году [287]. Под термином «емкость» подразумевается **эффективная эквивалентная концентрация антиоксидантов**, вступивших в реакцию с модельным окислителем или свободными радикалами, тогда как в более ранних работах автора этот же параметр был обозначен термином «активность».

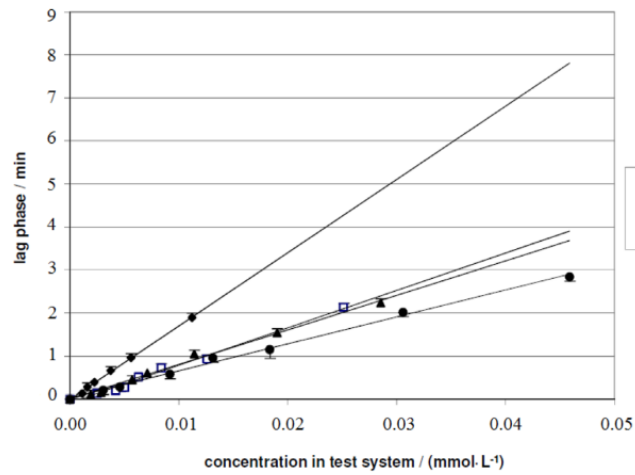
1.5 Сравнение результатов исследования антиоксидантных свойств различными методами

Как уже отмечалось ранее, отсутствие единых единиц измерения существенно затрудняет сравнивать результаты измерений, полученных разными способами.

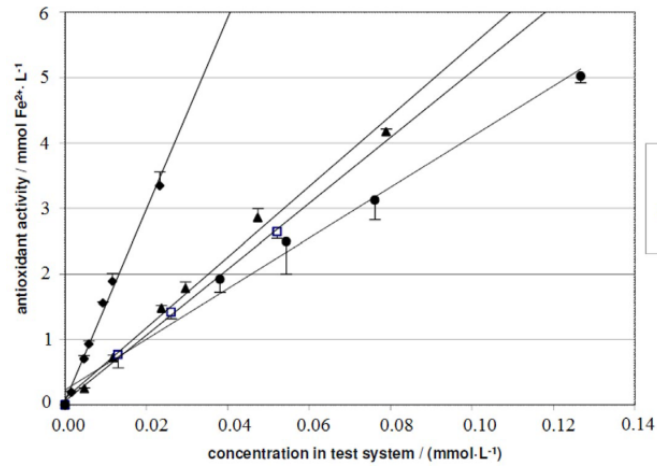
На рисунке 1.21 приведены результаты определения антиоксидантной активности и емкости индивидуальных соединений, полученных способами TEAC и FRAP, измеряющих кинетический и термодинамический параметр соответственно. Результаты, полученные способом TEAC выражены в единицах периода индукции, а способа FRAP – в мМ АО, эквивалентных образованию Fe(II).

Несмотря на принципиальное различие способов определения, можно отметить, что результаты исследования способами TEAC и FRAP сопоставимы: галловая кислота относится к более сильным АО, а мочева кислота – к более слабым. С другой стороны, при исследовании мочева кислоты способом TRAP, период индукции составлял несколько часов [295] вместо нескольких минут в способе TEAC.

a



б



B

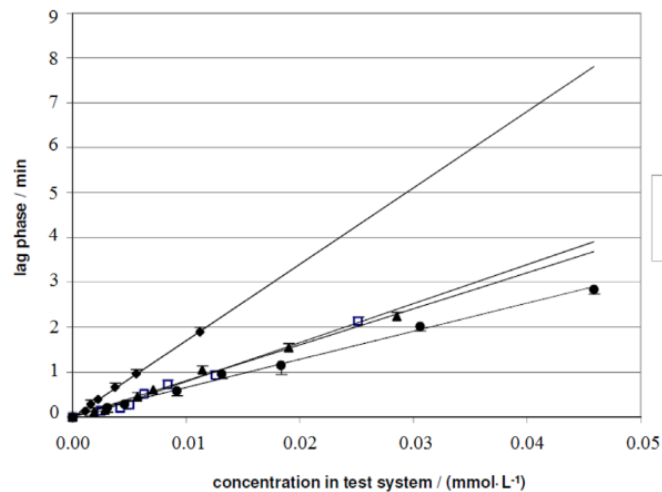


Рисунок 1.21 - Сравнение результатов определения антиоксидантной активности и емкости галловой кислоты, тролокса, аскорбиновой кислоты, мочевой кислоты различной концентрации способами TEAC (a) и FRAP (б) [73, 295]

Для оценки воспроизводимости результатов исследовали влияние концентрации анализируемого образца на результаты анализа, полученные разными способами (таблица 1.8).

Практически для всех применяемых способов (кроме ТЕАС (I)) и исследуемых образцов выявлен эффект разбавления, приводящий к увеличению, уменьшению или колебанию полученного результата. Данный эффект также осложняет сравнение и интерпретацию полученных данных. В этой ситуации можно говорить об антиоксидантных свойствах объектов, отнесенных к определенному диапазону концентраций. Поэтому при исследовании и сравнении антиоксидантных свойств необходимо использовать несколько концентраций или разбавлений.

При исследовании соединений ряда каротиноидов авторами [102] было показано, что количество сопряженных связей в исследуемых образцах также по-разному влияет на результаты, полученные способами ТЕАС и FRAP.

Поскольку результаты анализа представлены в различных способах в разных единицах измерения, проводить сравнение этих результатов по абсолютным величинам не имеет особого смысла. Как правило, принято рассматривать корреляционные зависимости этих результатов. При исследовании антиоксидантных свойств пищевых продуктов и растительных экстрактов, в ряде случаев наблюдается высокая степень корреляция между результатами, полученными разными способами. В качестве примера в таблице 1.9 приведены коэффициенты корреляции результатов анализа экстракта жимолости, полученных различными способами.

В таблице 1.10 приведены результаты исследования овощных экстрактов, полученных разными способами.

Таблица 1.8 - Влияние увеличения концентрации исследуемых образцов на результаты определения антиоксидантных параметров, полученные различными способами [296]

Способ АО	FRAP	ORAC	TEAC (I)	TEAC (II)	ФЧ
Аскорбиновая кислота	↔	↑	↔	↔	↑
Галловая кислота	↔	↕	↔	↓	Стандарт для калибровки
Мочевая кислота	↑	↕	↔	↓	↔
Нектар клубники	↔	↓	↔	↔	↓
Экстракт томатов	↔	↑	↔	↔	↕
Белый чай	↔	↓	↔	↔	↓

↔ постоянно, ↑ - увеличение, ↓ - уменьшение, ↕ - флуктуация

Таблица 1.9 - Коэффициенты корреляции между результатами, полученными разными способами при анализе экстракта жимолости [297]

	Способ ФЧ	DPPH	FRAP	TEAC
Способ ФЧ	-	0.993	0.920	0.842
DPPH	-	-	0.956	0.881
FRAP	-	-	-	0.936
TEAC	-	-	-	-

Таблица 1.10 - Значения АОО овощных экстрактов, полученных различными способами [298-300]

Способ Объект	Способ ФЧ*	DPPH**	FRAP**	CUPRAC**	TEAC**
Красный лук	15.6 ± 1.3	22.0 ± 1.9	19.2 ± 1.7	39.7 ± 3.2	49.7 ± 4.3
Белый лук	11.9 ± 0.9	19.4 ± 1.9	14.6 ± 1.3	32.5 ± 2.9	39.2 ± 3.2
Желтый лук	10.0 ± 0.8	19.7 ± 1.7	14.2 ± 1.2	33.2 ± 3.0	37.2 ± 3.0
Красный перец	8.6 ± 0.7	16.0 ± 2.0	13.6 ± 1.1	27.8 ± 2.2	28.6 ± 2.4
Чеснок	6.4 ± 0.5	12.0 ± 3.4	9.9 ± 0.5	20.1 ± 1.4	23.7 ± 2.0
Зеленый перец	6.3 ± 0.5	11.8 ± 1.0	9.7 ± 0.5	20.1 ± 1.8	23.9 ± 2.3
Белокочанная капуста	3.2 ± 0.3	6.2 ± 1.4	8.1 ± 0.4	11.4 ± 0.9	10.5 ± 0.8

* мг ГК/г, ** мкмоль тролокса/г

Несмотря на то, что единицы измерения в способах DPPH, FRAP, CUPRAC и TEAC приведены к мкмоль тролокса/г, в абсолютных значениях результаты значительно различаются, а высокая степень корреляции в этих случаях обусловлена тем, что основными компонентами продуктов питания, обладающими антиоксидантными свойствами являются вещества полифенольной природы, а также и тем, что все используемые способы в представленные работы [297 -300] основаны на механизме передачи электрона с АО на молекулу окислителя.

Гораздо сложнее обстоит дело с исследованием биологических объектов. С целью сравнения результатов, авторы [301] исследовали

сыворотку крови 45 здоровых людей. При сравнении результатов, полученных способами ORAC и FRAP, была обнаружена достаточно слабая корреляция результатов (34,9 %). А при сравнении результатов, полученных способами ORAC/TEAC и FRAP/TEAC соответственно, никакой корреляции обнаружено не было (рисунок 1.22).

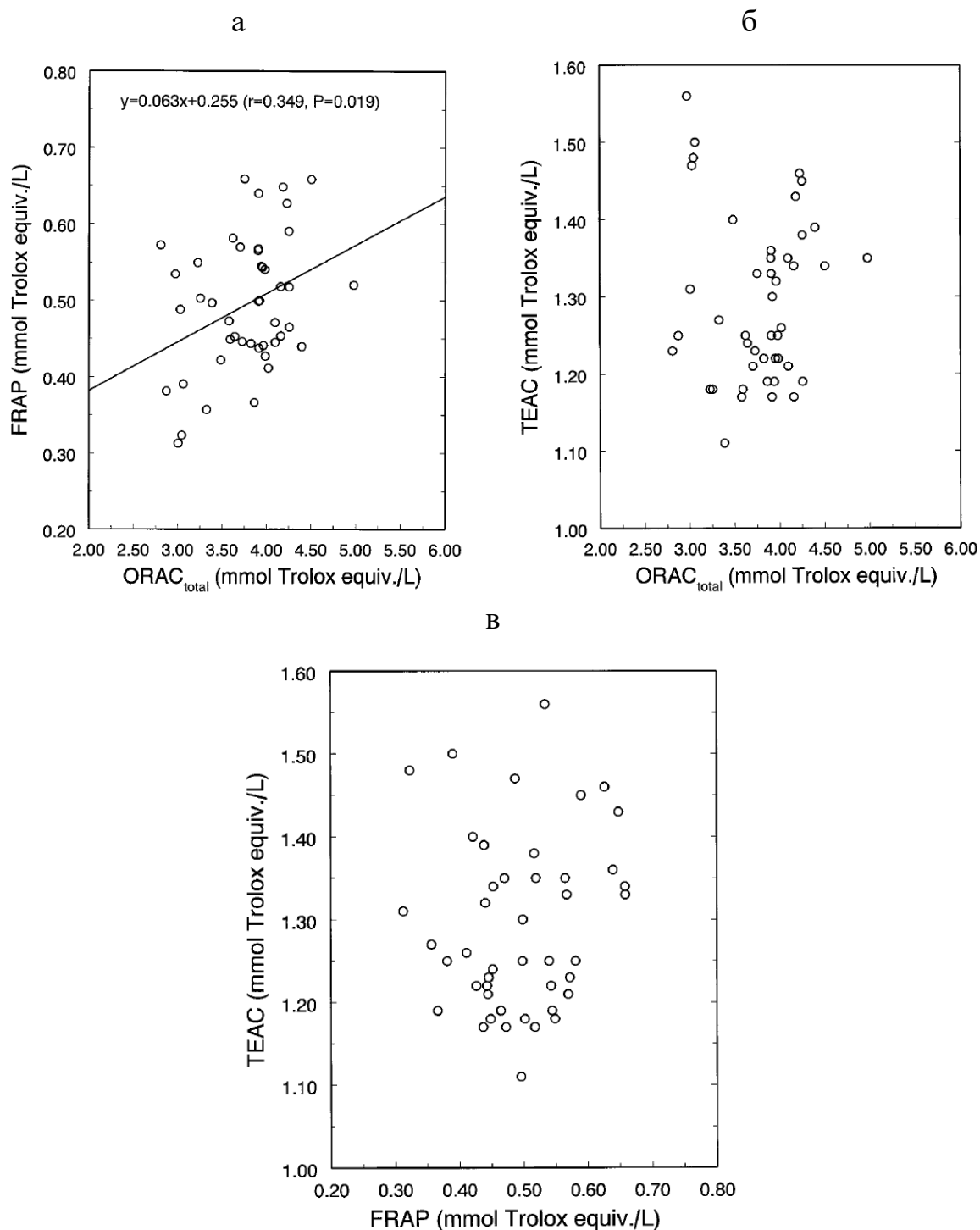


Рисунок 1.22 - Графики рассеяния результатов, полученные при сравнении способов: а - ORAC/FRAP, б - ORAC/TEAC, в - FRAP/TEAC [301]

Данных, приведенных в литературе, недостаточно, чтобы разумно интерпретировать сравнительные исследования. Кроме того, для улучшения воспроизводимости и сопоставимости результатов исследований необходимо проводить межлабораторное сравнение и стандартизовать единицы измерения [141]. Принимая во внимание, что способы могут быть основаны на разных механизмах антиоксидантного действия, авторы [296] рекомендуют использовать разные подходы для исследования антиоксидантных свойств объектов.

1.6 Перспективы развития способов исследования антиоксидантных свойств

В условиях техногенного развития общества, ухудшения экологической ситуации, роста патологических состояний населения риск возникновения окислительного стресса резко возрастает, а, следовательно, исследования антиоксидантных свойств различных объектов, как биологических жидкостей, так и продуктов питания, становятся еще более востребованными. Некоторое условное обобщение описания вышеизложенных наиболее распространенных подходов к интегральной оценке антиоксидантных свойств можно представить в виде Таблицы 1.11. Поскольку нельзя охватить огромное количество параметров, характеризующих той или иной подход, то в основе сравнения лежит 5 основных характеристик, от которых в конечном итоге зависит распространение использования способа:

1. Простота реализации метода;
2. Доступность аппаратного оформления метода;
3. Физиологичность условий проведения измерения, включая используемые реагенты, рН и т.д.;
4. Экспрессность измерения;
5. Механизм действия АО.

Таблица 1.11 - Сравнительные характеристики способов исследования антиоксидантных свойств

Способ	Простота	Доступность аппаратуры	«Биологическое сродство»	Экспрессность	Механизм
<i>Фолина-Чокальтеу</i>	++	++	--	+	Перенос электрона
<i>TEAC</i>	-	++	-	-	Перенос электрона
<i>DPPH</i>	++	++	-	++	Перенос электрона
<i>FRAP</i>	++	++	--	++	Перенос электрона/хелатирование
<i>CUPRAC</i>	+	++	--	+	Перенос электрона
<i>CRAC</i>	+	+	----	+	Перенос электрона
<i>ORAC</i>	-	-	+++	--	Перенос атома водорода
<i>TRAP</i>	--	-	+++	----	Перенос атома водорода
<i>Феррозин-метод</i>	+	++	-	--	Хелатирование
<i>ДНК-метод</i>	----	--	+++	----	Хелатирование

Из представленного обзора литературы следует, что не существует некоего «универсального способа», способного всесторонне оценить антиоксидантные свойства объектов и при этом обладать всеми достоинствами (таблица 1.10). Существование различных механизмов действия АО и данные, свидетельствующие о том, что способность к улавливанию радикалов непосредственно связана со способностью АО отдавать атома водорода, но не всегда коррелирует с их окислительно-восстановительными потенциалами [302], т.е. способностью отдавать электрон, приводит к выводу, что необходимо создание новых комплексных подходов для решения этой проблемы. Поскольку разные механизмы действия АО могут реализовываться параллельно, а доминирующий механизм будет определяться структурой соединений и условиями среды, то новый комплексный подход должен учитывать не только различные механизмы действия АО, но и условия проведения исследований, которые должны быть достаточно близки к физиологическим, т.к. в конечном итоге, интерпретацию результатов хотелось бы использовать по отношению к живым организмам.

Одной из основных проблем при решении поставленной задачи является обоснованность выбора моделей окислителя радикальной и нерадикальной природы. В большинстве способов исследования антиоксидантных свойств в представленном литературном обзоре не предложены веские обоснования использования той или иной модели окислителя. Тогда как для получения корректных результатов необходимо учитывать как термодинамическую вероятность протекания реакций АО с окислителем, так и кинетику протекания данных реакций.

Еще одной проблемой является простота, экспрессность, аппаратная доступность существующих способов в сочетании с корректно выбранной моделью окислителя радикальной или нерадикальной природы. Из обзора литературы видно, что за последние 15-20 лет подходы к оценке антиоксидантных свойств, основанные на использовании оптических методов практически не имеют существенного развития, а подвергаются лишь

незначительной модификации. В противовес этому, можно отметить, что за это же время появились принципиально новые подходы, основанные на использовании электрохимических методах исследования. Это объясняется тем, что электрохимические методы обладают рядом преимуществ по сравнению с оптическими, такими как простота выполнения измерений, доступность аппаратного оформления, возможность создания портативной аппаратуры и реализации метода в режиме on-site. Но главным образом, на мой взгляд, перспектива развития электрохимических методов для исследования антиоксидантных свойств объектов обусловлена самой природой действия АО.

Все три описанные механизма химического превращения АО связаны с переносом одного или пары электронов. Во всех процессах, где имеет место перенос электронов, неизбежно будут изменяться какие-либо электрохимические параметры системы. Очевидно, что, исходя из природы действия АО, их антиоксидантные свойства целесообразно изучать при помощи электрохимических методов анализа, которые помимо указанного преимущества (соответствие природы механизма действия АО методу исследования) имеют еще целый ряд преимуществ перед спектральными методами исследования, принятыми в использование в настоящее время.

Итак, состояние системы антиоксидантной защиты организма определяется её электронно-протонно-донорно-акцепторными свойствами, а оптимальным источником информации о последних является её окислительно-восстановительный потенциал, который, казалось бы, легко измерить. Однако, необратимость электрохимических реакций, определяющих этот потенциал, делает невозможными прямые измерения. Применение потенциометрии с использованием специальных реагентов позволило найти выход из этой ситуации [303, 304].

Последовательное решение сформулированных в работе задач создает возможность создания новой методологии изучения антиоксидантных/антирадикальных свойств с использованием метода

потенциометрии, основанной на комбинированном использовании различных механизмов действия АО; обосновании выбранных моделей окислителя с точки зрения химической термодинамики и кинетики; выбора условий исследования, близких к физиологическим; исследования взаимодействия АО с модельными окислителями, и потенциометрической регистрации результатов этого взаимодействия.

Наиболее информативным параметром, характеризующим антиоксидантные/антирадикальные свойства объектов, является интегральный показатель антиоксидантной/антирадикальной емкости (АОЕ/АРЕ), который определяет эффективность термодинамического преобразования модельного окислителя радикальной природы (АРЕ) или нерадикальной природы (АОЕ) в реакции с антиоксидантами.

ГЛАВА 2 АППАРАТУРА И ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

2.1 Оборудование и средства измерений

2.1.1 Оборудование для проведения электрохимических исследований

Потенциометрические измерения проводили с использованием иономер-вольтметра Denver-250 («Denver Instrument Company», США), многофункционального потенциометрического анализатора «МПА-1» (НПВП «ИВА», г. Екатеринбург), пилотного образца потенциометрического анализатора АОТ-1 с интерфейсом RS232 (НПВП «ИВА», г. Екатеринбург) и рН-метра «Эксперт-рН» (ООО «Эконикс-эксперт», Москва) с функцией измерения ЭДС ячейки и интерфейсом RS-232. Применяли двухэлектродную электрохимическую ячейку. Электродом сравнения служил хлоридсеребряный электрод ($\text{Ag}/\text{AgCl} / 3 \text{ моль/дм}^3 \text{ KCl}$) типа ЭВЛ – 1М («Гомельский ЗИП», г.Гомель, Беларусь) для протонных сред, либо двухключевой Ag/AgCl («Metrohm», Швейцария), внутренний объем которого заполняли 0.1 М раствором KCl в воде, а внешний – 0.1 М раствором LiClO_4 в ацетонитриле – для апротонных сред. Также использованы платиновый ORP-electrode («Phoenix», США), платиновый электрод («Metrohm», Швейцария), редоксметрический платиновый электрод ЭПВ-1 («Гомельский ЗИП», г.Гомель, Беларусь).

Вольтамперометрические исследования проводили с использованием потенциостата/гальваностата Metrohm Autolab PGSTAT128N (Metrohm AG, Нидерланды). В качестве фонового электролита использовали фосфатный буферный раствор или 0,1 М раствор NaCl . Скорость сканирования потенциала – 0,2 В/с. Применяли трехэлектродную электрохимическую ячейку. Рабочим электродом служил стеклоуглеродный электрод (Metrohm, Швейцария) ($S_{\text{геом}} = 0.07 \text{ см}^2$), вспомогательным - стеклоуглеродный стержень (Metrohm, Швейцария). В качестве электрода сравнения использовали

хлоридсеребряный электрод (Ag/AgCl/3 М КCl) типа ЭВЛ – 1М ((«Гомельский ЗИП», г. Гомель, Беларусь).

2.1.2 Оборудование для проведения спектроскопических измерений

Исследование АОА методом хемилюминесценции проводили на установке, разработанной И.И. Сапежинским (ИБХФ РАН, г. Москва) [305] с использованием хемилюминометра БХЛ-02 (Россия).

Исследование общего антиоксидантного статуса (Total Antioxidant Status (TAS)) методом «Randox[®]» проводили с использованием биохимической автоматической системы «Architect c8000» (Abbott, США).

Для проведения фотометрических измерений использовали фотометр КФК-3 (Евролаб, г. Санкт-Петербург, Россия), спектрофотометр Evolution 201 (Thermo scientific, США) со стеклянной или кварцевой кюветой (толщина слоя 1 см).

2.1.3 Другое вспомогательное оборудование

Все растворы готовили на деионизированной воде, получаемой при помощи комбинированной мембранной установки ДВС-М/1НА(18)-Н ("Медиана-Фильтр", г. Москва).

Для взятия точных навесок использовали аналитические весы 1-го класса точности «Scaltec» (Германия), «Shimadzu aux 220» (Япония).

Для создания и поддержания гетерогенной системы гексан/вода дополнительно применяли предварительную обработку смеси буферный раствор/гексановый раствор α -токоферола ультразвуком (частота 18 – 20 кГц) при помощи ультразвукового дезинтегратора UD-20 («Teschpan», Польша).

Для получения фракций крови образцы цельной крови центрифугировали при помощи центрифуги с охлаждением 3К30 (Sigma GmbH, Германия).

Растворы перемешивали при помощи магнитной мешалки ПЭ-6100 (Экрос, г. Санкт-Петербург, Россия).

Для проведения измерений при физиологической температуре использовалась термостатируемая ячейка, присоединенная к циркуляционному термостату LOIP LT-205a (ЗАО «ЛОИП», Россия) или MLW U15 (MLW, Германия). Схема установки для проведения потенциометрических измерений в условиях термостатирования представлена на рисунке 2.1.



Рисунок 2.1 - Схема установки для проведения потенциометрических измерений в условия термостатирования. (1 – Хлорид-серебряный электрод, 2 – Платиновый электрод, 3 – Термостатируемая электрохимическая ячейка, 4 – pH-метр «Эксперт-pH», 5 – Магнитная мешалка, 6 – Термостат)

2.2 Реактивы и приготовление растворов

В работе использовали следующие реактивы: $K_4[Fe(CN)_6]$ и $K_3[Fe(CN)_6]$ (Реахим, Россия), квалификации ч.; $KHPO_4$ и $NaHPO_4$ (Реахим, Россия), квалификации ч.д.а.; метанол квалификации х.ч.; аскорбиновую кислоту (фармакопейную); 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ICN Biomedical, США); глицил-триптофан (Reanal, Венгрия); рибофлавин (Merck); пирокатехин (Sigma) аналитической категории; флороглюцин (Sigma) аналитической категории; кофейную кислоту (ч., Реахим); кверцетин (Sigma) аналитической категории; рутин (фармакопейный); (+)катехол (Sigma); пирогаллол (Sigma, USA) аналитической категории; Na_2CO_3 (х.ч., Реахим); галловау кислоту (Fluka, Германия) аналитической категории; гидрохинон (Sigma, США) аналитической категории; оксигидрохинон (Реахим, Россия) квалификации х.ч.; катехин (Sigma, США) аналитической категории; α -токоферол (Aldrich), L-глутатион восстановленный (Fluka, Германия), L-цистеин гидрохлорид (Fluka, Германия), мочевую кислоту (Fluka, Германия), 2,2-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорид (Sigma–Aldrich, США); гепарин (фармакопейный) 5000 ЕД в 1 мл (Синтез, Россия), глюгицир (фармакопейный), динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (х.ч., Реахим, Россия), билирубин (лиофилизат) 85,5 мкмоль/л (Ольвекс Диагностикум, Россия); набор стандартный для измерения антиоксидантной активности TAS Randox; $LiClO_4$ (Aldrich); ацетонитрил ч.д.а. (Реахим, Россия); бром (х.ч., Реахим); $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ (х.ч., Реахим); $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (ч.д.а., Реахим); H_3PO_4 (х.ч., Реахим); HCl (х.ч., Реахим); $LiSO_4 \cdot H_2O$ (ч.д.а., Реахим); ЭДТА (Fluka, Германия); натрий лимоннокислый 3-замещенный (Лабтех, Россия), квалификация ч.д.а.; 1,10-фенантролин (Реахим, Россия) квалификации х.ч.; $FeCl_2$ (Sigma, США) аналитической категории; реактив Folin-Ciocalteu (Panreac, Испания) аналитической категории.

Комплекс $Fe(II)$ -ЭДТА был получен смешением $FeCl_2$ и ЭДТА в эквивалентных количествах 1:1.

Комплекс Fe(II)-фенантролин получен смешением FeCl₂ и 1,10-фенантролина в соотношениях 1:3.

В качестве фонового электролита в потенциометрических измерениях использовали фосфатный буферный раствор (PBS) pH 7,4 KН₂PO₄ / Na₂HPO₄·12H₂O.

Растворы модельных антиоксидантов концентрации 0,5 – 5 мМ готовили растворением их точных навесок в 5-20 мл воды. Растворы с меньшей концентрацией готовили в мерных колбах, доводя до метки соответствующим фоновым электролитом непосредственно перед измерениями.

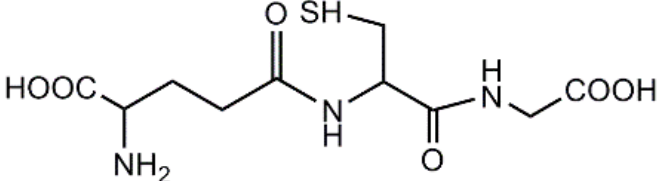
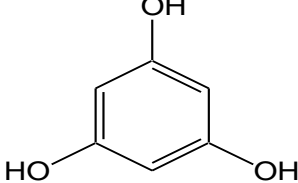
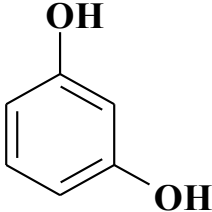
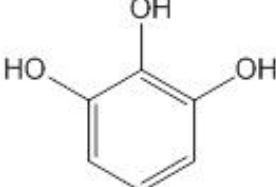
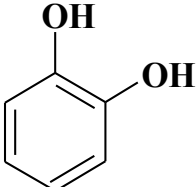

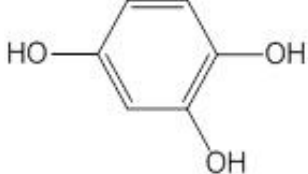
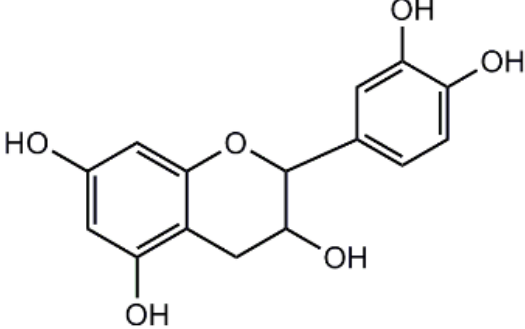
2.3 Объекты исследования

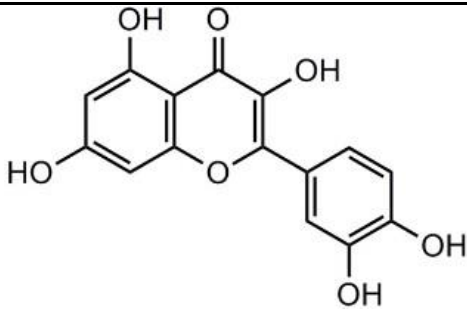
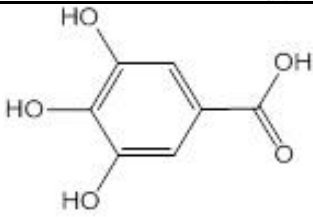
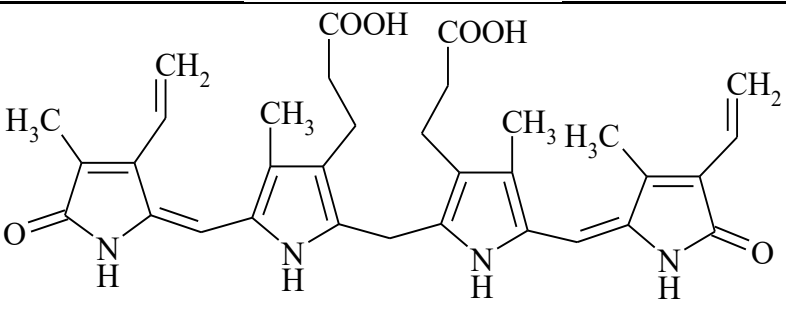
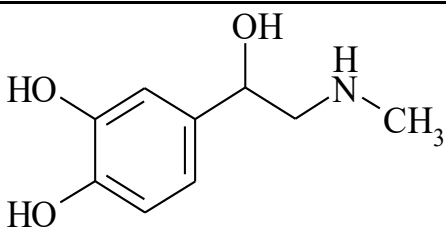
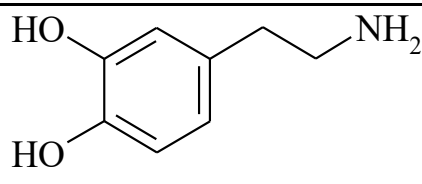
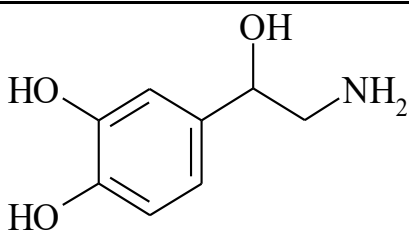
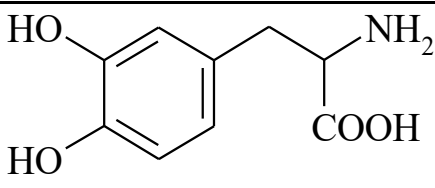
Объектами исследования являлись:

1. Спиртовые и водные растворы чистых химических веществ (таблица 2.1).

Таблица 2.1 - Структурные формулы природных АО

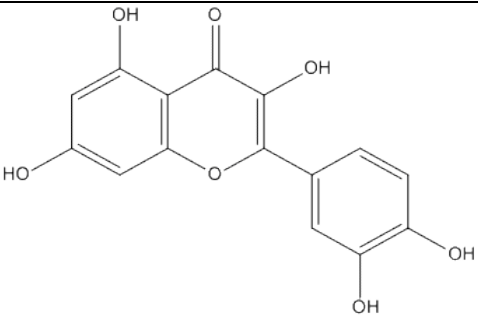
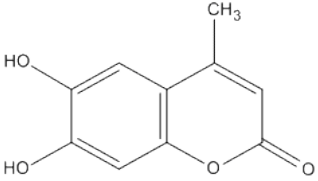
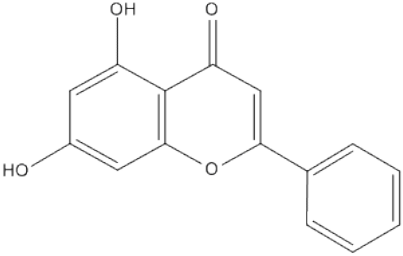
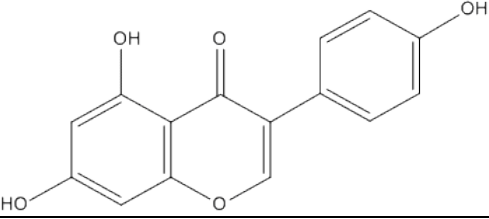
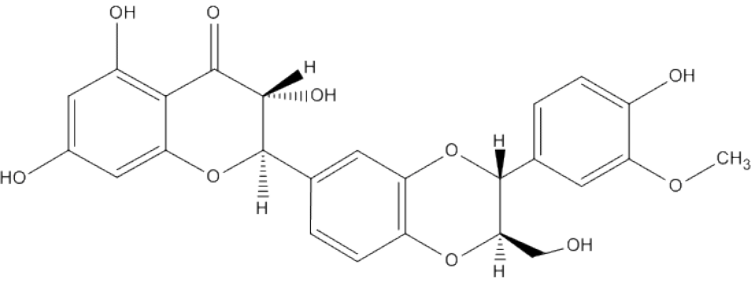
Название	Структура
1	2
Аскорбиновая кислота	
Цистеин	
Мочевая кислота	

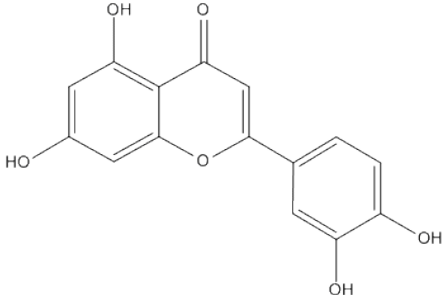
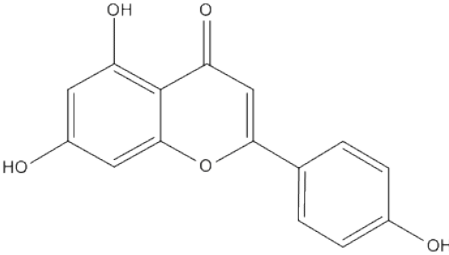
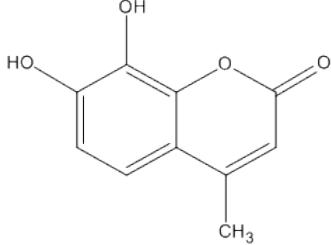
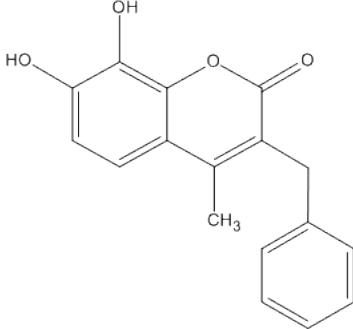
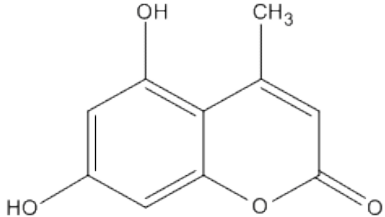
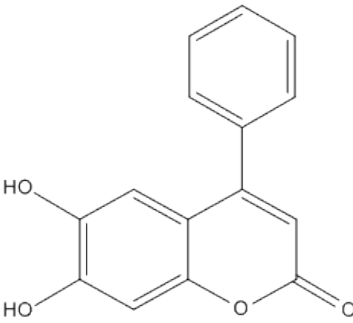
Название	Структура
1	2
Глутатион	
Флороглюцин	
Резорцин	
Пирогаллол	
Пирокатехин	
Гидрохинон	
Оксигидрохинон	
Катехин	

Название	Структура
1	2
Кверцетин	
Галловая кислота	
Билирубин	
Адреналин гидрохлорид	 <p style="text-align: right;">• HCl</p>
Дофамин гидрохлорид	 <p style="text-align: right;">• HCl</p>
Норадреналин	
3,4- Дигидроксифенилаланин	

2. Водные и водно-спиртовые растворы природных кумаринов (предоставлены кафедрой биоорганической и молекулярной химии УрФУ). Структурные формулы приведены в таблице 2.2.

Таблица 2.2 - Структурные формулы природных окси- и бензо- производных кумарина

№ п/п	Название	Структура
1	2	3
1	Кверцетин	
2	4-Метилскулетин	
3	Хризин	
4	Генистеин	
5	Силубин	

№ п/п	Название	Структура
1	2	3
6	Лютеолин	
7	Апигенин	
8	4-Метил-7,8-дигидроксикумарин	
9	3-Бензил-7,8-дигидрокси-4-метил-2Н-хромен-2-он	
10	4-метил-5,7-дигидроксикумарин	
11	Нордабергин	

№ п/п	Название	Структура
1	2	3
12	1,3-дигидрокси-7,8,9,10-тетрагидро-6Н-бензо[с]хромен-6-он	
13	Серратин	
14	Байкалеин	
15	Дигидромирицетин	

3. Производные полифенолов (пирогаллола, пирокатехина и гидрохинона), синтезированные на кафедре биоорганической и молекулярной химии УрФУ (таблица 2.3).

4. Лекарственные бальзамы, настойки, экстракты, приобретенные в аптечной сети.

5. Соки и нектары из фруктов и овощей, приобретенные в сети розничной торговли.

6. Алкогольные напитки, приобретенные в сети розничной торговли.

7. Экстракты различных сортов чая, приобретенные в сети розничной торговли и приготовленные по ГОСТ 19885-74 [306]. Для этого к 2,5 г навески чая, взятой из средней пробы, приливали 200 мл кипящей дистиллированной воды и ставили на водяную баню. Экстракцию вели в течение 45 мин. Экстракт фильтровали, фильтрат переносили в мерную колбу вместимостью 250, охлаждали и доводили дистиллированной водой до метки.

8. Растительные масла, приобретенные в сети розничной торговли. Спиртовые экстракты готовили путем смешивания с этиловым спиртом в равных объемах с последующим интенсивным перемешиванием в течение 30 минут, после чего оставляли до расслоения и отбирали спиртовую фракцию.

9. Лекарственные растения, приобретенные в аптечной сети и предоставленные Пятигорской государственной фармацевтической академией. Водные и водно-спиртовые экстракты готовили в соответствии с ОФС.1.4.1.0018.15 [307].

10. Витамины и витаминные комплексы.

В качестве исследуемых объектов использовали следующие витамины и витаминные комплексы: Аскорбиновая кислота (АК) в драже; АК в растворе для инъекций; АК с глюкозой; АК с декстрозой; Морской кальций; Перфектил; Веторон; Мультифорт. Растворы препаратов в таблетированной форме, кроме Морского кальция и Перфектила, были приготовлены в 15 мл воды. Раствор препаратов Морской кальций и Перфектил готовили в смеси спирт – вода 1:1, общий объем смеси 15 мл. Содержание активных компонентов рассчитывали для препаратов в таблетках (АК в драже, Мультифорт, АК с глюкозой, Морской кальций, АК с декстрозой, Перфектил) – на 1 таблетку, для препаратов в растворе (АК в растворе для инъекций, Веторон) – на 1 мл.

Расчет количества вещества, заявленного производителем, производится по формуле

$$n_{\Sigma \text{произв}}\left(\frac{1}{z}\right) = n_{\frac{1}{z}(1)} + n_{\frac{1}{z}(2)} + \dots + n_{\frac{1}{z}(n)} \quad (2.1)$$

где $n_{\Sigma\text{произв}}$ - количество вещества, заявленное производителем на 1 таблетку или на 1 мл.

$n_{1/z(n)}$ - количество моль эквивалентов n -го компонента;

$n_{1/z(n)} = m_n / M_{1/z(n)}$, m - масса вещества n -го компонента, содержащегося в 1 таблетке или в 1 мл, г;

$M_{1/z(n)}$ - молярная масса эквивалента n -го компонента, г/моль.

$$\sum n_{\text{эксп}} = \text{АОЕ} \cdot V \quad (2.2)$$

V - объем, 0.001 л - для препаратов в жидкой форме, 0.015 л - для таблетированных препаратов

11. Фрукты, ягоды и овощи, приобретенные в сети розничной торговли.

12. Цельная кровь и ее фракции. Отбор образцов крови в количестве 5 -10 мл производили из локтевой вены. Для предотвращения свертываемости в пробирки для отбора проб добавляли антикоагулянты. Для исследования АОЕ использовали гемолизат образцов цельной крови, полученный путем термического гемолиза (замораживание при -18°C). Фракции крови (плазму, сыворотку и эритроцитарную массу) получали центрифугированием цельной крови с антикоагулянтом для получения плазмы и без антикоагулянта для получения сыворотки в течении 20 минут при скорости вращения центрифуги 3000 об/мин. (рисунок 2.2). Верхняя фракция представляла собой плазму или сыворотку крови, нижняя - эритроцитарную массу [308]. Эритроцитарную массу подвергали термическому гемолизу замораживанием при -18°C .



Рисунок 2.2 - Получение фракций крови

13. Лекарственные формы для офтальмологического применения. Капли глазные: Офтан Тимолол (АО САНТЭН, Финляндия, № партии 149258, сроки изготовления-годности: 11.2014-11.2017), Офтан Дексаметазон (АО САНТЭН, Финляндия, № партии 148898, сроки изготовления-годности: 11.2014-11.2016), Офтан Катахром (АО САНТЭН, Финляндия, № партии 150771, сроки изготовления-годности: 03.2015-03.2018), Эмоксипин (ФГУП «Московский эндокринный завод», № партии 621014, сроки изготовления-годности: 11.2014-11.2016), Тауфон (ФГУП «Московский эндокринный завод», № партии 810415, сроки изготовления-годности: 05.2015-05.2018), Квинакс (С.А. Алкон-Куврер Н.В., Бельгия, № партии 15B05AD, сроки изготовления-годности: 02.2015-02.2017); Люксфен (ООО «ВАЛЕАНТ», Россия, Москва, № партии 170814, сроки изготовления-годности: 08.2014-08.2016); Каталин (Сэндзю Фармацевтикал Ко., Лтд., Осака, Япония, № серии таблетки Н013, № серии растворителя Н541, сроки изготовления-годности: 03.2015-02.2020); Визомитин (ЗАО «Фрамон», Россия, Москва, № партии 090415, сроки изготовления-годности: 04.2015-05.2017). Раствор для внутриглазного введения Эмоксибел (РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь, Минск, № партии 751113, сроки изготовления-годности: 11.2013-11.2016). Раствор для инъекций Эмоксипин (ФГУП «Московский

эндокринный завод», № партии 40114, сроки изготовления-годности: 02.2014-02.2017).

В таблице 2.4 представлены исследуемые лекарственные формы, структурные формулы действующих веществ и их содержание.

14. Синтезированные аддукты азолазинов с фенольными фрагментами (таблица 2.5), как перспективные молекулы для создания препаратов двойного назначения – с противовирусным и антиоксидантным действием. (синтезированы и предоставлены кафедрой биоорганической и молекулярной химии УрФУ)

Таблица 2.3 - Структурные формулы синтетических антиоксидантов

Название	Структура
1	2
ω-морфолино-3,4-диоксиацетофенон, гидрохлорид	
ω-пиперидино-3,4-диоксиацетофенон, гидрохлорид	
ω-пирролидино-3,4-диоксиацетофенон, гидрохлорид	
3,4-диокси-ω-тиосульфonatoацетофенон, натриевая соль	

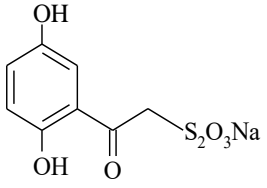
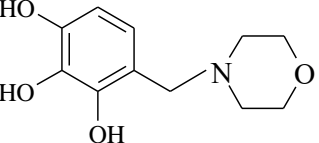
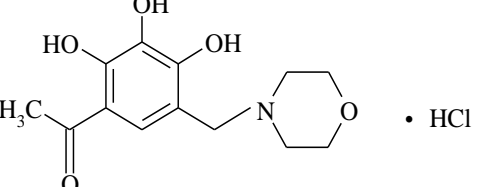
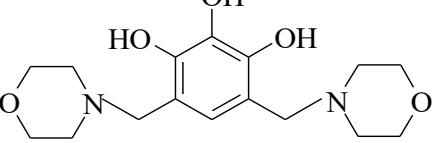
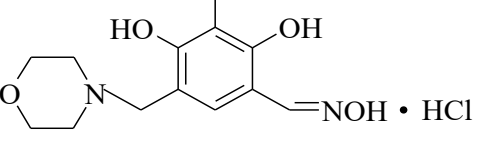
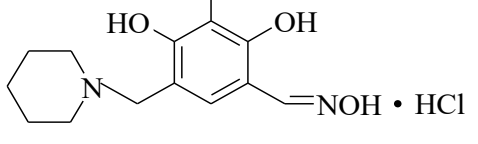
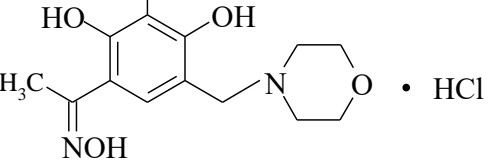
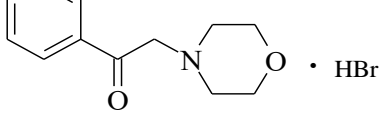
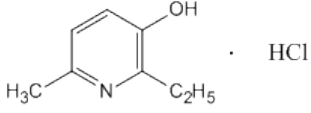
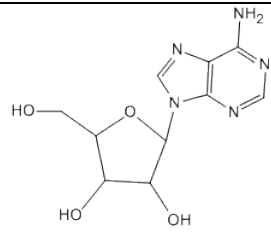
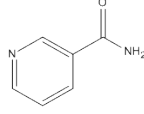
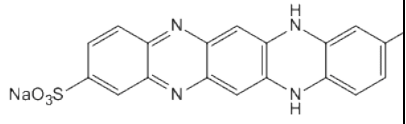
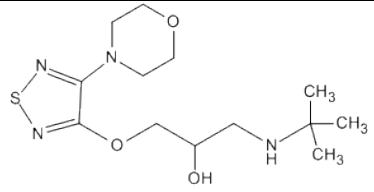
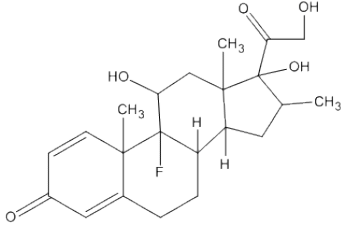
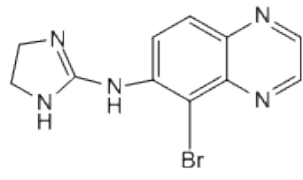
Название	Структура
1	2
2,5-диокси- ω - тиосульфатацетофенон, натриевая соль	
4-морфолинометил пирогаллол	
2,3,4-триокси-5- морфолинометилацетофенон, гидрохлорид	
4,6-бис-морфолинометил пирогаллол	
оксим-5-морфолинометил пирогаллового альдегида гидрохлорид	
оксим-5-пиперидинометил пирогаллового альдегида гидрохлорид	
5-морфолинометилгаллатацетофенон, оксим, гидрохлорид	
ω -морфолиноацетофенон, гидробромид	

Таблица 2.4 Исследуемые лекарственные формы для офтальмологического применения

№ п/п	Название препарата	Активное вещество	Структурная формула	Концентрация
1	2	3	4	5
1	Эмоксипин	Метилэтилпиридинола гидрохлорид		10 мг/мл
2	Офтан Катахром	Цитохром С	Гем-содержащий белок	0,675 мг/мл
		Аденозин		2 мг/мл
		Никотинамид		20 мг/мл
3	Квинакс	Дигидроазапентацен полисульфонат натрия		0,15 мг/мл
4	Офтан Тимолол	Тимолол		5 мг/мл
5	Офтан Дексаметазон	Дексаметазон		1 мг/мл
6	Люксфен	Бримонидина тартрат		2 мг/мл

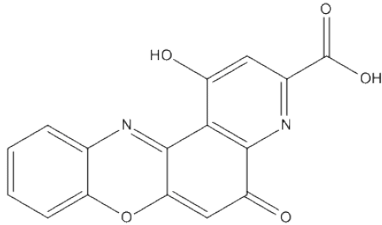
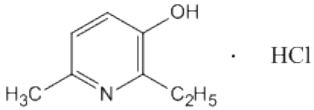
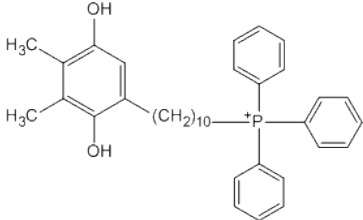
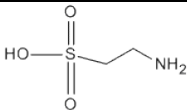
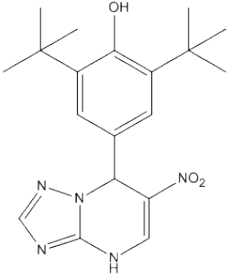
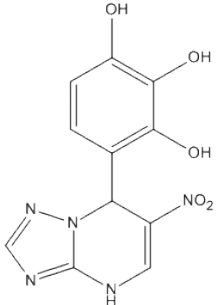
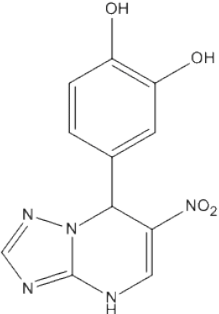
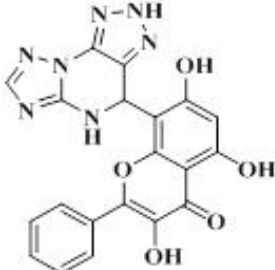
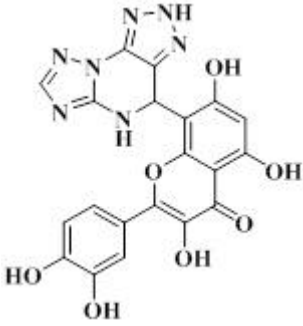
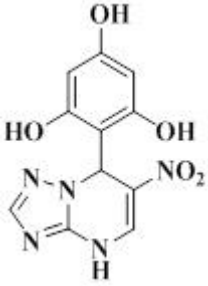
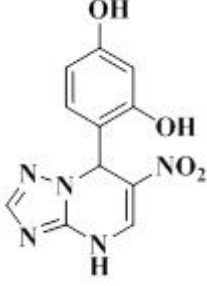
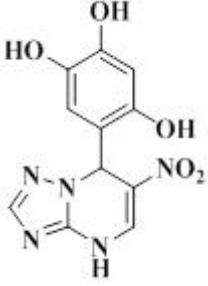
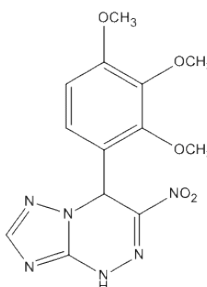
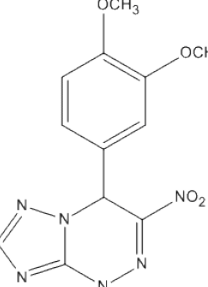
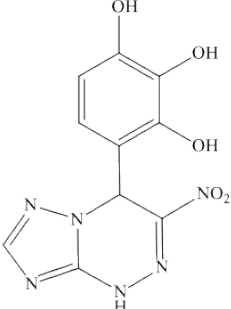
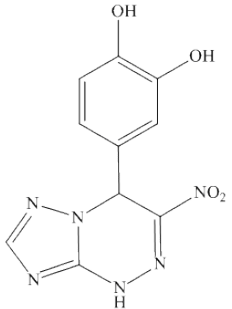
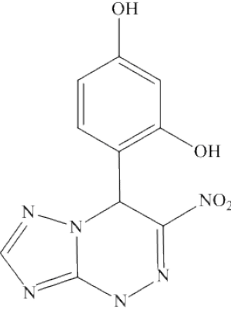
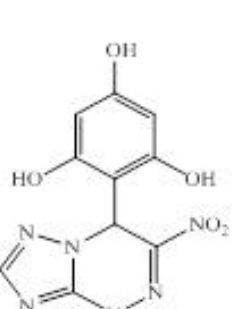
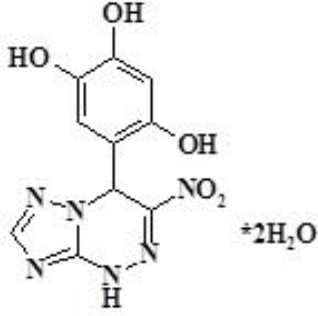
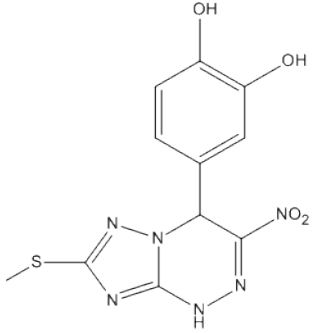
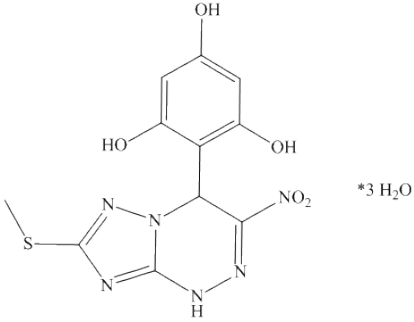
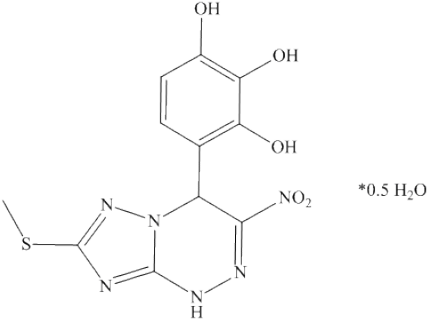
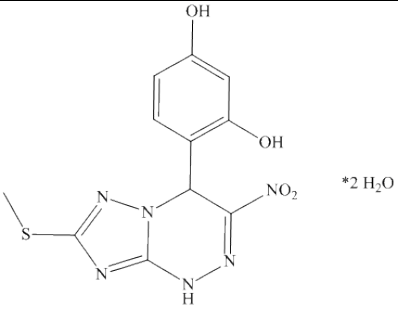
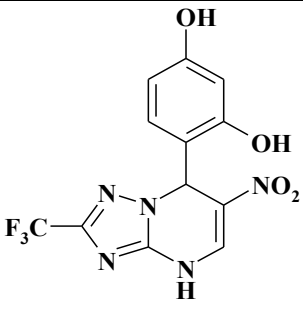
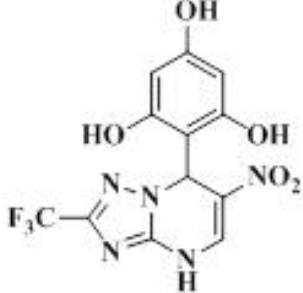
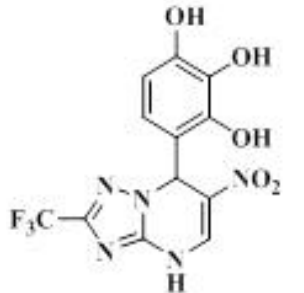
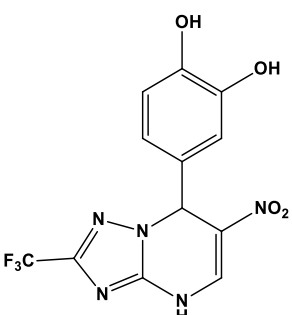
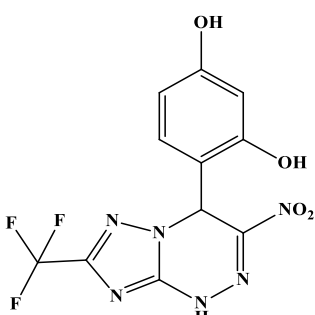
№ п/п	Название препарата	Активное вещество	Структурная формула	Концентрация
1	2	3	4	5
7	Каталин	Пиреноксин		0,75 мг/мл
8	Эмоксibel	Метилэтилпиридина гидрохлорид		10 мг/мл
9	Визомитин	Пластохинонил децилтрифенилфосфония бромид		0,155 мкг/мл
10	Тауфон	Таурин		40 мг/мл

Таблица 2.5 - Структурные формулы аддуктов азолазинов м полифенолами

№ п/п	Вещество/структура	№ п/п	Вещество/структура
1	2	3	4
1		2	
3		4	

№ п/п	Вещество/структура	№ п/п	Вещество/структура
1	2	3	4
5		6	
7		8	
9		10	
11		12	
13		14	

№ п/п	Вещество/структура	№ п/п	Вещество/структура
1	2	3	4
15	 <chem>CSC1=NC2=C(N1)N=CN=C2C(=O)N3C=CC(=C3O)O</chem> + 2H ₂ O	16	 <chem>CSC1=NC2=C(N1)N=CN=C2C(=O)N3C=CC(=C3O)O</chem>
17	 <chem>CSC1=NC2=C(N1)N=CN=C2C(=O)N3C=CC(=C3O)O</chem> + 3H ₂ O	18	 <chem>CSC1=NC2=C(N1)N=CN=C2C(=O)N3C=CC(=C3O)O</chem> + 0.5H ₂ O
19	 <chem>CSC1=NC2=C(N1)N=CN=C2C(=O)N3C=CC(=C3O)O</chem> + 2H ₂ O	20	 <chem>CSC1=NC2=C(N1)N=CN=C2C(=O)N3C=CC(=C3O)O</chem>
21	 <chem>CSC1=NC2=C(N1)N=CN=C2C(=O)N3C=CC(=C3O)O</chem>	22	 <chem>CSC1=NC2=C(N1)N=CN=C2C(=O)N3C=CC(=C3O)O</chem>
23	 <chem>C(F)(F)F1=NC2=C(N1)N=CN=C2C(=O)N3C=CC(=C3O)O</chem>	24	 <chem>C(F)(F)F1=NC2=C(N1)N=CN=C2C(=O)N3C=CC(=C3O)O</chem>

№ п/п	Вещество/структура	№ п/п	Вещество/структура
1	2	3	4
25		26	
27		28	
29		30	
31		32	

2.4 Методики эксперимента

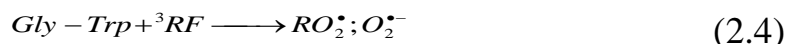
2.4.1 Определения АОА методом фотохемилюминесценции.

Процедура определения АОА фотохемилюминесцентным методом на модели фотоокисления глицил-триптофана (Gly-Trp) с использованием рибофлавина (RF) в качестве фотосенсибилизатора [305], включала в себя следующие стадии:

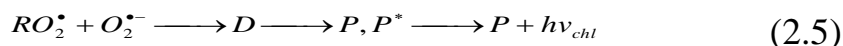
1. Воздействие на раствор, содержащий 0,1 мМ глицил-триптофан, $2 \cdot 10^{-5}$ М RF и исследуемый препарат, монохроматического излучения ($\lambda = 436$ нм), соответствующего поглощению RF в течение 60 секунд при непрерывном перемешивании (иницирование процесса):



2. Генерация свободных радикалов:



3. Регистрация сигнала фотохемилюминесценции:



4. Снижение сигнала фотохемилюминесценции как результат действия антиоксидантов:



где $h\nu$ – поглощаемый квант света,

$h\nu_{chl}$ – испускаемый квант света,

3RF – триплет рибофлавина,

O_2

RO_2^{\bullet} – пероксидный радикал глицил-триптофана,

$O_2^{\bullet-}$ – супероксид-анион радикал,

D – промежуточный продукт окисления глицил-триптофана,

A – объект исследования, содержащий антиоксиданты,

P* – фотохемилюминесцирующее вещество.

Антиоксидантную активность рассчитывали, как отношение концентрации АО в пробе к концентрации стандартного АО, в качестве которого использовали рутин:

$$A = \frac{C_{1/2}^x}{C_{1/2}^R}, \quad (2.8)$$

где $C_{1/2}^R$ - концентрация стандартного АО, ингибирующая на 50% сигнал фотохемилюминесценции по сравнению с контролем;

$C_{1/2}^X$ - концентрация АО в пробе, ингибирующая на 50% сигнал фотохемилюминесценции по сравнению с контролем.

2.4.2 Хемилюминесцентный метод определения сверхслабого свечения продуктов ПОЛ

Гомогенат суспензии липосом получали смешиванием желтка куриного яйца с фосфатным буфером в объемном соотношении 1:1 при интенсивном перемешивании [309]. Исследуемый препарат смешивали с суспензией липосом в соотношении 1 к 4 и инкубировали при температуре 37°C в условиях постоянного перемешивания, после чего к смеси добавляли 6%-ный раствор пероксида водорода и регистрировали хемилюминесценцию при длине волны 540 нм в 10-минутный период. Контрольный опыт без добавления исследуемого образца проводили аналогичным образом. АОА рассчитывали по формуле:

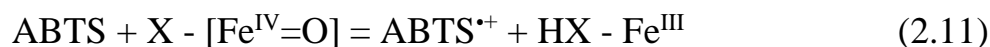
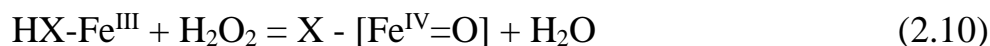
$$A = \frac{M_k - M_o}{M_k}, \quad (2.9)$$

где M_k – интенсивность свечения при проведении контрольного опыта, M_o – интенсивность свечения при проведении опыта с исследуемым образцом.

2.4.3 Метод определения общего антиоксидантного статуса (Total Antioxidant Status (TAS)).

Для определения общего антиоксидантного статуса использовали коммерческие наборы TAS Randox[®] для спектрофотометрии. Метод основан на реакции АО, содержащихся в исследуемых образцах, со стабильным

катион-радикалом $ABTS^{\bullet+}$, который генерируется при инкубировании в смеси с метмиоглобином и пероксидом водорода (реакции 2.12-2.13) [85].



где

$HX-Fe^{III}$ – метмиоглобин;

$X - [Fe^{IV}=O]$ – ферримиоглобин.

Раствор стабильного радикала $ABTS^{\bullet+}$ окрашен в зелено-голубой цвет и имеет максимум поглощения при длине волны 600 нм. При введении образца, содержащего вещества с антиоксидантными свойствами, развитие окраски $ABTS^{\bullet+}$ подавляется пропорционально содержанию АО в тестируемой пробе.

Измерения производили в следующем порядке:

1. $ABTS + \text{метмиоглобин} + H_2O$, (A_1);
2. $ABTS + \text{метмиоглобин} + H_2O_2$, (A_2);
3. $ABTS + \text{метмиоглобин} + Trolox$, (A_3);
4. $ABTS + \text{метмиоглобин} + Trolox + H_2O_2$, (A_4);
5. $ABTS + \text{метмиоглобин} + \text{исследуемый образец}$, (A_5);
6. $ABTS + \text{метмиоглобин} + \text{исследуемый образец} + H_2O_2$, (A_6).

В каждом случае измерение оптической плотности проводили через 4 минуты после сливания всех реагентов в кювету.

Общий антиоксидантный статус (TAS) рассчитывали в эквивалентах Тролокса согласно формуле (2.10) [310]:

$$TAS = \frac{1.7}{(A_2 - A_1) - (A_4 - A_3)} \cdot [(A_2 - A_1) - (A_6 - A_5)] \quad (2.12)$$

2.4.4 Метод определения гематокрита

Гематокрит - показатель общего уровня эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов по отношению к жидкой части крови – плазме, который

выражается в процентах. Для определения гематокрита использовали микрометод (по Гесту) [311]. Цельную кровь отбирали в обработанную антикоагулянтом и высохшую гематокрическую трубку и разделяли на фракции центрифугированием при скорости 3000 оборотов в минуту в течение 30-40 минут с последующим определением результата по градуированной шкале трубки.

2.4.5 Определение противорадикальной активности колориметрическим методом с использованием радикала DPPH

Определение противорадикальной активности (ПРА) проводили оптическим методом с использованием стабильного хромоген-радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH[•]) [312]. Метод основан на способности DPPH, обладающего максимумом поглощения в этаноле при 518 нм, взаимодействовать с антиоксидантами исследуемого образца.

Зависимость оптической плотности при 518 нм от концентрации DPPH представлена на рисунке 2.3 и описывается уравнением регрессии (2.13):

$$D = C_{\text{DPPH}} \cdot 9.54 \quad (2.13)$$

где D – оптическая плотность, C_{DPPH} – концентрация DPPH, М.

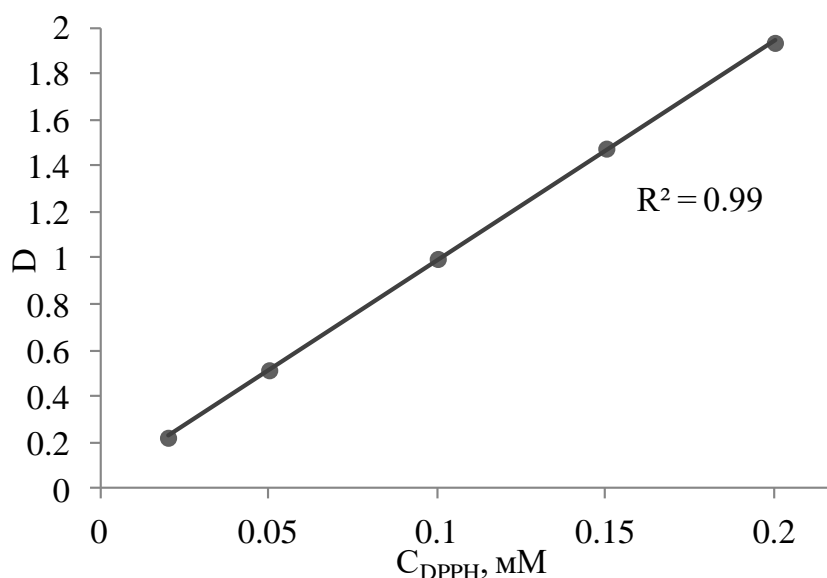


Рисунок 2.3 – Зависимость оптической плотности от концентрации DPPH

В качестве стандартного антиоксиданта использовали аскорбиновую кислоту. Зависимость изменения оптической плотности раствора DPPH от концентрации аскорбиновой кислоты представлена на рисунке 2.4 и описывается уравнением регрессии (2.16):

$$D_{AK} = C_{AK} \cdot 23.05 \cdot 10^3 \quad (2.14)$$

где ΔD_{AK} – изменение оптической плотности раствора DPPH после добавления аскорбиновой кислоты; C_{AK} – концентрация аскорбиновой кислоты, М.

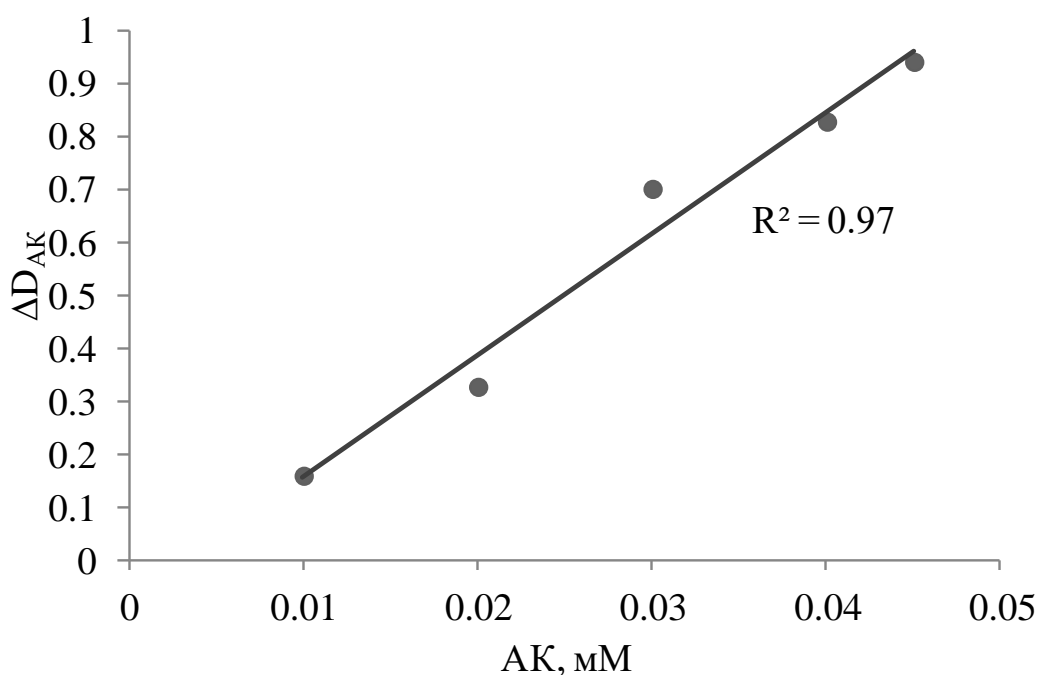


Рисунок 2.4 - Зависимость изменения оптической плотности раствора DPPH от концентрации аскорбиновой кислоты

ПРА рассчитывали по уравнению (2.17):

$$\text{ПРА (М-экв АК)} = \Delta D \cdot n/b \quad (2.15)$$

где ΔD – разность оптической плотности раствора DPPH до и после добавления образца, содержащего антиоксиданты;

b – тангенс угла наклона зависимости изменения оптической плотности раствора DPPH от концентрации аскорбиновой кислоты, $b=23.05 \cdot 10^3$;

n - степень разбавления пробы.

2.4.6 Определение общего содержания полифенолов колориметрическим методом с использованием реактива Фолина–Чокальтеу

Общее содержание полифенолов определяли колориметрическим методом с использованием реактива Фолина–Чокальтеу [313]. Реактив содержит фосфорно-вольфрамовые кислоты, которые восстанавливаются легко окисляющимися ОН-группами фенола. При этом образуется вольфрамовая синь, обладающая характерной полосой поглощения с максимумом при длине волны равной 765 нм, при которой и проводили измерение оптической плотности. В качестве стандарта использовали галловую кислоту или (+)катехин.

В данной работе метод Folin–Ciocalteu использовали в следующей модификации: к 5 мл 10% раствора реактива Фолина–Чокальтеу добавляли аликвоту исследуемого образца 0.1-0.6 мл, перемешивали, выдерживали 20 минут для прохождения реакции и развития окраски, после чего измеряли оптическую плотность.

На рисунке 2.5 представлена корреляция оптической плотности (ΔD) от концентрации галловой кислоты ($C_{ГК}$) и (+)катехина.

Общее содержание полифенолов в эквивалентах галловой кислоты ($C_{ГК}$) или (+)катехина ($C_{К}$) рассчитывали по формуле (2.16):

$$C_{ГК/К} = (D_{\text{проба}} - D) \cdot n / b \quad (2.16)$$

где $D_{\text{проба}}$ – оптическая плотность исследуемого раствора;

D – оптическая плотность, соответствующая точке пересечения калибровочной зависимости с осью y ;

b – тангенс угла наклона зависимости изменения оптической плотности раствора от концентрации галловой кислоты, $b=7.24 \cdot 10^3$;

n - степень разбавления пробы.

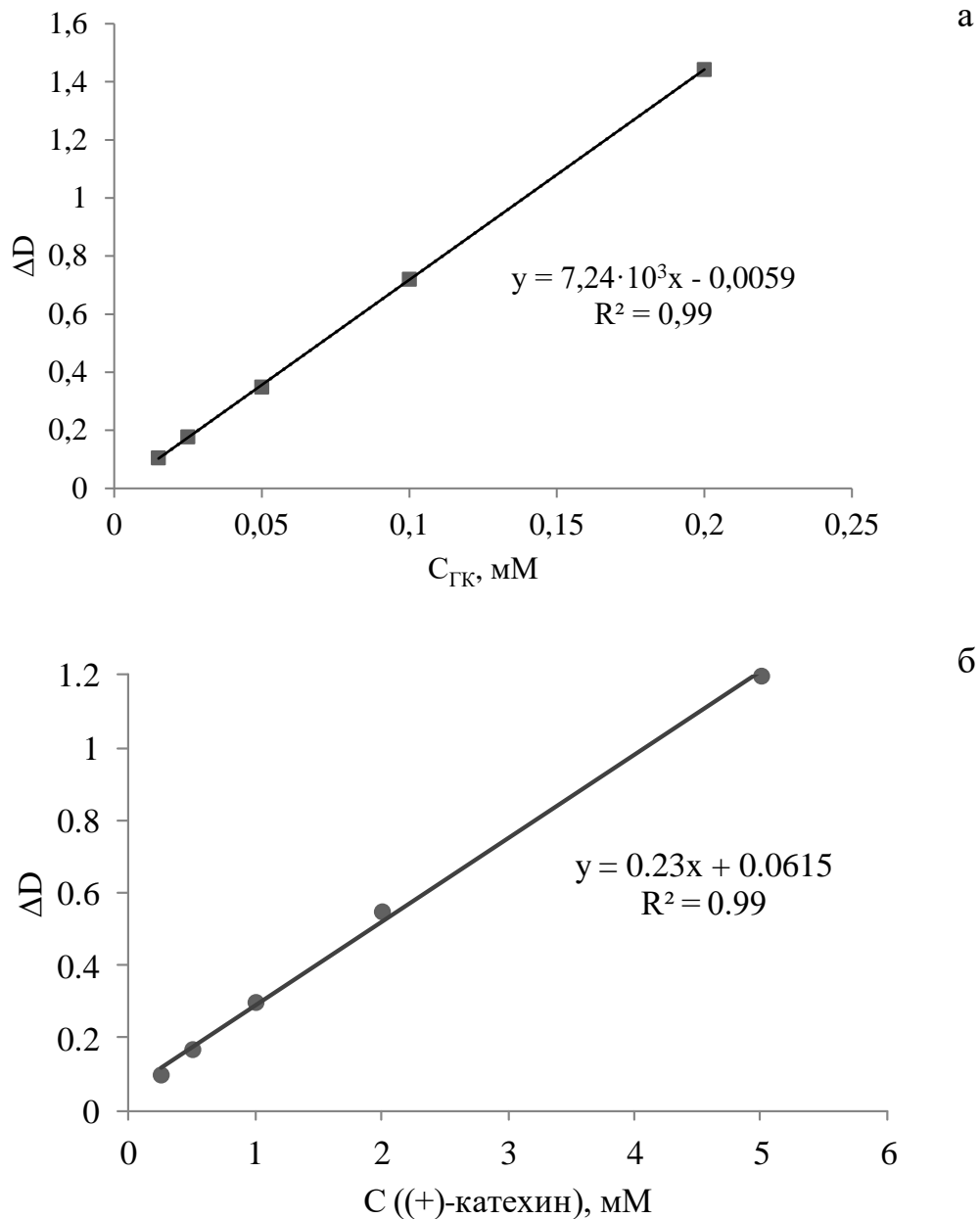


Рисунок 2.5 - График зависимости оптической плотности от концентрации галловой кислоты (а) и (+)катехина (б).

2.4.7 Статистическая обработка результатов

Относительное стандартное отклонение при доверительной вероятности $P = 0.95$ (%) рассчитывали по формуле (2.17):

$$S_r = S \cdot 100 \% / \bar{m} \quad (2.17)$$

где S - стандартное отклонение, рассчитываемое по (2.18);

$$S = \sqrt{\frac{\sum(m_i - \bar{m})^2}{n-1}} \quad (2.18)$$

m_i – i -ое значение случайной величины;

\bar{m} – среднее значение;

$n - 1 = f$ - число степеней свободы.

Доверительный интервал определяли по формуле (2.20):

$$\pm \Delta_c = \pm \frac{S \cdot t_{af}}{\sqrt{n}} \quad (2.20)$$

t_{af} – коэффициент Стьюдента, $t_{af} = 2.8$ при $\alpha = 0.05$;

n – число измерений.

2.4.8 Оценка предела обнаружения потенциометрического способа

Для подавляющего большинства методик количественного анализа предел обнаружения C_{lim} устанавливается вероятностным способом [314]. Для этого строится зависимость относительного стандартного отклонения σ от усредненных значений искомой величины, в данном случае, антиоксидантной емкости (АОЕ) и антирадикальной емкости (АРЕ), определенной потенциометрическим методом, для всего интервала концентраций. Предел обнаружения оценивается по графику зависимости $\sigma = f(C_i)$. Величина C_{lim} соответствует минимальному содержанию компонента пробы, определяемому данным подходом с относительным стандартным отклонением $\sigma = 0.33$. Таким образом, методика не может быть использован для проб, концентрации компонентов которых определяются с $\sigma > 0.33$.

ГЛАВА 3 ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕГРАЛЬНОГО ПАРАМЕТРА АОЕ, ОСНОВАННОГО НА РЕАКЦИИ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА.

Как было отмечено ранее, одной из основных проблем при определении интегрального параметра АОЕ, основанного на реакциях переноса электронов, является обоснованность выбора модели окислителя. Расходование правильно подобранного окислителя в химической реакции окисления – восстановления с АО даст информацию об АОЕ. В литературе, к сожалению вопросу обоснованности выбора модели окислителя уделяется мало внимания, тогда как от этого напрямую будет зависеть корректность получаемой информации.

3.1 Потенциометрия в оценке АОЕ индивидуальных соединений и интегральной величины АОЕ, теоретические подходы

Термодинамическая возможность протекания реакций между модельным окислителем и антиоксидантами исследуемого образца определяется окислительно-восстановительными потенциалами сопряженных пар участников, а степень их протекания зависит от разности этих потенциалов и скорости химических взаимодействий антиоксидант-окислитель. В предложенных в литературе подходах, как правило, термодинамика реакций не рассматривается.

Вторым обычно не учитываемым фактором является кислотность среды, которая определяет величину реального окислительно-восстановительного потенциала системы антиоксидант-окислитель и степень протонизации молекул. Реакции, положенные в основу многих известных методик определения АОА/АОЕ, как правило реализуются в кислых или щелочных средах, что не соответствует физиологическим условиям, а, следовательно, данные об антиоксидантных свойствах объектов, полученные этими методами нельзя однозначно интерпретировать, имея в виду их действие в организме.

Как известно, в кислых средах происходит сдвиг равновесия в сторону протонированных фенолов и тиолов, в результате снижается реакционная способность енольных антиоксидантов, а соединения тиольной природы теряют свою антиоксидантную активность. В щелочных средах соединения тиольной природы (R-SH) неустойчивы и могут разлагаться или подвергаться более глубокому окислению, что не соответствует механизму реального действия тиольных соединений в организме. Поскольку эти параметры сильно зависят от рН раствора, определение антиоксидантной активности должно осуществляться в физиологических условиях, в которых АО «работает» в организме. Отсюда следует, первостепенное значение правильности выбора окислителя и рН среды.

Существенной является также стехиометрия реакций взаимодействия выбранного окислителя с антиоксидантами. Важно, чтобы в реакцию с окислителем антиоксиданты вступали в строго стехиометричном соотношении, соответствующем количеству функциональных групп, проявляющих антиоксидантные свойства, на что также не всегда обращается должное внимание.

Кроме того, как уже отмечалось ранее, отсутствие универсальных единиц измерения является существенным препятствием при интерпретации и сравнении результатов исследования. При разработке новых подходов к созданию методов оценки АОЕ важно также учесть экспрессность анализа и возможность исследования окрашенных образцов.

Таким образом, можно сформулировать требования, выполнение которых необходимо для корректного определения интегральной величины АОЕ [315]:

- 1) реакция переноса электрона с АО на молекулу окислителя должна быть термодинамически возможной;
- 2) окислительно-восстановительный потенциал окислителя в условиях анализа должен находиться между потенциалами АКМ и АО, но между ними должна существовать определённая разность.

- 3) реакция окислителя с АО должна реализовываться в условиях, близких к физиологическим, т.е. при рН близком к 7;
- 4) реакция окислителя с АО должна протекать стехиометрично в соответствии с количеством функциональных групп, проявляющих антиоксидантные свойства;
- 5) должна быть реализуемой возможность получать результат в универсальных единицах измерения, например, М-экв;
- 6) должна быть обеспечена возможность анализировать широкий круг объектов, в том числе окрашенных;
- 7) скорость окислительно-восстановительной реакции должна быть достаточной высокой, чтобы процесс реализовывался в разумное время.

В таблицах 3.1 и 3.2 приведены стандартные окислительно-восстановительные потенциалы основных АКМ и некоторых антиоксидантов и их значения, рассчитанные для рН=7.

Таблица 3.1 - Окислительно-восстановительные потенциалы активных кислородных метаболитов [315]

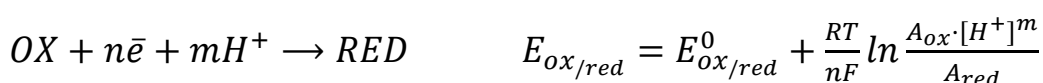
АКМ	Стандартный потенциал системы,* В отн. НВЭ	Стандартный потенциал системы,** В отн. НВЭ	Уравнение полуреакции	Потенциал системы при рН=7,*** В отн. НВЭ
$\text{H}_2\text{O}_2/\text{OH}^\bullet$	+1.14		$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ + e = \text{OH}^\bullet + \text{H}_2\text{O}$	+0.72
$\text{HO}_2^\bullet/\text{H}_2\text{O}_2$	+1.44		$\text{HO}_2^\bullet + \text{H}^+ + e = \text{H}_2\text{O}_2$	+1.02
$\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$	+1.763		$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2e = \text{H}_2\text{O}$	+1.343
$\text{OH}^\bullet/\text{H}_2\text{O}$	+2.38		$\text{OH}^\bullet + \text{H}^+ + e = \text{H}_2\text{O}$	+1.96
$\text{HO}_2^\bullet/\text{H}_2\text{O}$	+1.65		$\text{HO}_2^\bullet + 3\text{H}^+ + 3e = 2\text{H}_2\text{O}$	+1.23
$\text{O}_2^\bullet/\text{OH}^-$		+0.645	$\text{O}_2^\bullet + 2\text{H}_2\text{O} + 3e = 4\text{OH}^-$	+1.205
$\text{O}_2^\bullet/\text{HO}_2^-$		+0.20	$\text{O}_2^\bullet + \text{H}_2\text{O} + e = \text{HO}_2^- + \text{OH}^-$	+0.62
$\text{HO}_2^-/\text{OH}^\bullet$		+0,184	$\text{HO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + e = \text{OH}^\bullet + 2\text{OH}^-$	+1.024
$\text{OH}^\bullet/\text{OH}^-$		+1.985	$\text{OH}^\bullet + e = \text{OH}^-$	+2.405

* Стандартный окислительно-восстановительный потенциал измерен относительно нормального водородного электрода при рН=0 и активности соединений равных 1 [316].

**Стандартный окислительно-восстановительный потенциал измерен относительно нормального водородного электрода при pH=14 и активности соединений равных 1 [316].

*** Окислительно-восстановительный потенциал пересчитан для pH=7 с учетом числа электронов и ионов водорода или гидроксила, участвующих в окислительно-восстановительном равновесии. Расчет проводился по уравнениям (3.1) и (3.2), вывод которых приведен ниже:

1. Для реакций в кислой среде стандартный потенциал приведен для pH=0



$$E_{ox/red} = E_{ox/red}^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{A_{ox}}{A_{red}} + \frac{mRT}{nF} \ln [H^+]$$

При T=298 K и активностях равных 1 имеем

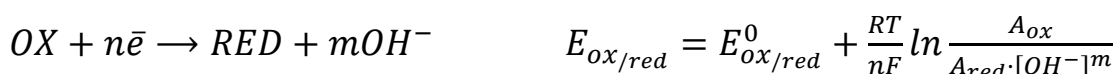
$$E_{ox/red} = E_{ox/red}^0 + \frac{0.059m}{n} \lg [H^+]$$

$$E_{ox/red} = E_{ox/red}^0 - \frac{0.059m}{n} \text{pH}$$

Если стандартный потенциал приведен для pH=0, то для pH=7 окислительно-восстановительный потенциал примет значение

$$E_{ox/red} = E_{ox/red}^0 - \frac{0.42m}{n} \quad (3.1)$$

2. Для реакций в щелочной среде стандартный потенциал приведен для pH=14



$$E_{ox/red} = E_{ox/red}^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{A_{ox}}{A_{red}} - \frac{mRT}{nF} \ln [OH^-]$$

При T=298 K и активностях равных 1 имеем

$$E_{ox/red} = E_{ox/red}^0 - \frac{0.059m}{n} \lg [OH^-]$$

$$E_{ox/red} = E_{ox/red}^0 + \frac{0.059m}{n} \text{pOH}$$

$$E_{ox/red} = E_{ox/red}^0 + \frac{0.059m}{n} (14 - \text{pH})$$

Если стандартный потенциал приведен для $\text{pH}=14$, то для $\text{pH}=7$ окислительно-восстановительный потенциал примет значение

$$E_{ox/red} = E_{ox/red}^0 + \frac{0.42m}{n} \quad (3.2)$$

где

A_{ox} – активность окисленной формы сопряженной окислительно-восстановительной пары;

A_{red} - активность восстановленной формы сопряженной окислительно-восстановительной пары;

m – число протонов или ионов гидроксила, участвующих в окислительно-восстановительной полуреакции;

n - число электронов, участвующих в окислительно-восстановительной полуреакции.

К сожалению, окислительно-восстановительные потенциалы соединений с антиоксидантными свойствами до сих пор в достаточной мере не изучены и значения стандартных потенциалов многих из них найти в литературе не удалось. Малочисленные литературные данные противоречивы, возможно, из-за того, что измерения проводились не в стандартизованных различных условиях. Экспериментально измеренные нами в одних и тех же условиях окислительно-восстановительные потенциалы основных антиоксидантов приведены в таблице 3.2.

Таблица 3.2 - Окислительно-восстановительные потенциалы (В) некоторых антиоксидантов, полученные экспериментально при рН=7 и соотношении активностей соединений равных 1 [315]

Цистеин	Глутатион	Мочевая кислота	Катехол	Аскорбиновая кислота	Пирогаллол	Кофейная кислота	Рутин
-0.26	-0.22	-0.03	-0.12	-0.23	-0.23	-0.14	-0.06

Из данных, приведённых в таблицах 3.1 и 3.2, следует, что окислитель, Ох/Red потенциал которого лежит в пределах 0- +0,62 В должен корректно обеспечить необходимые термодинамические условия протекания аналитической сигналообразующей реакции в условиях нейтральной среды (рН 7).

В таблице 3.3 приведены стандартные окислительно-восстановительные потенциалы соединений, которые наиболее часто используются в качестве модели окислителя при определении АОЕ как интегрального параметра, основанного на реакциях переноса электрона.

Сравнивая данные таблиц 3.1-3.2 и 3.3, легко видеть, что многие из этих соединений, кроме DPPH и гексацианоферратов железа имеют достаточно высокий стандартный потенциал, близкий к потенциалам АКМ, а в случае церия превышает его. С термодинамической точки зрения в нейтральной среде эти соединения будут хорошо окислять многие вещества, в число которых, вероятно, войдут соединения, не обладающие антиоксидантными свойствами или даже действующие как оксиданты. Таким образом, с точки зрения термодинамики химических реакций, существуют серьезные сомнения в корректности использования некоторых соединений, выбранных в качестве окислителя для интегральной оценки АОЕ. Обсуждение роли окислительно-восстановительных потенциалов систем «оксиданты/ окислитель/ антиоксиданты» появились только в последнее десятилетие в единичных

работах [69, 103, 319, 320], хотя этот вопрос заслуживает гораздо большего внимания.

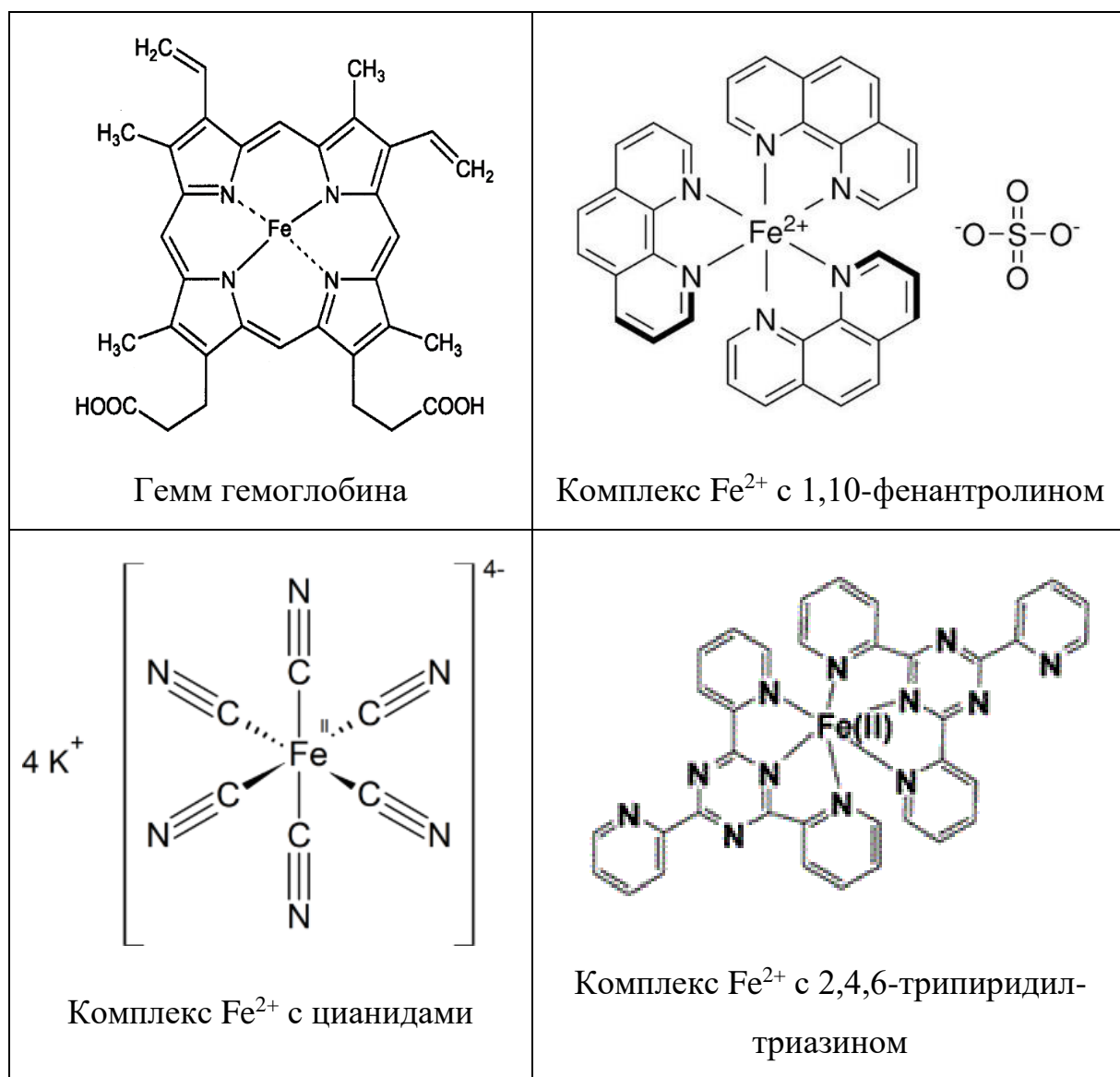
Таблица 3.3 Окислительно-восстановительные потенциалы модельных окислителей, используемых в качестве реагентов в некоторых методах исследования интегрального параметра АОЕ [315]

Сопряженная пара окислителя	Метод, в котором используется окислитель	Потенциал, В отн.НВЭ	Ссылка
$I_2/2I^-$	Кулонометрия с электрогенерированным йодом	+0.621	[317]
$Br_2/2Br^-$	Кулонометрия с электрогенерированным бромом	+1.087	[317]
Ce^{4+}/Ce^{3+}	Цериметрия	+1.4 - +1.731 (в зависимости от окружения)	[317]
Cu(II)-неокупроин / Cu(I)-неокупроин	CUPRAC	+0.6	[79] [104]
ABTS [®]	TEAC	+0.68	[69]
$Fe(III)(TPTZ)_2Cl_3 / Fe(II)(TPTZ)_2Cl_3$	FRAP	+0.7	[69]
[1,10-фенантролин] $Fe^{3+} / [1,10-фенантролин]Fe^{2+}$	FRAP	+1.02	[317]
1,1-дифенил-2-пикрилгидразил	DPPH метод	+0.495	[318]
$K_3[Fe(CN)_6] / K_4[Fe(CN)_6]$	Предлагаемый потенциометрический метод	+0.36	[317]

Большое распространение получили методы, основанные на реакциях переноса электронов с антиоксидантов на комплексы железа, объединенные в группу методов FRAP. В методах «железевосстанавливающей способности» в качестве окислителя используют комплексы железа с 2,4,6-трипиридил-

триазином, 1,10-фенантролином и цианидами. С точки зрения строения, эти комплексы выбраны удачно. Они имеют устойчивую гексагональную структуру, подобную структуре гемма гемоглобина (Таблица 3.4).

Таблица 3.4 - Строение гемма гемоглобина и комплексов ионов железа с с 2,4,6-трипиридил-триазином, 1,10-фенантролином и цианидами



Однако, соединения железа в зависимости от окружения имеют различные окислительно-восстановительные потенциалы. В таблице 3.5 приведены значения стандартных потенциалов для сопряженной пары Fe²⁺/Fe³⁺ в зависимости от природы лиганда.

Таблица 3.5 - Изменение потенциала сопряженной пары Fe^{2+}/Fe^{3+} в зависимости от природы лиганда [315]

Лиганд	Сопряженная окислительно-восстановительная пара	Стандартный потенциал, В отн. НВЭ	Ссылка
-	Fe^{2+}/Fe^{3+}	+0.77	[317]
HCl	$[FeCl_6]^{4-}/[FeCl_6]^{3-}$	+0.53	[321]
H ₃ PO ₄	$[Fe(PO_4)_2]^{4-}/[Fe(PO_4)_2]^{3-}$	+0.41	[321]
HF	$[FeF_6]^{4-}/[FeF_6]^{3-}$	+0.40	[321]
KCN	$[Fe(CN)_6]^{4-}/[Fe(CN)_6]^{3-}$	+0.36	[317], [321]
ЭДТА	$[FeY]^{2-}/[FeY]^{-}$	+0.12	[321]
H ₂ C ₂ O ₄	$[Fe(C_2O_4)_3]^{4-}/[Fe(C_2O_4)_3]^{3-}$	-0.02	[321]
1,10- фенантролин	$[Fe(Phen)_3]^{2+}/[Fe(Phen)_3]^{3+}$	+1.12	[321]
дипиридил	$[Fe(DP)_3]^{2+}/[Fe(DP)_3]^{3+}$	+1.10	[321]
2,4,6- трипиридил- триазин	$[Fe(TPTZ)_2]^{2+}/[Fe(TPTZ)_2]^{3+}$	+0.7	[69]

Из таблицы видно, что в зависимости от лиганда окислительно-восстановительная пара Fe^{2+}/Fe^{3+} может проявлять как свойства сильного окислителя (комплексы с фенантролином, 2,4,6- трипиридил-триазином и пиридиллом), окислителя средней силы (комплексы с хлоридом, фторидом, цианидом, фосфатом), так и свойства восстановителя (комплекс с ЭДТА и оксалатом). В связи с этим непонятен смысл термина «железовосстанавливающая способность». Результаты, полученные этим методом с 2,4,6- трипиридил-триазином, 1,10-фенантролином и цианидами, очевидно, будут отличаться друг от друга.

В некоторых методах не все антиоксиданты вступают в реакции с выбранным окислителем. В частности, методы FRAP не позволяют определять содержание тиолсодержащих антиоксидантов (цистеин и глутатион) [101, 102], являющихся очень важной составляющей антиоксидантной системы защиты, хотя исходя из термодинамических характеристик, реакции с тиолами должны осуществляться. Причиной этого является использование в этих методиках кислых сред, в которых тиолы депротонированы и не вступают в химическую реакцию с комплексами железа в этих условиях. Необходимость применять именно кислую среду в этой ситуации обусловлена недостаточной прочностью используемых комплексов и возможным гидролизом. В таблице 3.6 приведены константы нестойкости некоторых комплексов железа.

Таблица 3.6 - Константы нестойкости некоторых комплексов железа [315]

Соединение	К	pK	ссылка
[1,10-фенантролин]₃Fe³⁺	$8.0 \cdot 10^{-15}$	14.1	[322]
[1,10-фенантролин]₃Fe²⁺	$5.0 \cdot 10^{-22}$	21.3	[322]
[Fe(CN)₆]³⁻	$1.0 \cdot 10^{-31}$	42	[323]
[Fe(CN)₆]⁴⁻	$1.0 \cdot 10^{-24}$	35	[323]

Так, например, в методах FRAP используют раствор, содержащий $3,3 \cdot 10^{-3}$ М Fe³⁺ + 10^{-2} М *o*-фенантролин. В водном растворе, содержащем Fe²⁺/Fe³⁺ и 1,10-фенантролин возможны 4 равновесия:



Для равновесия (3.4)

$$K_H = \frac{[Fe^{3+}] \times [Ph]^3}{[Fe(Ph)_3]^{3+}} = 8 \cdot 10^{-15}$$

$$8 \times 10^{-15} = \frac{[Fe^{3+}] \cdot [3Fe^{3+}]^3}{[Fe(Ph)_3]^{3+}} = \frac{3^3 \cdot [Fe^{3+}]^4}{0.0033}$$

$$[Fe^{3+}] = \sqrt[4]{\frac{8 \times 10^{-15} \times 0.0033}{27}} = 3.14 \cdot 10^{-5} \text{ M}$$

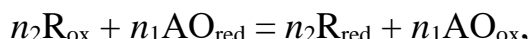
Таким образом, в растворе будет присутствовать достаточно большое количество свободных ионов $[Fe^{3+}]$.

А растворимость $Fe(OH)_3$ при $pH=7$

$$L_{Fe(OH)_3} = \frac{ПР_{Fe(OH)_3}}{[OH^-]^3} = \frac{3.2 \cdot 10^{-38}}{10^{-21}} = 3.2 \cdot 10^{-17} \text{ M,}$$

В этих условиях Fe^{3+} будет подвергаться гидролизу и выпадать в осадок. Аналогичная ситуация наблюдается в случае использования комплексов ТРТЗ с ионами железа. Соответственно, чтобы избежать выпадения осадка $Fe(OH)_3$ необходимо использовать достаточно кислые среды.

Итак, ранее было показано, что потенциал окислителя должен находиться в интервале 0- +0,62 В. В аналитической практике принято делать расчеты, исходя из условия, что реакция протекает на 99.9%. Действительно, если после завершения реакции продуктов реакции будет 99,9%, а исходных веществ 0,1%, то для реакции



где

R_{ox}/R_{red} – ОВ пара реагента – окислителя

AO_{red}/AO_{ox} – ОВ пара антиоксиданта,

имеем константу равновесия:

$$K_p = \frac{(99,9)^{n_2} \cdot (99,9)^{n_1}}{(0,1)^{n_2} \cdot (0,1)^{n_1}} = 10^{3n_1} \cdot 10^{3n_2} = 10^{3(n_1+n_2)}.$$

Учитывая, что

1. в стандартных условиях $\lg K_p = \frac{n_1 n_2 \Delta E}{0,059}$,
2. число групп с антиоксидантными свойствами колеблется от 1 (например, цистеин) до 5 (кверцетин),

простой термодинамический расчет дает разницу потенциалов участников реакции в зависимости от числа функциональных антиоксидантных групп от 220-360 мВ. Т.е. величина 360 мВ является термодинамически необходимой и достаточной для реализации реакций со всеми АО. Из приведенных выше данных видно, что наиболее подходящим окислителем для исследования антиоксидантных свойств веществ в нейтральной среде с термодинамической точки зрения является гексацианоферрат (III) калия.

Использование при исследовании антиоксидантных свойств веществ одновременно окисленной и восстановленной форм открывает широкие возможности для применения простого, дешевого, экспрессного потенциометрического метода измерения.

К преимуществам выбранной системы можно отнести высокую электрохимическую обратимость и высокие значения констант устойчивости. Эта система, в отличие от окислителей, применяемых в других методах, может использоваться в нейтральной среде. Ниже приведены расчеты, подтверждающие это.

В растворе возможны 5 равновесий:





При концентрациях реагентов 0,01 М $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ и 0,0001 М $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$

Для равновесия (3.7)

$$K_{\text{н}} = \frac{[\text{Fe}^{2+}] \times [\text{CN}^-]^6}{[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}} = 10^{-35}$$

$$10^{-35} = \frac{[\text{Fe}^{2+}] \times [6\text{Fe}^{2+}]^6}{[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}} = \frac{6^6 \times [\text{Fe}^{2+}]^7}{0.0001}$$

$$[\text{Fe}^{2+}] = \sqrt[7]{\frac{10^{-35} \times 0.0001}{6^6}} = 5.8 \times 10^{-7} \text{ М}$$

Растворимость $\text{Fe}(\text{OH})_2$ при pH=7

$$L_{\text{Fe}(\text{OH})_2} = \frac{\text{ПР}_{\text{Fe}(\text{OH})_2}}{[\text{OH}^-]^2} = \frac{10^{-15}}{10^{-14}} = 10^{-1} \text{ М}$$

Для равновесия (3.8)

$$K_{\text{н}} = \frac{[\text{Fe}^{3+}] \times [\text{CN}^-]^6}{[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}} = 10^{-42}$$

$$10^{-42} = \frac{[\text{Fe}^{3+}] \times [6\text{Fe}^{3+}]^6}{[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}} = \frac{6^6 \times [\text{Fe}^{3+}]^7}{0.01}$$

$$[\text{Fe}^{3+}] = \sqrt[7]{\frac{10^{-42} \times 0.01}{6^6}} = 1.1 \times 10^{-7} \text{ М}$$

Однако, поскольку комплекс $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ более устойчивый, чем $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, то за счет распада комплекса двухвалентного железа, равновесие в растворе будет сдвигаться в сторону образования комплекса $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Так концентрация свободных ионов $[\text{Fe}^{2+}] = 5.8 \times 10^{-7} \text{ М}$, тогда концентрация высвободившихся ионов $[\text{CN}^-]$ при диссоциации комплекса $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ будет составлять

$$[\text{CN}^-]_1 = 6 \times [\text{Fe}^{2+}] = 5.8 \times 10^{-7} \times 6 = 3.5 \times 10^{-6} \text{ М}$$

а концентрация высвободившихся ионов $[CN^-]$ при диссоциации комплекса $[Fe(CN)_6]^{3-}$ будет составлять соответственно

$$[CN^-]_2 = 6x[Fe^{3+}] = 1.1 \times 10^{-7} \times 6 = 6.6 \times 10^{-7} \text{ М}$$

Таким образом, суммарное содержание свободных ионов $[CN^-]$ составит

$$\sum [CN^-] = 4.2 \times 10^{-6} \text{ М}$$

С учетом вышеизложенного, концентрация свободных ионов $[Fe^{3+}]$ в реальных условиях составит

$$[Fe^{3+}] = \frac{10^{-42} \times 0.01}{[4.2 \times 10^{-6}]^6} = 1.82 \times 10^{-12} \text{ М}$$

Таким образом, концентрация свободных ионов $[Fe^{3+}]$ сильно снижается из-за сдвига равновесия в реальной смеси компонентов.

Несмотря на то, что растворимость $Fe(OH)_3$ при $pH=7$

$$L_{Fe(OH)_3} = \frac{PP_{Fe(OH)_3}}{[OH^-]^3} = \frac{3.2 \times 10^{-38}}{10^{-21}} = 3.2 \times 10^{-17} \text{ М},$$

концентрация свободных ионов $[Fe^{3+}]$ в растворе настолько мала, что не повлияет на результаты химического взаимодействия с антиоксидантами и потенциометрические измерения антиоксидантной емкости.

В общем случае выбор рабочего диапазона pH можно осуществлять при помощи расчета условных констант устойчивости. Условную константу устойчивости комплексов вычисляли по формуле (3.12):

$$\beta = \beta^T \cdot \alpha_M \cdot \alpha_L^n \quad (3.12)$$

где β - условная константа устойчивости комплекса; β^T - термодинамическая константа устойчивости комплекса; α_M - молярная доля металла, вычисленная с учетом равновесий (3.9) и (3.10); α_L - молярная доля лиганда, вычисленная с учетом равновесия (3.11).

Молярные доли металла и лиганда определяли по формулам (3.13)-(3.14).

$$\alpha_M = \frac{1}{1 + \beta_1[OH^-] + \dots + \beta_n[OH^-]^n} \quad (3.13)$$

где β_n - константа устойчивости соответствующего гидроксокомплекса металла;

$$\alpha_L = \frac{K_1 \cdot \dots \cdot K_n}{[H^+]^n + [H^+]^{n-1} \cdot K_1 \cdot \dots \cdot K_{n-1} + K_1 \cdot \dots \cdot K_n} \quad (3.14)$$

где K_n – константа ионизации кислоты, соответствующей лиганду.

На рисунке 3.1 приведена зависимость логарифма условных констант устойчивости комплексов $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ и $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ от pH.

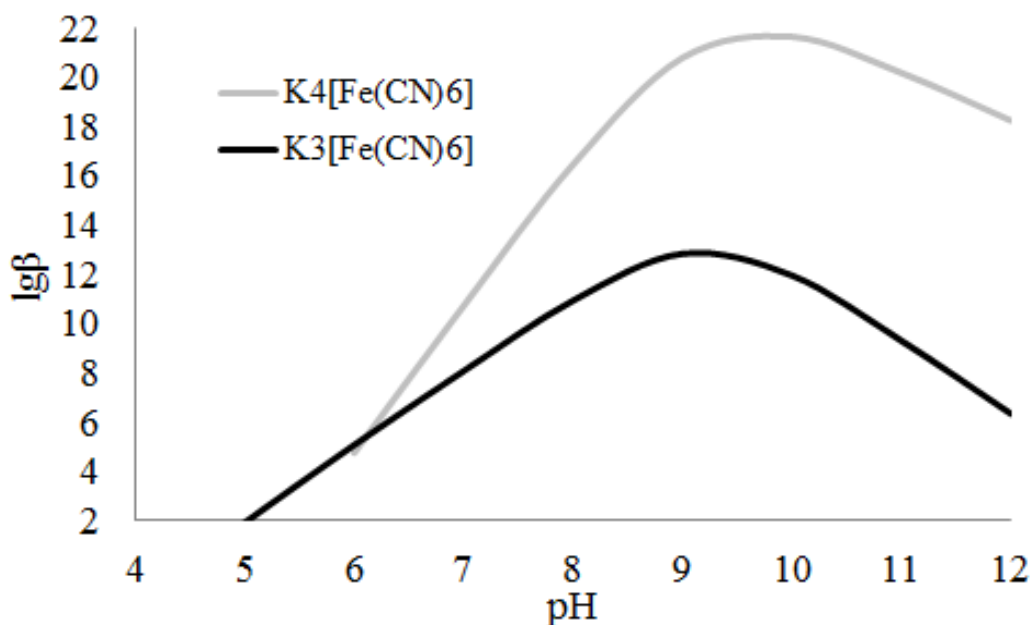
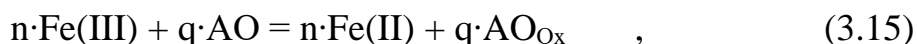


Рисунок 3.1 Зависимость условной константы устойчивости комплексов $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ и $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ от pH [324]

В практике аналитической химии с использованием комплексных соединений исходя из положений теории равновесия принято считать, что количественный анализ возможен, если условная константа устойчивости комплексов превышает 10^8 . Расчет условных констант устойчивости показывает, что использование системы $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ возможно в достаточно широкой области pH, включая нейтральную среду.

Изменение соотношения концентраций окисленной и восстановленной форм системы, содержащей $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, являющегося результатом протекания реакции переноса электрона с исследуемого АО на окисленный компонент системы (реакция 3.15), будет сопровождаться изменением

потенциала системы, которое можно достаточно легко зафиксировать [319, 320].



где АО – антиоксидант, АО_{Оx} – продукт окисления антиоксиданта; n, q – стехиометрические коэффициенты реакции.

Потенциал системы в определенных условиях строго подчиняется уравнению Нернста, поэтому до введения анализируемого образца может быть выражен уравнением:

$$E = E_0 + b \cdot \lg \frac{C_{\text{Ox}}}{C_{\text{Red}}} \quad , \quad (3.16)$$

где $b = 2.3 \cdot RT/nF$;

E – измеряемый потенциал в системе до введения анализируемого образца, мВ;

C_{Ox} – концентрация окисленной формы системы в ячейке, М;

C_{Red} – концентрация восстановленной формы системы в ячейке, М.

После завершения реакции окисленного компонента системы с исследуемыми АО потенциал системы будет определяться как:

$$E_1 = E_0 + b \cdot \lg \frac{C_{\text{Ox}} - \sum C_{\text{АО}_{1/z}}}{C_{\text{Red}} + \sum C_{\text{АО}_{1/z}}} \quad , \quad (3.17)$$

где E_1 – измеряемый потенциал в системе после завершения реакции окисленного компонента системы с исследуемыми АО, мВ;

$\sum C_{\text{АО}_{1/z}}$ – суммарное содержание АО в исследуемом образце, моль-экв./дм³.

Общее содержание АО в исследуемом образце, выраженное в моль-экв./дм³ будет соответствовать интегральному параметру антиоксидантной емкости исследуемого раствора. Таким образом, изменение потенциала ($E_1 - E$) служит источником информации об АОЕ. Выразив уравнения 3.16 и 3.17 через

разность и преобразуя их относительно $\sum C_{AO_{1/2}}$, для величины АОЕ (моль-экв./дм³) получаем выражения (3.18-3.19):

$$AOE = \frac{C_{Ox} - \alpha C_{Red}}{1 + \alpha} \quad (3.18)$$

$$\alpha = C_{Red} / C_{Ox} \cdot 10^{(E_1 - E)nF/2.3RT}, \quad (3.19)$$

Так как в состав молекулы антиоксиданта может входить несколько функциональных групп с антиоксидантными свойствами, под АОЕ понимается эффективная эквивалентная концентрация антиоксидантов, вступивших в реакцию с $K_3[Fe(CN)_6]$. Стехиометрический коэффициент реакции рассчитывали, как

$$n = \frac{AOE}{C}, \quad (3.20)$$

где n – стехиометрический коэффициент уравнения 3.15;

АОЕ – антиоксидантная емкость, рассчитанная по уравнениям 3.18-3.19 в М-экв;

C – концентрация АО в моль/дм³.

3.2 Обоснование и выбор рабочих условий проведения измерений АОЕ

3.2.1 Выбор материала рабочего электрода при определении АОЕ

В потенциометрических измерения большая роль играет материал, из которого изготовлен рабочий электрод. Критериями для выбора рабочего электрода являлись:

1. диапазон потенциалов, измерение которого обеспечивает материал электрода;
2. материал электрода должен обеспечивать Нернстовскую зависимость изменения потенциала системы от соотношения форм системы;

3. быстрое установление равновесного или стационарного потенциала и его стабильность;
4. подчинение термоактивационным закономерностям.

Из литературных данных известно, что к наиболее подходящим электродам для измерения ОВП относятся электроды, выполненные из платиновых, золотых и стеклоуглеродных материалов. При этом платиновые электроды используют для измерения ОВП в диапазоне от -0.1 до $+0.9$ В, электроды из золота – от -0.1 до $+0.3$ В, электроды из стеклоуглерода – от -0.9 до $+0.8$ В [325, 326]. В таблице 3.7 представлены расчетные данные и экспериментально полученные результаты изменения потенциала (ΔE) при добавлении различной концентрации $K_4[Fe(CN)_6]$ к системе, содержащей 0.01 М $K_3[Fe(CN)_6]$ и 0.0001 М $K_4[Fe(CN)_6]$ с использованием рабочих электродов, выполненных из стеклоуглеродного и платинового материалов.

Таблица 3.7 - Изменение потенциала электродов при добавлении различной концентрации $K_4[Fe(CN)_6]$

Конечная концентрация $K_4[Fe(CN)_6]$, мМ	ΔE , мВ (n=10, p=0.95, t=25 ⁰ C)		
	Расчетное значение	Стеклоуглеродный электрод	Платиновый электрод
0.4	42	45 ± 5	43 ± 2
0.9	61	66 ± 4	63 ± 2
5.9	129	126 ± 5	129 ± 1

Подчинение Нернстовской зависимости изменения потенциала системы от соотношения форм системы весьма важно для анализа, т.к. напрямую от этого напрямую зависит точность получаемых результатов. Значения ΔE , полученные как для стеклоуглеродных, так и для платиновых рабочих электродов близки к расчетным. Однако, стоит отметить, что на платиновых электродах установление потенциала происходит значительно быстрее (~ 10 сек.) по сравнению со стеклоуглеродными электродами (~ 5 мин.). Также в

пользу платинового электрода при выборе существенную роль сыграло отсутствие дрейфа и высокая стабильность потенциала по сравнению со стеклоуглеродным.

Быстрота установления потенциала в данном случае является очень существенным фактором, т.к. в большинстве случаев сопряженная пара AO_{red}/AO_{ox} представляет собой плохо обратимые или необратимые системы. В результате переноса электрона с необратимой системы на обратимую ($K_3[Fe(CN)_6] / K_4[Fe(CN)_6]$) появляется возможность количественно измерить результат этого переноса, но при этом время установления равновесного потенциала должно быть меньше, чем время реакции $K_3[Fe(CN)_6]$ с АО образца.

На рисунке 3.2 представлена экспериментально полученная зависимость потенциала системы $K_3[Fe(CN)_6] / K_4[Fe(CN)_6]$ от логарифма отношения концентраций окисленной и восстановленной форм при различных температурах. Можно заметить, что данная зависимость близка к Нернстовской. При увеличении температуры тангенс угла наклона увеличивается. Экспериментальные значения тангенса угла наклона, рассчитанные из данных графиков, близки к теоретическим значениям (табл.3.8).

Подчинение термоактивационным закономерностям играет существенную роль, т.к. для обеспечения условий, близких к физиологическим, необходимо проводить эксперимент при повышенной температуре.

На основании вышеизложенного, можно сделать вывод, что в качестве рабочего электрода может быть использован платиновый электрод, т.к. он удовлетворяет сформулированным критериям.

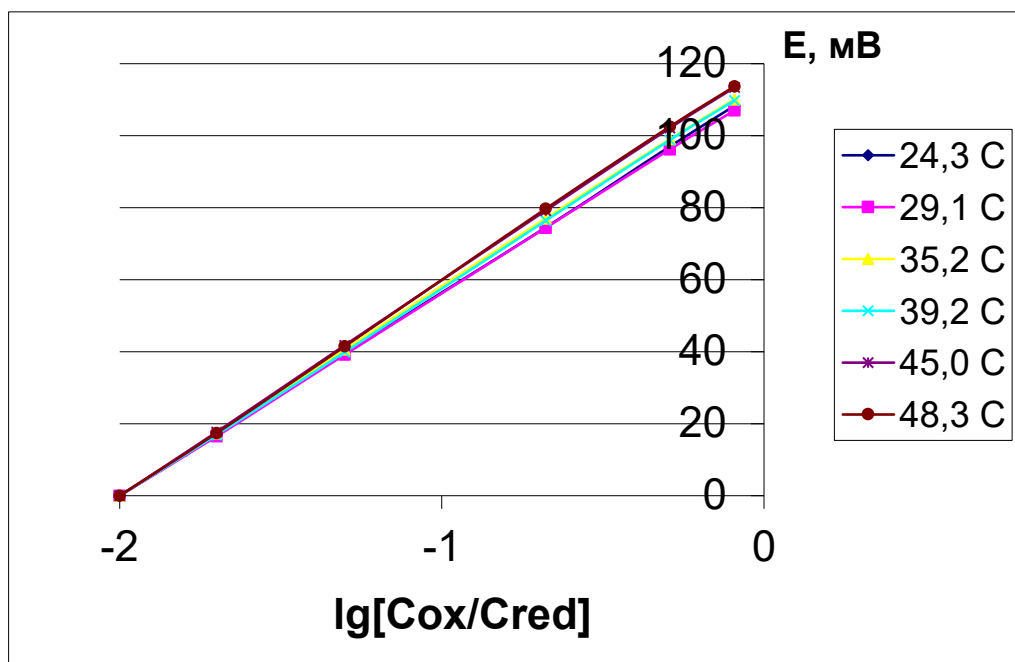


Рисунок 3.2 - Экспериментальная полученная зависимость изменения потенциала системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ от логарифма отношения концентраций окисленной и восстановленной форм при различных температурах

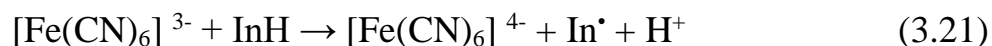
Таблица 3.8 - Рассчитанные и экспериментально полученные значения тангенса угла наклона зависимости изменения потенциала системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ от логарифма отношения концентраций окисленной и восстановленной форм при различных температурах.

$T, ^\circ C$	$tg_{\text{эксп}}$	$tg_{\text{теор}}$
24.3	56.0	59.0
29.1	56.0	59.9
35.2	57.1	61.2
39.2	57.1	61.9
45.0	60.0	63.1
48.3	60.0	63.8

3.2.2 Выбор раствора фонового электролита при определении АОЕ

Поскольку одной из главных задач при разработке новых методик определения АОЕ является интерпретация получаемых данных по отношению к живым организмам, то фоновый раствор должен обеспечивать условия среды, близкие к физиологическим.

Особенности строения АО, функциональные группы которых содержат подвижный атом водорода могут приводить к изменению кислотности среды при протекании реакции АО с модельным окислителем. В общем случае первую стадию реакции окисленного компонента системы с АО можно представить в виде:



Кроме того, многие объекты, такие как экстракты растительного происхождения, например, соки фруктов, имеют кислую среду. Как известно, изменение кислотности среды напрямую влияет на изменение потенциала платинового электрода. Поэтому при выборе фонового раствора необходимо принять во внимание возможность поддержания постоянства рН системы.

Потенциометрические измерения подразумевают использование фоновых растворов с достаточно хорошей проводимостью. Следует учитывать и то, что практически все реальные объекты содержат в своем составе большое количество различных ионов. Поэтому фоновый раствор, с одной стороны, должен обеспечивать высокую проводимость, с другой стороны - постоянство ионной силы.

Исходя из вышеизложенного, при выборе раствора фонового электролита руководствовались следующими критериями:

1. Обеспечение условий, близких к физиологической среде;
2. Наличие буферной емкости фонового раствора;
3. Высокое значение ионной силы фонового раствора.

Оптимальным фоновым раствором в данном случае является К-На-фосфатный буферный раствор с рН 7.2-7.4. Ранее показано (рисунок 3.1), что

в этом диапазоне рН комплексы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ стабильны (условная константа устойчивости $>10^8$). В таблице 3.9 приведены значения ионной силы и буферной емкости, соответствующие суммарной концентрации солей NaH_2PO_4 и K_2HPO_4 фосфатного буфера

Таблица 3.9 – Значения ионной силы и буферной емкости, соответствующие суммарной концентрации солей NaH_2PO_4 и K_2HPO_4 фосфатного буфера

№ п/п	$\Sigma C_{\text{соли}}, M$	I, M	B, M
1	0.014	0.025	0.006
2	0.027	0.048	0.013
3	0.067	0.120	0.031
4	0.135	0.240	0.063

К-Na-фосфатный буфер с суммарным содержанием солей 0,067 М обеспечивает высокую ионную силу раствора ($I=0.120$), а буферная емкость этого раствора ($B=0.031$ М) достаточна для компенсации смещения рН при добавлении кислых образцов к раствору фонового электролита. 0.067 М К-Na-фосфатный буферный раствор рекомендован для аналитических измерений [307].

Таким образом, в исследованиях АОЕ использован метод постоянной ионной силы, где в качестве электролита используется буферный раствор с высокой ионной силой и буферной емкостью. Принимая во внимание, что объекты исследования не относятся к сильным электролитам и их концентрации в растворе не превышают 0.5 мМ, соответственно при диссоциации дают в раствор несоизмеримо малые концентрации анионов и протонов. Тем самым в процессе проведения эксперимента в выбранных условиях ионная сила и рН остаются постоянными.

3.2.3 Выбор рабочих концентраций компонентов системы и степени разбавления анализируемых образцов при определении АОЕ

Возможность варьирования концентрациями и соотношением окисленной и восстановленной форм выбранной системы, а также степенью разбавления пробы позволяет подобрать оптимальные условия для исследования модельных растворов АО и анализа различных реальных объектов. На рисунке 3.3 представлены теоретически рассчитанные отклонения потенциала системы при определении АОЕ с использованием различных концентраций и соотношений окисленного и восстановленного компонентов системы, а также различных разбавлений исследуемого образца.

Выбирая концентрацию компонентов системы и степень разбавления исследуемых образцов руководствовались следующими критериями:

1. Величина сдвига потенциала системы, обусловленная протеканием реакции АО с окисленным компонентом системы должна составлять не менее 20 мВ;
2. Высокая скорость этой реакции;
3. Быстрое установление химического равновесия после прохождения реакции, а, следовательно, и установление потенциала системы;
4. Измеряемый потенциал системы постоянного состава должен быть стабилен во времени.

В большинстве случаев использование системы, в которой содержание окисленной формы превышает содержание восстановленной формы в 50-100 раз является оптимальным. Математические расчеты и экспериментальные данные показали, что 50-100 кратный избыток окисленного компонента системы обеспечивает соответствие заявленным выше критериям. Данные условия подходят для исследования индивидуальных АО, растительных экстрактов, пищевых продуктов.

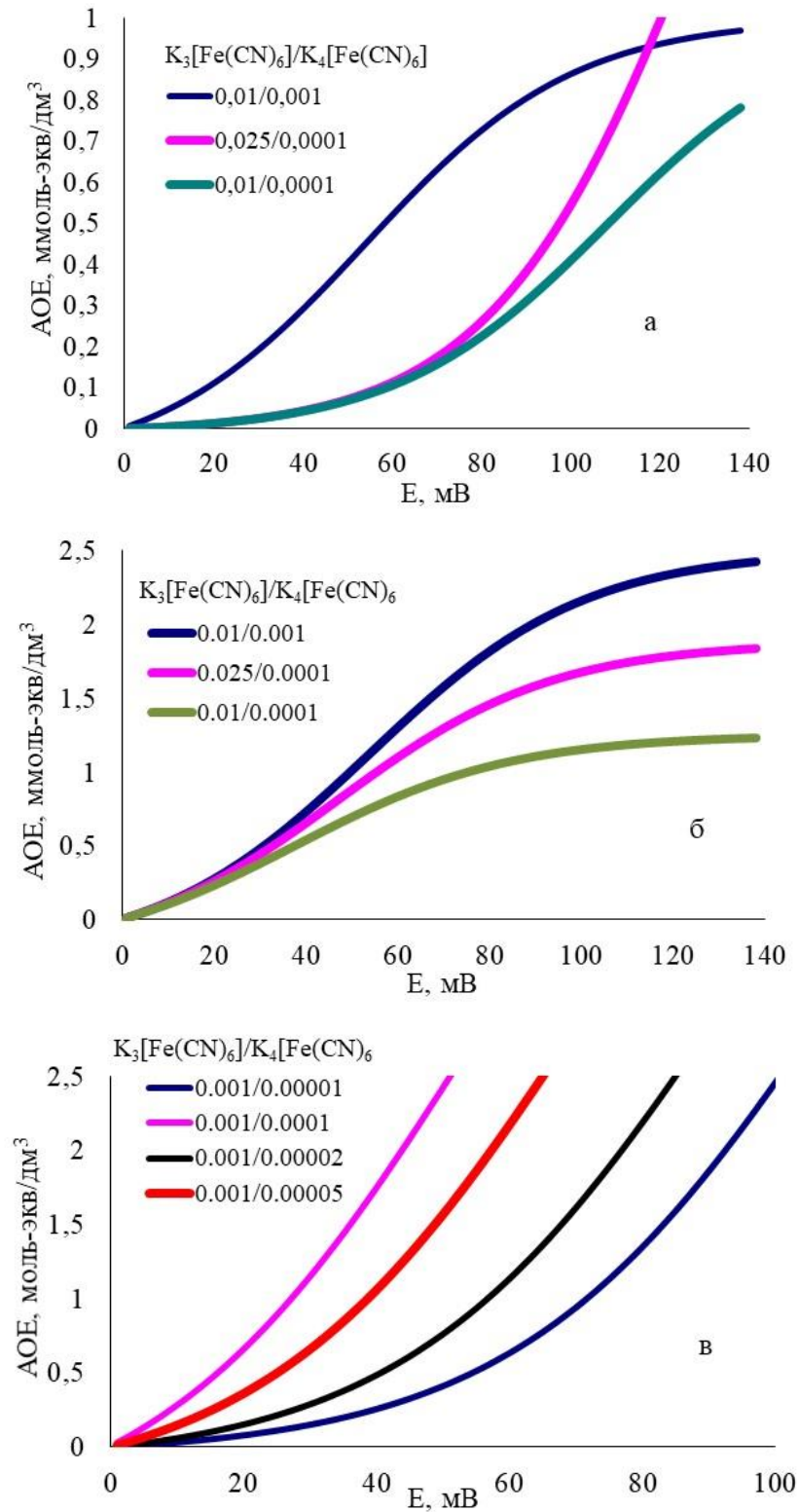


Рисунок 3.3 - Теоретически рассчитанные кривые изменения потенциала системы с использованием различных концентраций и соотношений окисленного и восстановленного компонентов системы и степени разбавления пробы (а – в 100, б – 25, в - 6 раз)

Однако, принимая во внимание, что в различных объектах может быть разный уровень АОЕ, в ряде случаев, необходимо оптимизировать используемые концентрации системы и степень разбавление образцов. Примером является эритроцитарная масса и плазма крови, в которых уровень АОЕ отличается на порядки.

3.3 Исследование взаимодействия водорастворимых модельных АО природного происхождения с выбранным окислителем

Целью данной части работы являлось изучение реакций модельных АО с окисленным компонентом системы, нахождение стехиометрических коэффициентов, оценка предела определения АОЕ и оценка кинетических параметров этих реакций. В качестве модельных АО был выбран ряд природных веществ, отвечающих за антиоксидантные свойства объектов растительного происхождения (аскорбиновая кислота, гидрохинон, катехол, пирогаллол, кофейная кислота, рутин, кверцетин и др) и биологических объектов (цистеин, глутатион, мочевая кислота, аскорбиновая кислота).

3.3.1 Определение стехиометрических коэффициентов реакции АО с гексацианоферратом (III) калия

В таблице 3.10 приведены стехиометрические коэффициенты реакции п (3.15) антиоксидантов с гексацианоферратом (III) калия, рассчитанные по уравнению (3.20) для различных концентраций АО.

Таблица 3.10 - Значения стехиометрических коэффициентов реакции антиоксидантов с гексацианоферратом (III) калия [315]

АО	$n_{\text{эксп}}$			$\bar{n}_{\text{эксп}}$	$n_{\text{теор}}$
	$1 \cdot 10^{-4}$ ммоль- экв/дм ³	$3 \cdot 10^{-4}$ ммоль- экв/дм ³	$5 \cdot 10^{-4}$ ммоль- экв/дм ³		
Цистеин	1.2	1.1	1.1	1.1	1
Глутатион	1.0	0.9	1.0	1.0	1
Мочевая кислота	1.9	1.8	2.0	1.9	2
Аскорбиновая кислота	1.8	2.0	1.9	1.9	2
Гидрохинон	2.1	1.8	2.0	2.0	2
Пирокатехин	4.8	4.8	5.0	4.9	2
Пирогаллол	5.0	5.1	5.3	5.2	2, 4
Кофейная кислота	1.3	1.4	2.0	1.6	2
Рутин	2.8	3.0	2.6	2.8	4
Кверцетин	3.7	4.2	3.8	3.9	2, 4
(+)Катехин	3.9	3.7	4.1	3.9	4
Галловая кислота	4.6	5.2	5.1	5.0	2

$n_{\text{эксп}}$ – экспериментально полученное значение

$\bar{n}_{\text{эксп}}$ – среднее экспериментально полученное значение

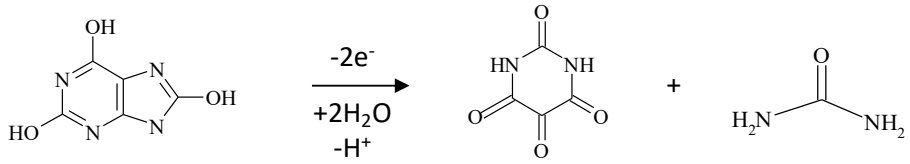
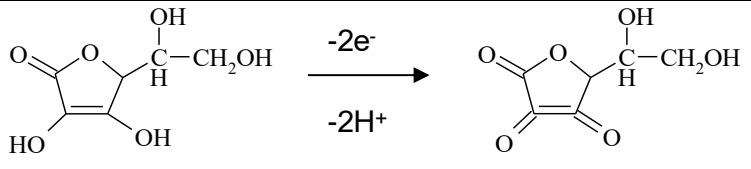
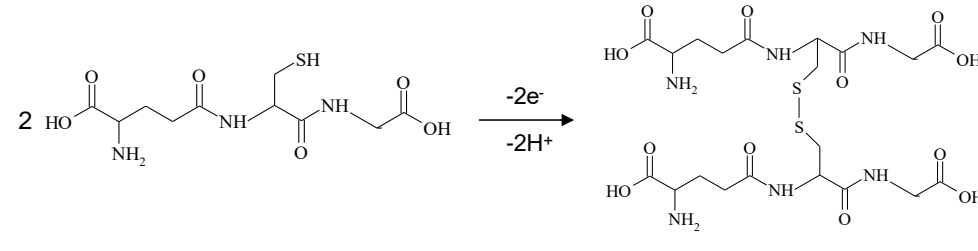
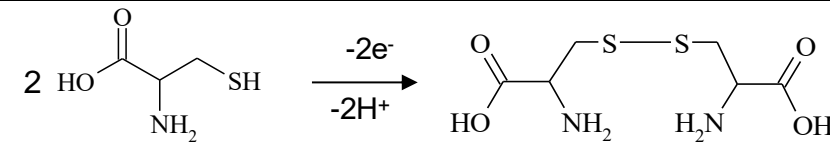
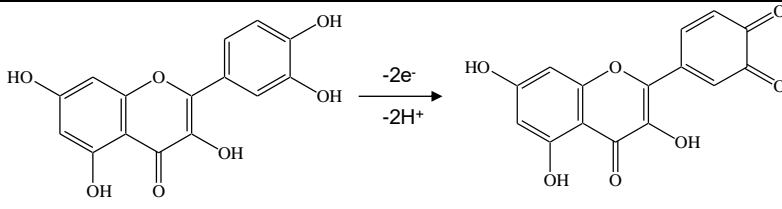
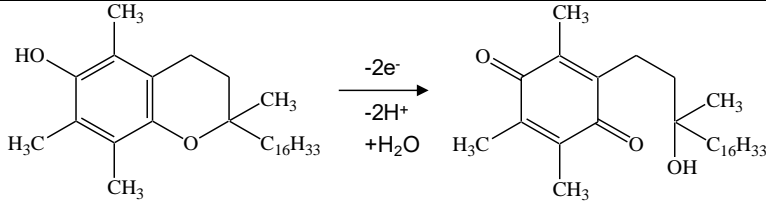
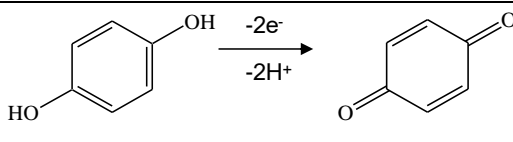
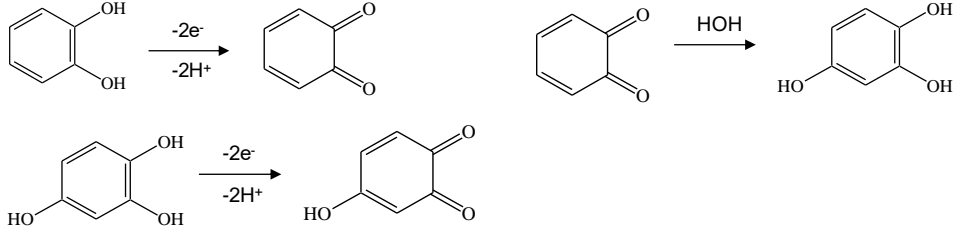
$n_{\text{теор}}$ – ожидаемое значение, связанное со структурой АО

В таблице 3.11 приведены предполагаемые схемы окисления некоторых АО. Несовпадение экспериментального и теоретического значения n в случае с пирогаллолом, пирокатехином и галловой кислотой может быть обусловлено одновременным протеканием конкурирующей реакции

комплексообразования. В случае с рутином несовпадение экспериментального и теоретического n можно объяснить стерическим фактором: молекула рутина содержит остаток рутинозы, которая может создавать пространственные затруднения для протекания реакции. Для мочевой кислоты характерна кето-енольная таутомерия [327], которая по всей видимости в наибольшей степени проявляется при высоких значениях концентраций.

Приведённые стехиометрические коэффициенты взаимодействия исследуемых антиоксидантов с гексацианоферратом (III) калия в целом соответствуют числу антиоксидантных групп в соединении, что подтверждает корректность использования метода и выбранных единиц измерения, а также подтверждает правильность сформулированных выше требований (стехиометрическое протекание реакции окислителя с АО в соответствии с числом функциональных групп АО). Экспериментально полученные стехиометрические коэффициенты отражают количество гидроксильных групп, присоединённых к бензольному кольцу, флавоновому ядру или ненасыщенному гетероциклу (аскорбиновая кислота), которые обуславливают антиоксидантные свойства соединений.

Таблица 3.11 - Схемы окисления АО

Мочевая кислота	
Аскорбиновая кислота	
Глутатион	
Цистеин	
Кверцетин	
α-токоферол	
Гидрохинон	
Пирокатехин	

Наличие функциональной взаимосвязи структура АО – АОЕ позволит исследовать антиоксидантные свойства как уже известных соединений, так и новых, вновь синтезированных.

3.3.2 Оценка точности, правильности и предела обнаружения АОЕ

В таблице 3.12 приведены результаты исследования АОЕ модельных растворов некоторых антиоксидантов методом «введено-найдено». Полученные величины имеют значения, близкие к 100%, S_r не превышает 5 %.

Таблица 3.12 - Исследование АОЕ некоторых антиоксидантов методом «введено-найдено» (n=5, P=0.95)

АО	Введено (C_1), Ммоль- экв/дм ³	Найдено		$R = \frac{C_2}{C_1} \cdot 100$, %
		АОЕ (C_2), ммоль- экв/дм ³	S_r	
Аскорбиновая кислота	10.0	10.6	0.01	106
	20.0	19.1	0.05	98
Кофейная кислота	10.0	10.4	0.04	104
	20.0	21.6	0.03	108
Кверцетин	20.0	18.6	0.01	93
	40.0	37.9	0.02	95

На рисунке 3.4 приведена зависимость относительного стандартного отклонения от величины измеренной АОЕ (по аскорбиновой кислоте). Согласно 3σ критерию, предел обнаружения в водных растворах (на примере аскорбиновой кислоты) составил $3.5 \cdot 10^{-6}$ моль-экв/дм³ (n=6, p=0.95).

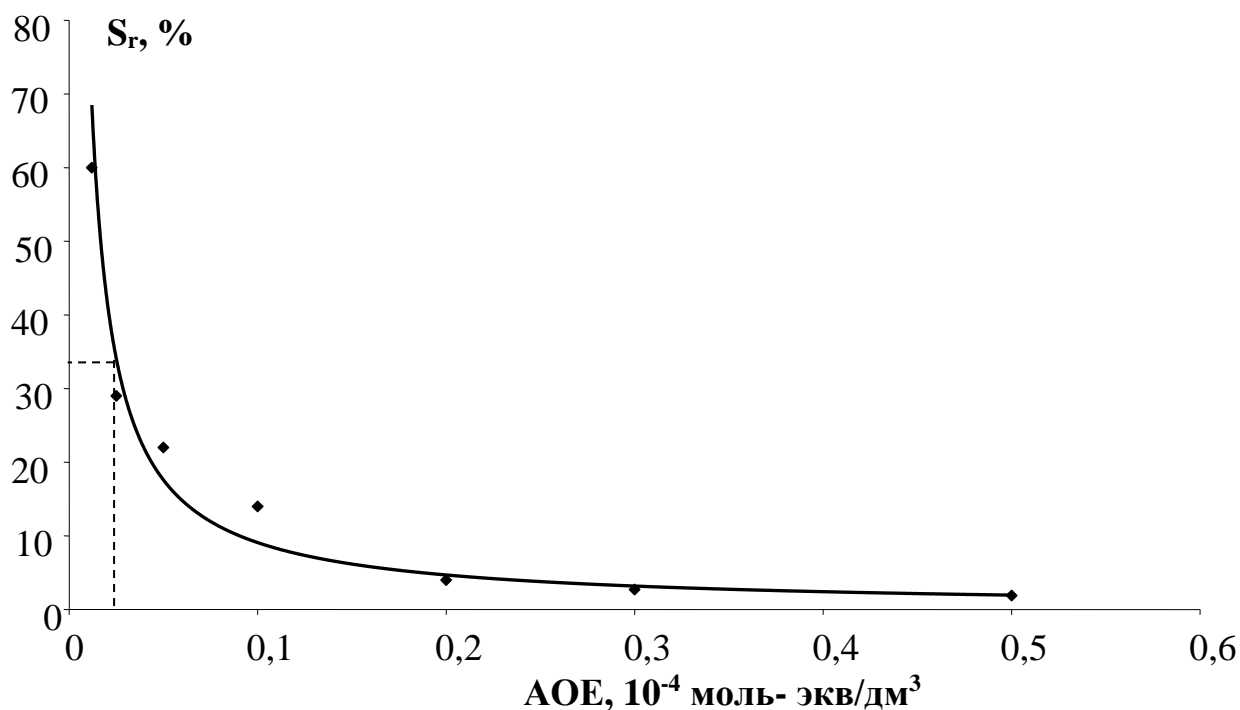


Рисунок 3.4 - Зависимость S_r от АОЕ в водных растворах при разной концентрации аскорбиновой кислоты ($n=6$, $p=0.95$)

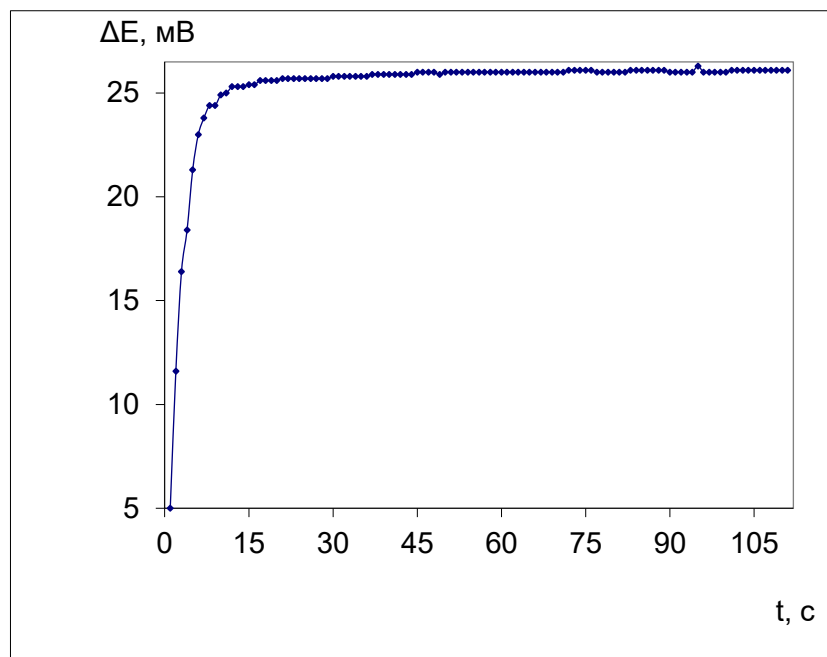
Таким образом, данные, полученные в экспериментах по исследованию стехиометрии реакции (3.15) и по определению АОЕ методом «введено-найдено» на модельных растворах, позволяют сделать вывод о том, что предложенный подход с использованием системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ обеспечивает возможность количественной оценки антиоксидантной емкости водорастворимых веществ природного происхождения, предел обнаружения составляет $3.5 \cdot 10^{-6}$ моль-экв/дм³.

3.3.3 Изучение кинетических параметров реакции АО с гексацианоферратом (III) калия

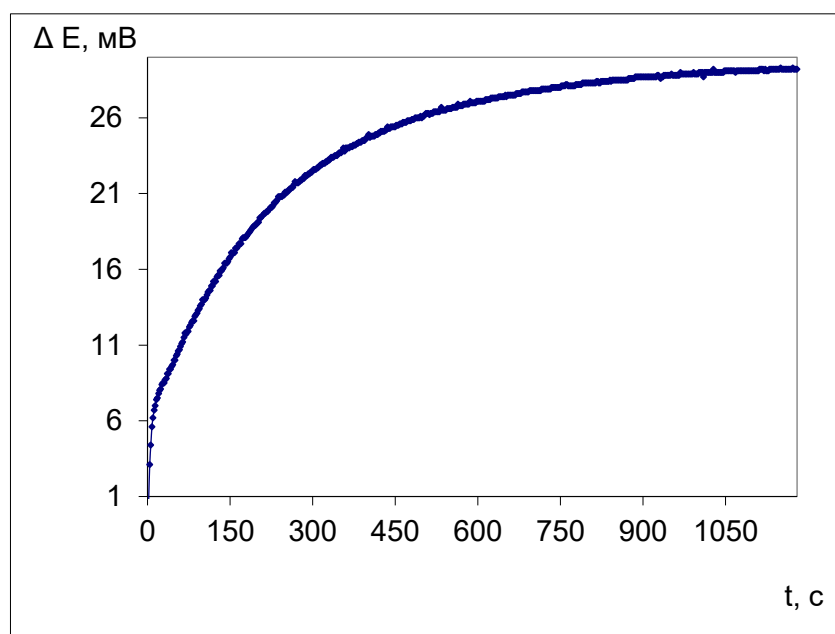
Следующим важным условием корректной реализации предложенного подхода интегральной оценки АОЕ, является достаточно большая скорость реакции окислителя с основными антиоксидантами. Регистрация кинетических кривых зависимости изменения потенциала во времени дает

возможность оценить период полупревращения АО в реакции с модельным окислителем. На рисунке 3.5 приведены типичные кинетические кривые изменения потенциала системы при протекании реакции АО с $K_3[Fe(CN)_6]$.

Ниже приведены результаты определения кинетических параметров химического взаимодействия АО с гексацианоферратом (III) калия. Система $K_3[Fe(CN)_6] / K_4[Fe(CN)_6]$ готовилась с таким расчетом, чтобы в ячейке, куда погружены электроды, концентрация $K_3[Fe(CN)_6]$ превышала концентрацию исследуемых антиоксидантов в 100 раз, при этом концентрация $K_3[Fe(CN)_6]$ при взаимодействии с АО, будет изменяться незначительно. Последнее позволяет считать взаимодействие антиоксидантов с гексацианоферратом (III) калия реакцией псевдопервого порядка [328]. Действительно, было установлено, что периоды полупревращения в данном случае не зависят от начальной концентрации антиоксидантов (Табл. 3.13). Период полупревращения оценивали из кинетической кривой, рассчитывая по формулам (3.18-3.19) остаточную концентрацию АО в каждый момент времени с интервалом 0.5 секунды. За период полупревращения брали момент времени, при котором половина АО была окислена.



а



б

Рисунок 3.5 - Типичные кинетические кривые изменения потенциала системы от времени реакции ($\Delta E - t$) при взаимодействии АО с $K_3[Fe(CN)_6]$ для аскорбиновой кислоты (а), для глутатиона (б). Исходная концентрация антиоксидантов $2 \cdot 10^{-4}$ моль-экв/дм³.

Таблица 3.13 - Периоды полупревращения АО при взаимодействии с гексацианоферратом (III) калия

Вещество	$\tau_{1/2}$, с					$\tau_{1/2\text{ср.}}$, с
	$2 \cdot 10^{-4}$ моль- экв/дм ³	$5 \cdot 10^{-4}$ моль- экв/дм ³	$1 \cdot 10^{-3}$ моль- экв/дм ³	$2 \cdot 10^{-3}$ моль- экв/дм ³	$5 \cdot 10^{-3}$ моль- экв/дм ³	
Пирогаллол	1	1	1.5	1	1	1.1
Катехол	3	3	2	2	4	2.8
Кофейная кислота	3	3	4	3	3	3.2
Гидрохинон	3	3	3	3	5	3.4
Аскорбиновая кислота	3	4	3	4	3	3.4
Рутин	4	3	5	5	-	3.4
Цистеин	4	9	9	-	-	7.3
Мочевая кислота	13	13	8	-	-	11.3
Глутатион	151	163	152	-	-	155.3

Константу скорости реакции находили, пользуясь соотношением (3.21) согласно [329] для реакций псевдопервого порядка:

$$k = \frac{\ln 2}{\tau_{1/2}}, \quad (3.21)$$

где $\tau_{1/2}$ - период полупревращения исследуемого АО, с;

k – константа скорости реакции АО с гексацианоферратом (III) калия, 1/с.

Используя полученные значения периодов полупревращения, были рассчитаны константы скорости взаимодействия АО с модельным окислителем (таблица 3.14).

Таблица 3.14 - Константы скорости реакций АО с гексацианоферратом (III) калия (P=0,95, n=5)

Вещество	k, 1/с					k _{ср} ± δ, 1/с	S _r
	2·10 ⁻⁴ моль- экв/дм ³	5·10 ⁻⁴ моль- экв/дм ³	1·10 ⁻³ моль- экв/дм ³	2·10 ⁻³ моль- экв/дм ³	5·10 ⁻³ моль- экв/дм ³		
Пирогаллол	0.69	0.69	0.46	0.69	0.62	0.62±0.08 α=0.95, n=5	0.09
Катехол	0.23	0.23	0.35	0.35	0.17	0.26±0.07 α=0.95, n=5	0.18
Кофейная кислота	0.23	0.23	0.17	0.23	0.23	0.21±0.02 α=0.95, n=5	0.06
Гидрохинон	0.23	0.23	0.23	0.23	0.14	0.21±0.05 α=0.95, n=5	0.18
Аскорбиновая кислота	0.23	0.17	0.23	0.17	0.23	0.21±0.02 α=0.95, n=5	0.08
Рутин	0.173	0.231	0.139	0.139	-	0.170±0.003 α=0.95, n=4	0.01
Цистеин	0.17	0.08	0.08	-	-	0.11±0.09 α=0.95, n=3	0.42
Мочевая кислота	0.05	0.05	0.09	-	-	0.06±0.02 α=0.95, n=5	0.12
Глутатион	0.0046	0.0042	0.0046	-	-	0.0045±0.0002 α=0.95, n=3	0.02

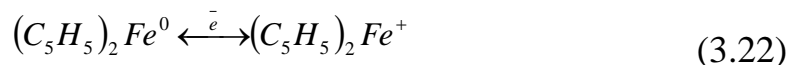
Приведённые данные свидетельствуют о том, что реакция АО с гексацианоферратом (III) калия является достаточно быстрой, что отвечает сформулированному требованию и позволяет считать потенциметрическую методику определения АОЕ экспрессной и применимой для поточных масштабных исследований.

3.4 Исследование взаимодействия жирорастворимых модельных АО природного происхождения с выбранным окислителем на примере α -токоферола

Токоферолы относятся к классу природных фенольных АО с липофильными свойствами, содержащиеся преимущественно в растительных маслах. Наличие токоферолов в масле является одним из основных показателей качества данного продукта и отвечает за длительность его хранения [330, 331]. Поскольку предложенная модель окислителя практически не растворяется в апротонных растворителях, для исследования АОЕ модельного раствора α -токоферола необходимо изучение других возможностей применения потенциометрического метода. В данной работе использовались два подхода, реализованных в гетерогенной (эмульсии) и гомогенной (мицеллярные растворы) системах.

3.4.1 Исследование возможности переноса электрона в гетерогенной системе (эмульсии органическая фаза/водная фаза)

В качестве органической фазы использовали гексан, как универсальный растворитель, в том числе и для токоферолов. Водной фазой служил раствор, содержащий систему $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$. На первом этапе, в качестве модельного вещества для исследования процесса переноса через границу раздела гексан/вода использовали ферроцен. Исходя из термодинамических данных, ферроцен должен восстанавливать окисленный компонент системы $K_3[Fe(CN)_6]$, тем самым меняя соотношение окисленной и восстановленной форм в водной фазе. Кроме того, ферроцен хорошо растворим в апротонных средах и характеризуется быстрым и обратимым редокс-процессом [332]:



На рисунке 3.6 представлены зависимости изменения потенциала системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ в водной фазе от ферроцена в органической фазе, рассчитанные по уравнению 3.17 (где за X взята концентрация ферроцена) и полученные экспериментальным путем. Соотношение органической фазы, содержащей ферроцен и водной фазы, содержащей фосфатный буферный раствор с pH 7.2 и систему $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$, составляло 1:9. Измерения проводили в условиях постоянного интенсивного перемешивания.

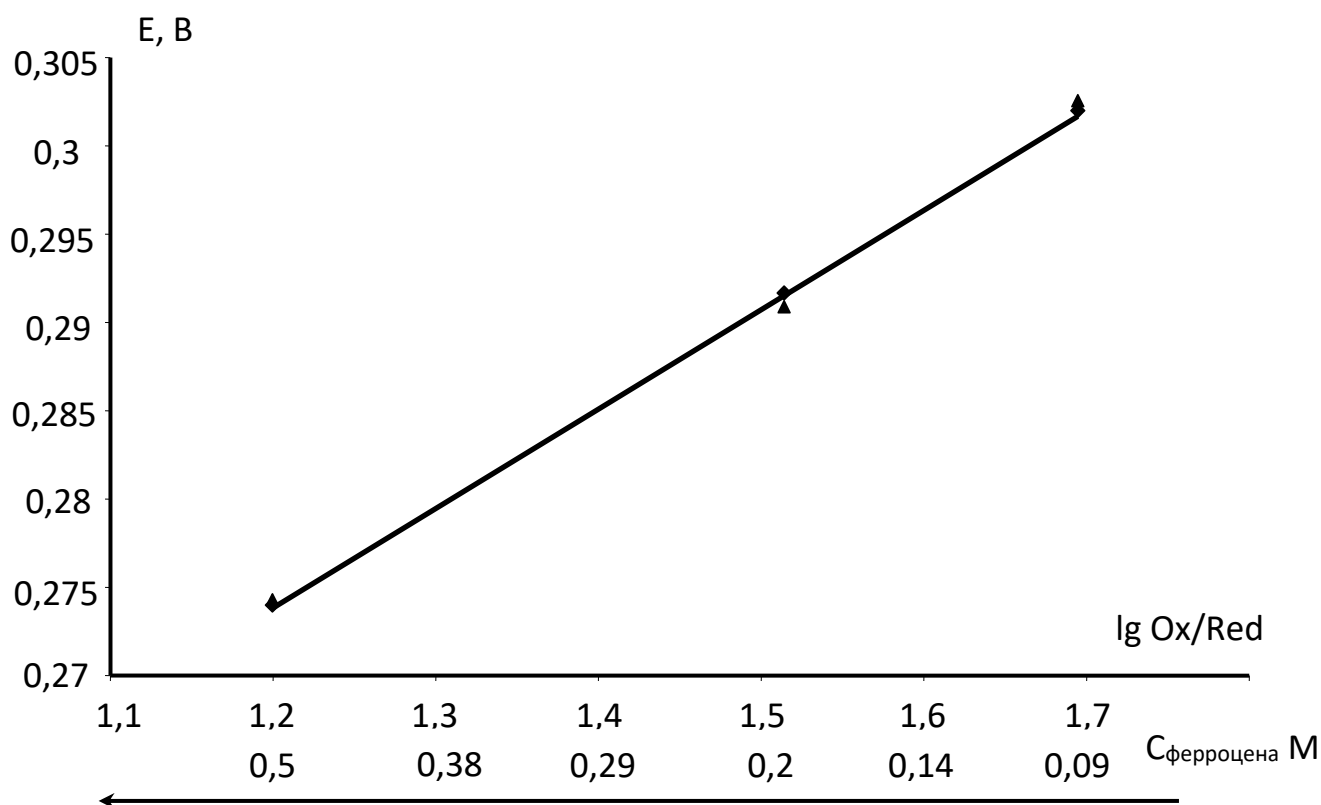


Рисунок 3.6 - Расчетная (◆) и экспериментально полученная (▲) зависимости потенциала системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ от концентрации ферроцена

Из рисунка видно, что экспериментально полученные значения сдвига потенциала системы практически совпадают с теоретическими. Кроме того, в процессе проведения реакции в водной фазе визуально наблюдали появление голубой окраски, характерной для катиона феррицена. Полученные данные позволяют предположить, что на границе раздела фаз происходит реакция

переноса электрона, аналогичная реакции (3.15). Таким образом, экспериментально показано, что принципиально протекание гетерогенной реакции между окисленным компонентом системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ и модельным донором электрона на границе раздела фаз возможно. Однако, в аналогичных условиях проведения эксперимента с раствором α -токоферола в гексане (с применением ультразвуковой обработки и без нее), сдвига потенциала системы не наблюдалось. Вероятно, это связано со сложностью протекания данной гетерогенной реакции между α -токоферолом в гексане и $K_3[Fe(CN)_6]$ в водной фазе.

3.4.2 Определение антиоксидантной емкости α -токоферола в мицеллярной системе, полученной путем замены растворителя

Критериями выбора растворителя для получения мицеллярной системы α -токоферол/вода отсутствие влияния растворителя на величину потенциала системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$, устанавливающего на платиновом электроде и сохранение предлогарифмического коэффициента Нернстовской зависимости при изменении концентраций компонентов системы. Результаты исследования влияния растворителей на величину начального потенциала и угла наклона зависимости потенциала системы от логарифма соотношения концентраций компонентов системы представлены в таблице 3.15 и на рисунке 3.7.

Исследование зависимости изменения потенциала системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ в присутствии ацетонитрила и этилового спирта (таблица 3.16, рисунок 3.7) показало, что в отличие от ацетонитрила, в присутствии этанола смещение графика зависимости незначительно, а угол наклона соответствует рассчитанному. Таким образом, для дальнейшего исследования растворов α -токоферола для создания эмульсий использовали этиловый спирт.

Таблица 3.15 - Значения начальных потенциалов системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ в присутствии растворителей (n=6, p=0,95)

Соотношение водный раствор: органический растворитель, см ³	Потенциал системы при добавлении этанола, мВ	Потенциалы системы при добавлении ацетонитрила, мВ
Без растворителя	344 ± 2	343 ± 3
10:0.02	344 ± 2	342 ± 3
10:0.05	343 ± 2	341 ± 4
10:0.1	342 ± 2	339 ± 3
10:0.2	341 ± 1	335 ± 3

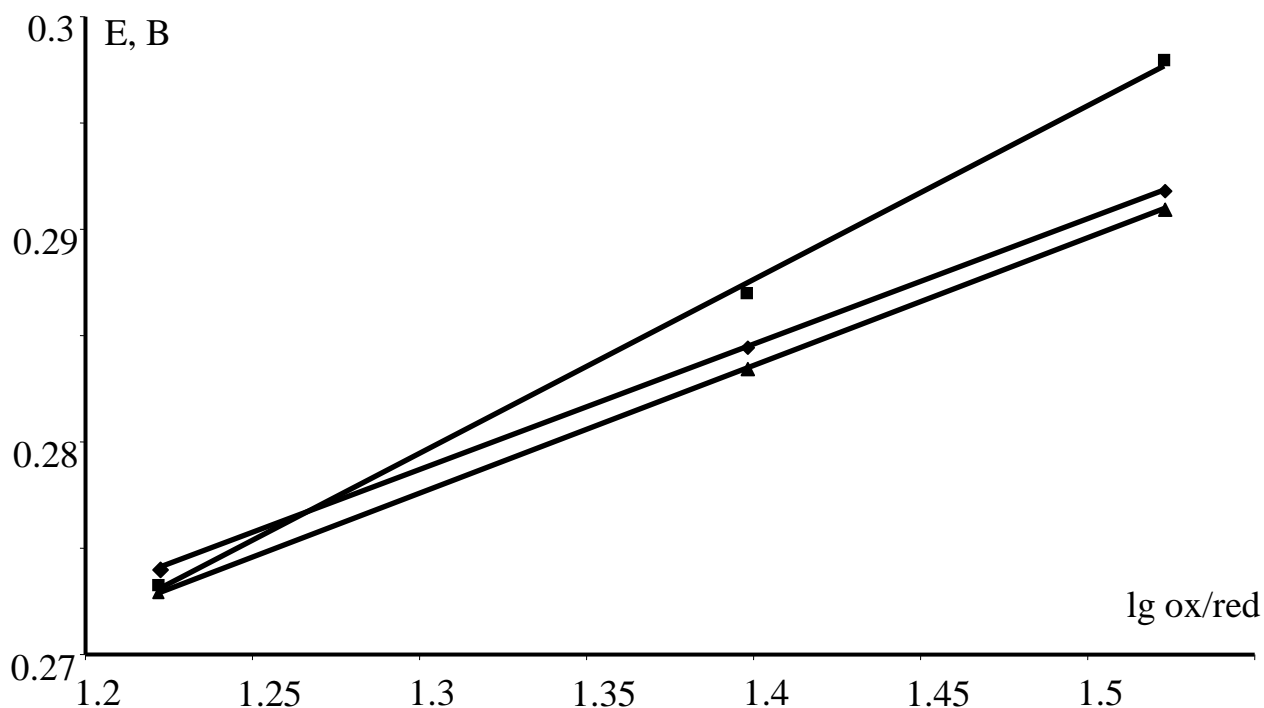


Рисунок 3.7 - Расчетная (♦) и экспериментально полученные (▲ - в присутствии этанола, ■ - в присутствии ацетонитрила) зависимости потенциала системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ от логарифма соотношения концентраций окисленной и восстановленной форм

Исследование взаимодействия этанольных растворов α -токоферола и водного раствора, содержащего систему $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ проводили в условиях постоянного интенсивного перемешивания. Результаты

представлены на рисунке 3.8, из которого видно, что значения потенциала системы, рассчитанные по уравнению 3.17 (где за X взята концентрация α -токоферола в спирте) и полученные экспериментальным путем при введении различных концентраций α -токоферола практически не отличаются.

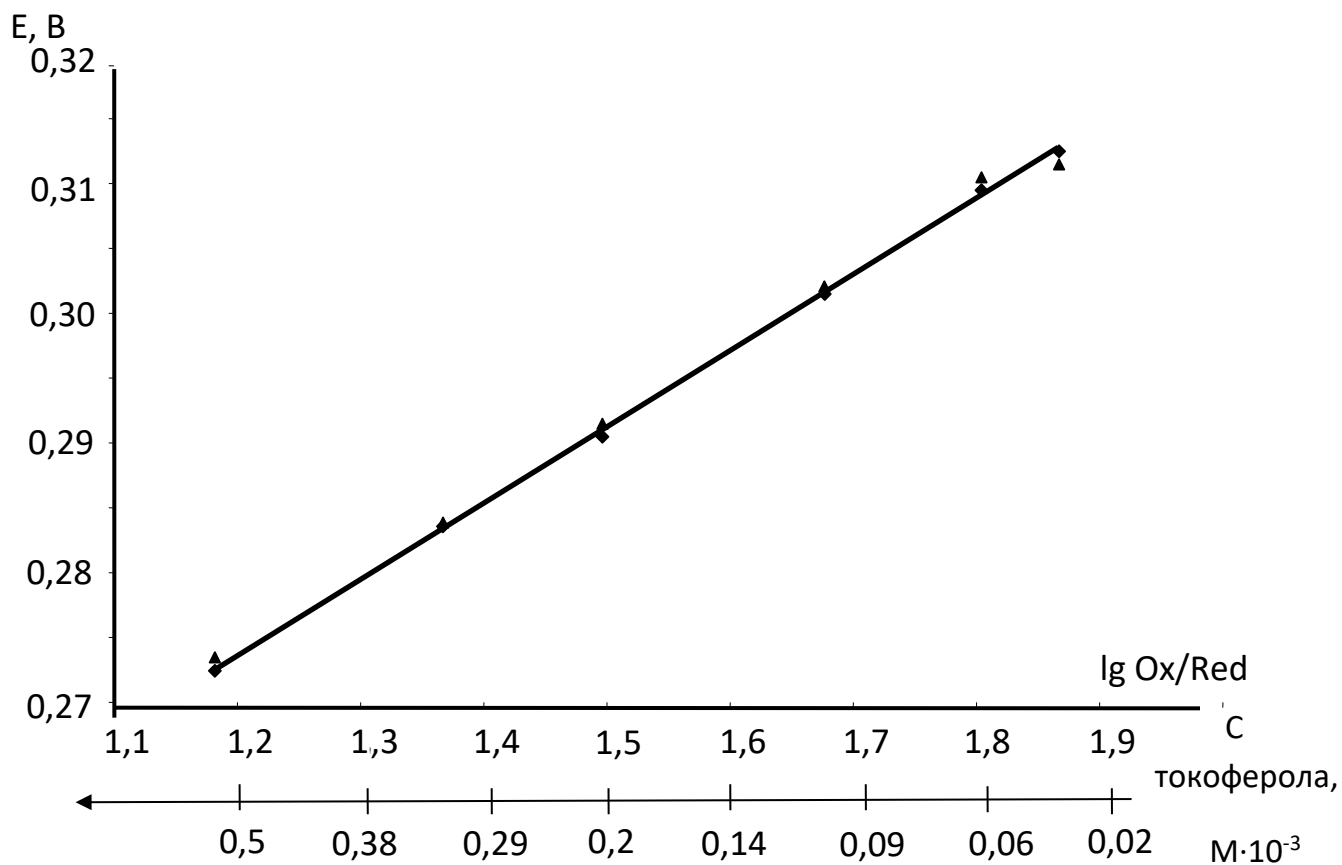
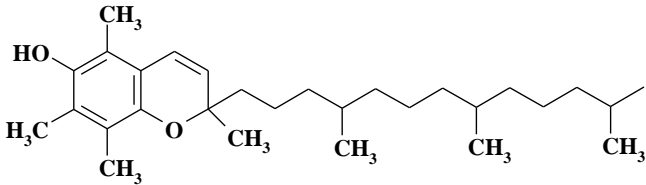


Рисунок 3.8 - Расчетный и экспериментально полученный графики зависимости потенциала от lg соотношения концентраций $K_3[Fe(CN)_6]$ и $K_4[Fe(CN)_6]$ и эквивалентной концентрации α -токоферола (▲ - экспериментальные значения; ◆ - расчетные значения)

Результаты определения стехиометрических коэффициентов реакции α -токоферола с $K_3[Fe(CN)_6]$ приведены в таблице 3.16.

Таблица 3.16 - АОЕ 10^{-2} М раствора α -токоферола и стехиометрические коэффициенты реакции (3.15) с $K_3[Fe(CN)_6]$ ($n=6$, $p=0,95$)

Исследуемое вещество	АОЕ, моль-экв/дм ³	S_r	n:q
<p>α-Токоферол</p> 	0.01	0.02	1:1

В таблице 3.17 представлены результаты определения АОЕ 0.01 М и 0.005 М модельных растворов α -токоферола методом «введено-найдено». Отклонения полученных результатов не превышают 10%.

Таблица 3.17 - Определение АОЕ α -токоферола методом «введено-найдено» ($n=6$, $p=0,95$)

Введено (C_1), ммоль-экв/дм ³	Найдено		Найдено (R),%
	АОЕ (C_2), ммоль-экв/дм ³	S_r	
10.0	11.0	0.02	110
5.0	4.8	0.06	96

На рисунке 3.9 приведена зависимость относительного стандартного отклонения от величины измеренной антиоксидантной емкости. Согласно 3σ критерию, предел обнаружения α -токоферола в мицеллярном растворе составил $3.5 \cdot 10^{-6}$ моль-экв/дм³ ($n=6$, $p=0.95$).

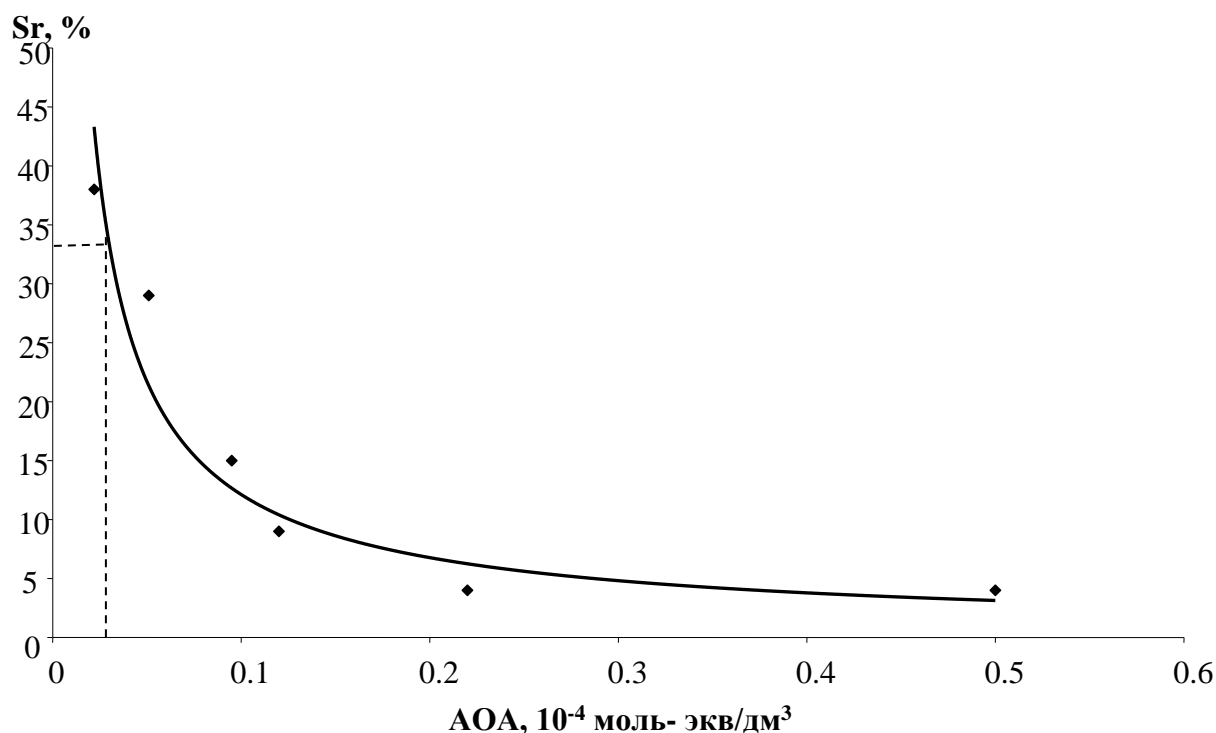


Рисунок 3.9 - Зависимость S_r от АОЕ в мицеллярном растворе для разных концентраций α -токоферола

Таким образом, на основании результатов, представленных в п. 3.4.2, можно прийти к заключению, что предлагаемый подход также можно использовать для определения АОЕ, обусловленной присутствием жирорастворимых антиоксидантов.

3.5 Оценка влияния хелатирующей способности АО на определение АОЕ

Несмотря на высокие значения константы устойчивости комплексов $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$, значения показателей суммарных констант устойчивости для некоторых природных фенолов составляют от 13 до 46 (таблица 1.5), что свидетельствует об их высокой комплексообразовательной способности. Это может привести к возникновению конкурирующих реакций образования комплексов железа с полифенолами сопровождающихся полным или частичным разрушением комплекса $K_3[Fe(CN)_6]$ и соответственно оказать влияние на результат определения АОЕ. Зафиксировать продукты конкурирующих реакций спектрофотометрическим методом оказалось

весьма проблематичным ввиду наложения спектров различных комплексов железа. В данной работе возможность протекания конкурирующих реакций комплексообразования оценивали при помощи расчета условных констант устойчивости и метода циклической вольтамперометрии.

На рисунке 3.10 приведены зависимости условных констант устойчивости от рН для комплексов железа с пирокатехином (а) и галловой кислотой (б) в сравнении с гексацианоферратом, рассчитанные по уравнениям 3.12 -3.14.

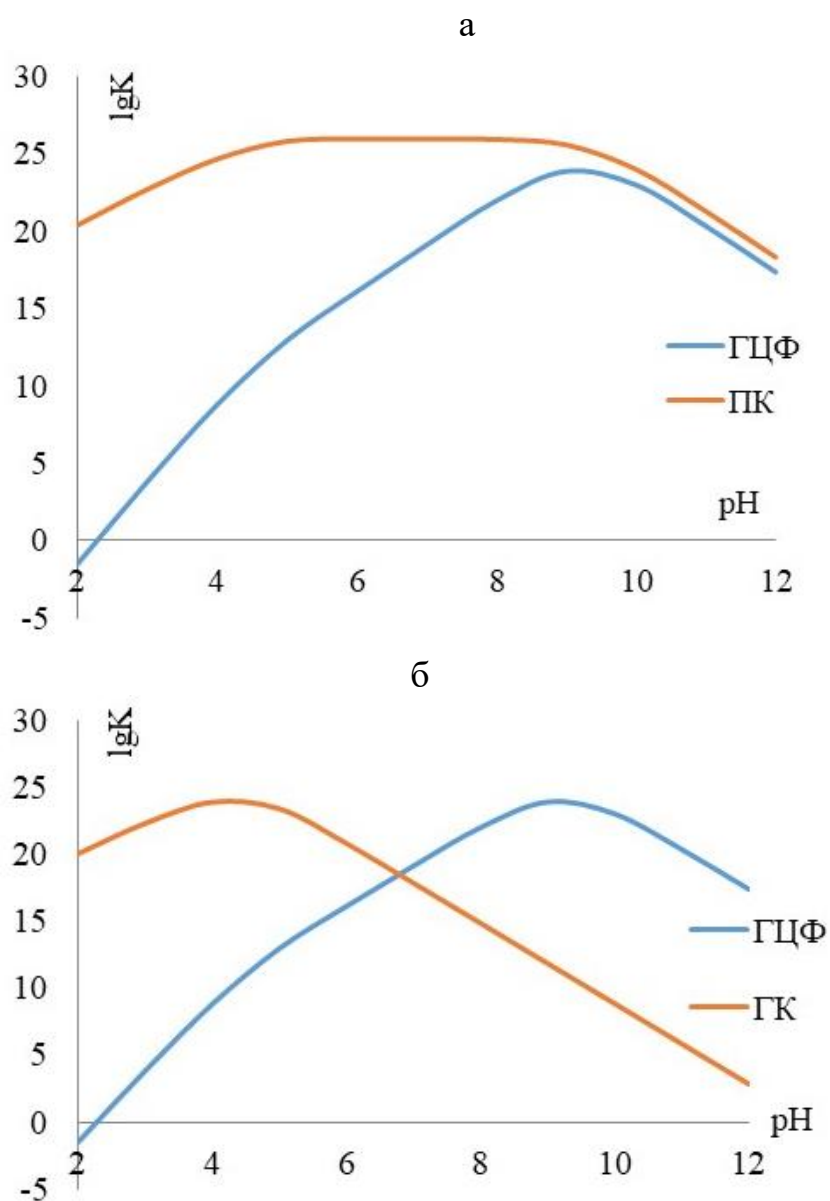


Рисунок 3.10 - Зависимость условной константы устойчивости комплексов железа (а) с пирокатехином (ПК), (б) с галловой кислотой (ГК), $K_3[Fe(CN)_6]$ (ГЦФ) от рН

Расчет условных констант показывает, что комплекс железа с пирокатехином более устойчив, чем гексацианоферрат в области рН от 2 до 9, а с галловой кислотой от 2 до 7. Если предположить, что в этой ситуации возможно протекание конкурирующего комплексообразования, то на ЦВА может появиться новый сигнал, соответствующий более устойчивому комплексу.

Рисунки 3.11 и 3.12 демонстрируют изменение характера циклических вольтамперограмм гексацианоферрата при добавлении к нему пирокатехина и галловой кислоты соответственно при разных значениях рН.

На ЦВА рисунка 3.11 отчетливо наблюдается появление нового пика при добавлении к раствору гексацианоферрата пирокатехина, отличного от пиков гексацианоферрата и пирокатехина (зарегистрированных по отдельности), который при повышении рН сдвигается в отрицательную сторону и постепенно сливается с пиком гексацианоферрата. Аналогичная ситуация в кислой среде наблюдается и в случае добавления галловой кислоты к раствору гексацианоферрата (рисунок 3.12). При рН 2-4 возникает пик, который при увеличении рН до 7 сливается с пиком гексацианоферрата, а при дальнейшем увеличении рН до 10 снова сдвигается в положительную область потенциалов. При проведении данного эксперимента визуально было зафиксировано изменение окраски исследуемых растворов, что также говорит об образовании новых соединений.

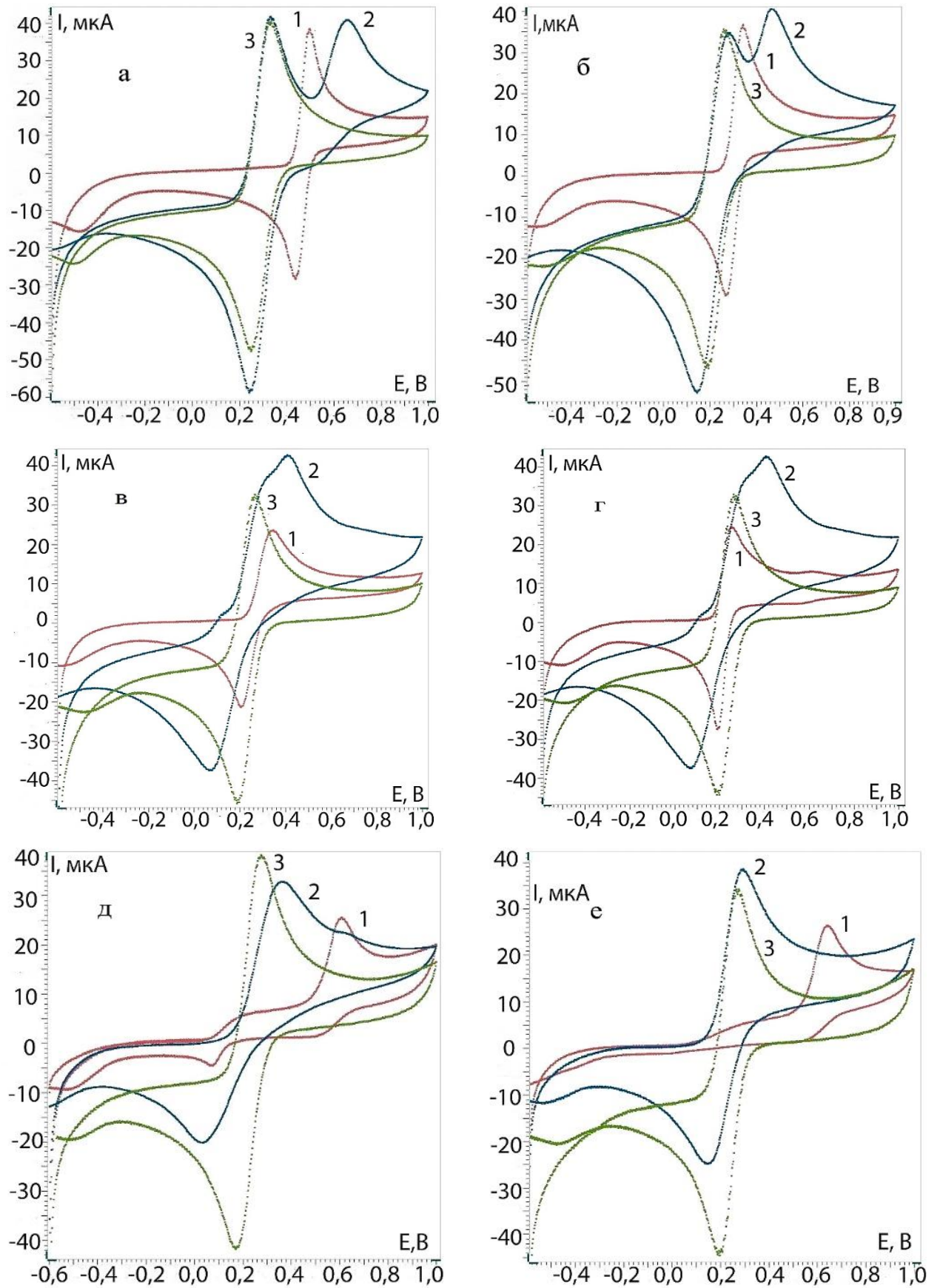


Рисунок 3.11 - ЦВА 1 – пирокатехина, 2 - гексацианоферрата с пирокатехином, 3 - гексацианоферрата при рН 2 (а), 5 (б), 6 (в), 7 (г), 9 (д), 10 (е)

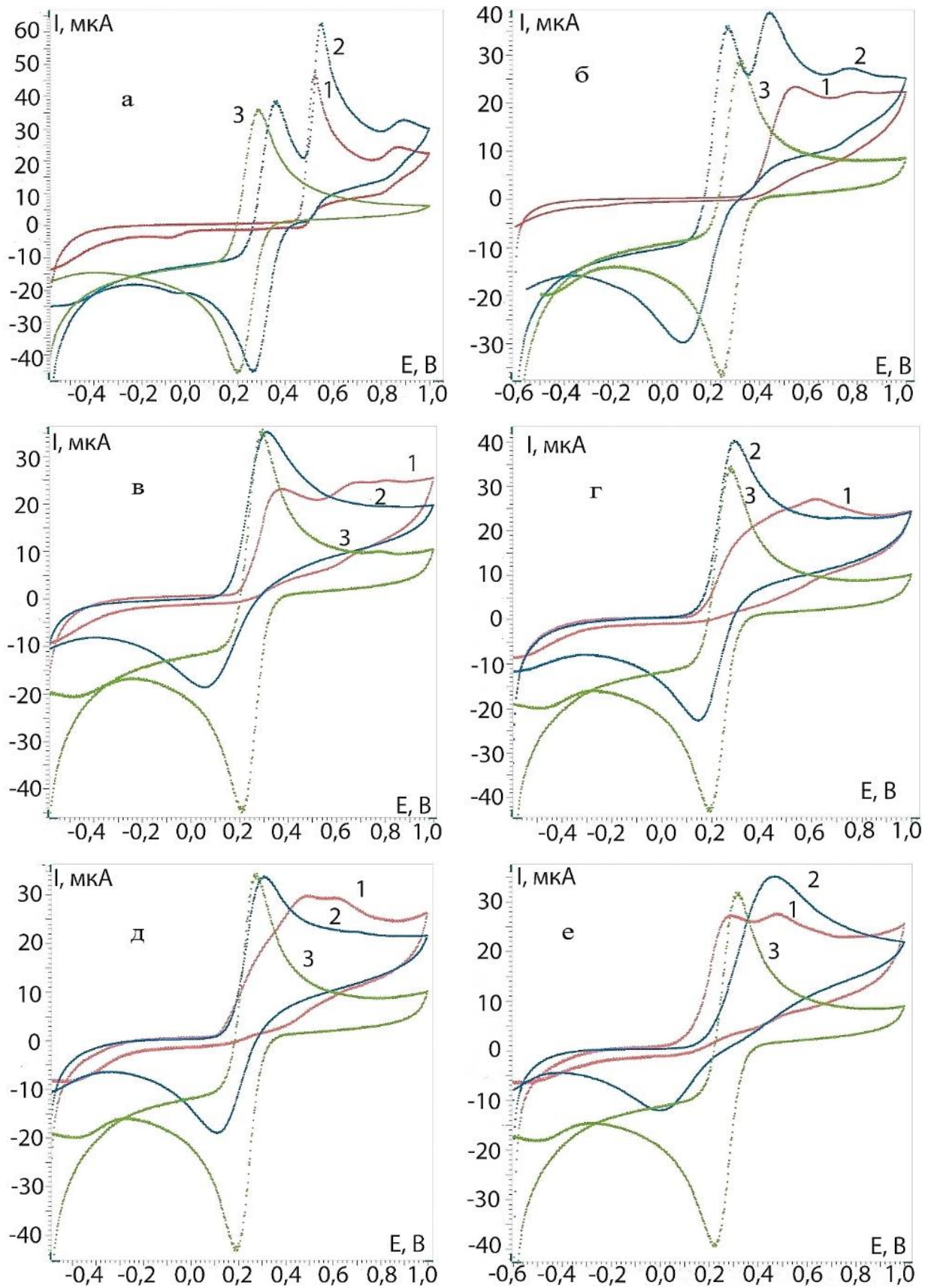


Рисунок 3.12 - ЦВА 1 - галловой кислоты, 2 - гексацианоферрата с галловой кислотой и 3 - гексацианоферрата при рН 2 (а), 4 (б), 6 (в), 7 (г), 8 (д), 10 (е)

Экспериментальные данные, полученные методом ЦВА полностью согласуются с расчетом условных констант устойчивости. Такой характер изменения вольтамперограмм может свидетельствовать о протекании конкурирующих реакций комплексообразования. Количественный эффект конкурирующего комплексообразования на значение АОЕ оценить не представляется возможным, можно только говорить о том, что протекание конкурирующих реакций имеет место в случае некоторых полифенолов с высокими значениями константы устойчивости их комплексов с железом. С одной стороны, данные исследования объясняют завышенные значения стехиометрических коэффициентов для пирокатехина, пирогаллола и галловой кислоты (таблица 3.10). С другой стороны, образование прочных комплексов с ионами железа является одним из механизмов антиоксидантного действия в организме человека.

Таким образом, при потенциометрическом определении АОЕ в ряде случаев регистрируется суммарный эффект антиоксидантного действия, связанный как с переносом электрона с АО на гексацианоферрат (окислительно-восстановительная реакция), так и с переносом пары электронов с образованием ковалентной связи по донорно-акцепторному механизму (реакция комплексообразования).

ГЛАВА 4 ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕГРАЛЬНОГО ПАРАМЕТРА АРЕ, ОСНОВАННОГО НА РЕАКЦИИ ПЕРЕНОСА АТОМА ВОДОРОДА

Как уже отмечалось ранее, в подходах, основанных на реакциях с переносом атома водорода, измеряется способность антиоксиданта «гасить» свободные радикалы посредством отрыва атома водорода (уравнение 1.15, глава 1). Поскольку в организме образование свободных радикалов происходит непрерывно, то для разработки методик, основанных на реакции переноса атома водорода лучше использовать не стабильные радикалы, а радикал – генерирующие системы. Электронно-протонный перенос с молекулы антиоксиданта на радикал также должен сопровождаться изменением окислительно-восстановительного потенциала системы, что позволяет использовать потенциометрию в качестве способа регистрации этих процессов.

Процессы электронно-протонного переноса (ингибирования радикала) могут быть охарактеризованы параметром антирадикальной емкости (АРЕ), который можно рассчитать следующим образом [333]:

$$\text{АРЕ} = f[\text{InH}] = k_i \cdot [\text{R-R}] \cdot \tau \quad (4.1)$$

где АРЕ – антирадикальная емкость, М-экв;

τ – период индукции, с (время за которое АО полностью израсходуется в реакции с радикалами);

$[\text{InH}]$ – концентрация антиоксиданта, М;

k_i – константа скорости генерирования радикалов, с^{-1} ; $[\text{R-R}]$ – концентрация инициатора радикалов, М;

f - коэффициента ингибирования, который показывает, сколько обрывов радикальных цепей приходится на одну молекулу ингибитора.

Таким образом, для определения АРЕ необходимо обладать информацией как о времени полного расходования АО, так и о константе скорости генерирования радикалов.

Требования к модели окислителя (радикала) в реакции электронно-протонного переноса можно сформулировать следующим образом:

- источником радикалов должна являться радикал-генерирующая система;
- генерация радикалов должна реализовываться в условиях, близких к физиологическим;
- образующиеся радикалы должны быть схожи по природе и строению с радикалами, образующимися в организме;
- доступность источника радикалов;
- должны быть известны кинетические параметры реакции генерирования радикалов в условиях проведения анализа.
- электронно-протонный перенос с молекулы АО на радикал также должен сопровождаться изменением ОВП системы;
- должна быть реализуемой возможность получать результат в универсальных единицах измерения, например, М-экв;
- должна быть обеспечена возможность анализировать широкий круг объектов, в том числе окрашенных.

В качестве источника радикалов выбран азоинициатор 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорида (рисунок 4.1), успешно используемый в хемилюминесцентных методах исследования антирадикальных свойств и удовлетворяющий первым четырем из перечисленных выше требований [334].

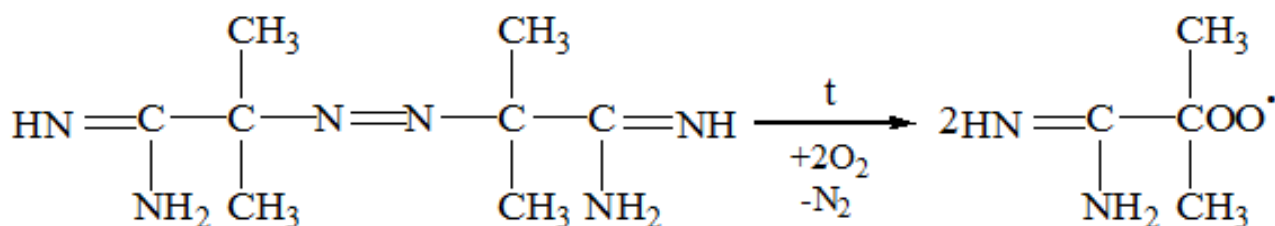


Рисунок 4.1 - Схема термического распада 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорида

4.1 Исследование кинетики генерирования свободных радикалов потенциометрическим методом

Для количественного определения скорости или константы скорости генерирования используются, в основном, спектроскопические (хемилюминесцентные, ЭПР), манометрические и волюмометрические методы [335-338]. Однако данные, имеющиеся в литературе о скорости и константе скорости генерирования пероксильных радикалов либо представлены в узком диапазоне рН и температур, либо недостаточно хорошо согласуются между собой [339-341], поэтому при изменении условий проведения определения АРЕ не всегда корректно пользоваться литературными данными. Для получения наиболее достоверных результатов антирадикальных свойств соединений необходимо владеть информацией о реальной скорости или константе скорости генерирования радикалов в конкретных условиях, в которых реализуется данная реакция.

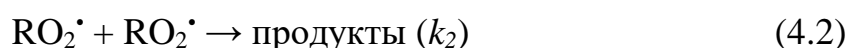
Для исследования кинетики реакции генерирования пероксильных радикалов предложен новый подход с использованием восстановленной формы металла в составе комплексного соединения $[Me^{Red}L]$ в качестве акцептора радикалов с потенциометрической детекцией [342].

Кинетическая схема взаимодействия $[M^{Red}L]$ с радикалами RO_2^{\cdot} , образующимися при распаде инициатора I, включает в себя следующие реакции [342]:

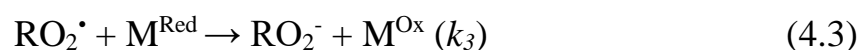
1. Инициирование:



2. Рекомбинация/диспропорционирование RO_2^{\cdot} :



3. Взаимодействие с M^{Red} :



Новый подход для определения кинетических параметров реакции генерирования пероксильных радикалов основан на взаимодействии

последних с восстановленной формой металла в составе комплексного соединения $[Me^{Red}L]$, результатом которой является образование обратимой системы типа $[M^{Ox}L] / [M^{Red}L]$. Окислительно-восстановительный потенциал такой системы $[M^{Ox}L] / [M^{Red}L]$ подчиняется уравнению Нернста. Сдвиг потенциала системы будет зависеть от количества генерируемых радикалов, вступивших во взаимодействие с $[M^{Red}L]$.

Значение потенциала системы $[Me^{Red}L] / [Me^{Ox}L]$ к моменту времени t_1 можно выразить согласно уравнению Нернста (4.4):

$$E^{t_1}_{[Me^{Ox}L]/[Me^{Red}L]} = E^0_{[Me^{Ox}L]/[Me^{Red}L]} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C([Me^{Ox}L])^{t_1}}{C([Me^{Red}L]^0) - C([Me^{Ox}L]^{t_1})} \quad (4.4)$$

В момент времени $t_2 = h \cdot t$, учитывая, что скорость генерирования остается постоянной, потенциал равен (4.5):

$$E^{t_2}_{[Me^{Ox}L]/[Me^{Red}L]} = E^0_{[Me^{Ox}L]/[Me^{Red}L]} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{h \cdot C([Me^{Ox}L])^{t_1}}{C([Me^{Red}L]^0) - h \cdot C([Me^{Ox}L]^{t_1})} \quad (4.5)$$

Расчет скорости генерирования проводили по уменьшению концентрации акцептора $[Me^{Red}L]$ в каждый момент времени по формуле (4.6) исходя из разности потенциалов в момент времени t_1 и t_2 [343].

$$C([Me^{Red}L]^{t_2}) = C([Me^{Red}L]^0) - \frac{C([Me^{Red}L]^0)(h - \varphi)}{h \cdot (1 - \varphi)} \quad (4.6)$$

где $\varphi = 10^{(E_1 - E_2) \cdot n \cdot F / RT \cdot 2,303}$;

$C([Me^{Red}L]^0)$ - исходная концентрация акцептора, М;

$C([Me^{Red}L]^{t_2})$ - концентрация акцепторов момент времени t_2 , М;

E_1 – потенциал, измеренный через промежуток времени $t_1 = t$, В;

E_2 – потенциал, измеренный через промежуток времени $t_2 = ht$, В;

h - отношение t_1 к t_2 .

Скорость генерирования пероксильных радикалов определяли по формуле (4.7):

$$W_i = d\{C([Me^{Red}L])\}/dt, \quad (4.7)$$

где W_i – скорость генерирования радикалов, $M \cdot c^{-1}$.

$C([Me^{Red}L])$ - концентрация акцептора, М.

Константу скорости генерирования пероксильных радикалов (k_i) рассчитывали по формуле (4.8) [344]:

$$k_i = \frac{W_i}{2 \cdot C(AAPH)} \quad (4.8)$$

где $C_{(AAPH)}$ - концентрация инициатора ААРН, М.

4.1.1 Выбор акцептора радикалов

При выборе реагента в качестве акцептора радикалов руководствовались следующими требованиями [345]:

1. Высокие значения условной константы устойчивости комплексов в нейтральной среде;
2. Термодинамическая вероятность протекания реакции между генерируемыми радикалами и реагентом ($E_{RO_2^{\bullet}} > E_{Me^{Red}L}$) в условиях, близких к физиологическим, т.е. при рН близком к 7;
3. Образующаяся в результате реакции с пероксильными радикалами окислительно-восстановительная система типа $[M^{Ox}L] / [M^{Red}L]$ должна быть обратима;
4. Скорость взаимодействия пероксильных радикалов с реагентом должна быть несоизмеримо выше, чем скорость образования этих радикала;
5. Коэффициент ингибирования акцептора должен равняться 1.

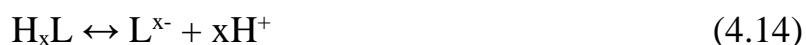
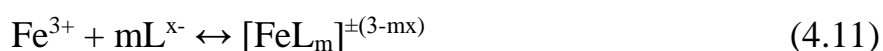
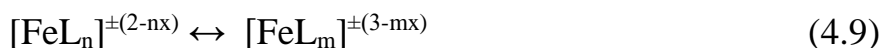
В качестве возможных акцепторов пероксильных радикалов были исследованы комплексы железа. Комплексные соединения железа широко применяются в электрохимических методах анализа, в частности, в потенциометрии [346, 347]. Поскольку, как это уже было отмечено в 3 главе, окислительно-восстановительный потенциал комплексного соединения сильно зависит от природы лиганда, входящего в его состав (Таблица 3.5), это дает возможность выбрать соединение с необходимым окислительно-восстановительным потенциалом. При окислительно-восстановительном

превращении ионов железа, входящих в комплексное соединение, происходит перенос одного электрона, что делает эти соединения удобными при использовании в качестве акцептора радикалов, т.к. одноэлектронный перенос будет обеспечивать обрыв одной радикальной цепи.

Данных об окислительно-восстановительном потенциале системы ААРН в литературе не приводится. Известно, что стандартные электродные потенциалы свободных радикалов, в т.ч. пероксильных, имеют значения от 0,7 В до 2,4 В [316], что дает основание считать их веществами с ярко выраженными свойствами окислителя. Исходя из значений стандартных потенциалов системы $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ в составе различных комплексных соединений (таблица 3.5) в качестве акцептора пероксильных радикалов в дальнейших исследованиях использовали комплекс железа (II) с ЭДТА $[\text{Fe(II)-EDTA}]^{2-}$ и $\text{K}_4[\text{Fe(CN)}_6]$.

С целью учета конкурирующих кислотно-основных взаимодействий, рассчитаны условные константы устойчивости комплексов при разных значениях рН раствора.

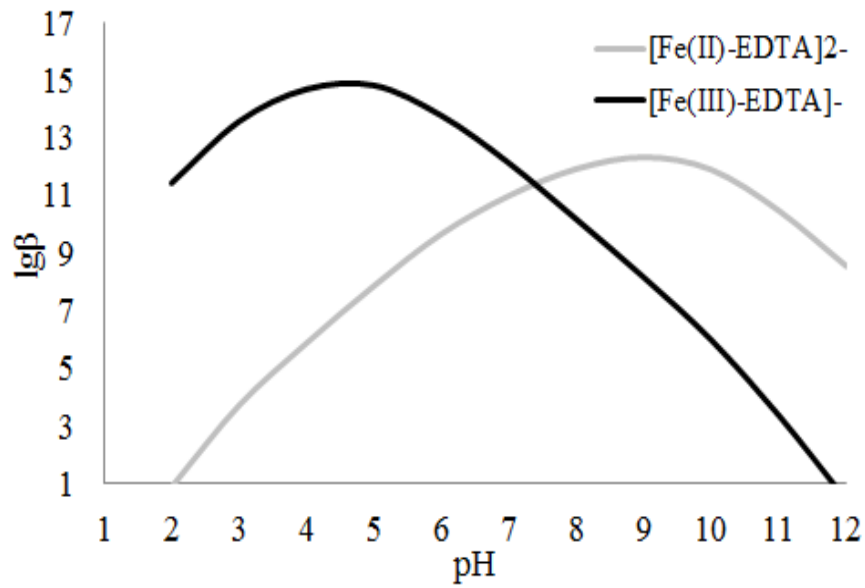
Для акцептора на основе комплексного соединения железа в растворе возможны следующие равновесия (4.9-4.14):



Условную константу устойчивости комплексов вычисляли по формулам 3.12-3.14.

На рисунке 4.2 приведены графики зависимости условных констант устойчивости используемых комплексов металлов и их окисленных форм от рН.

a



б

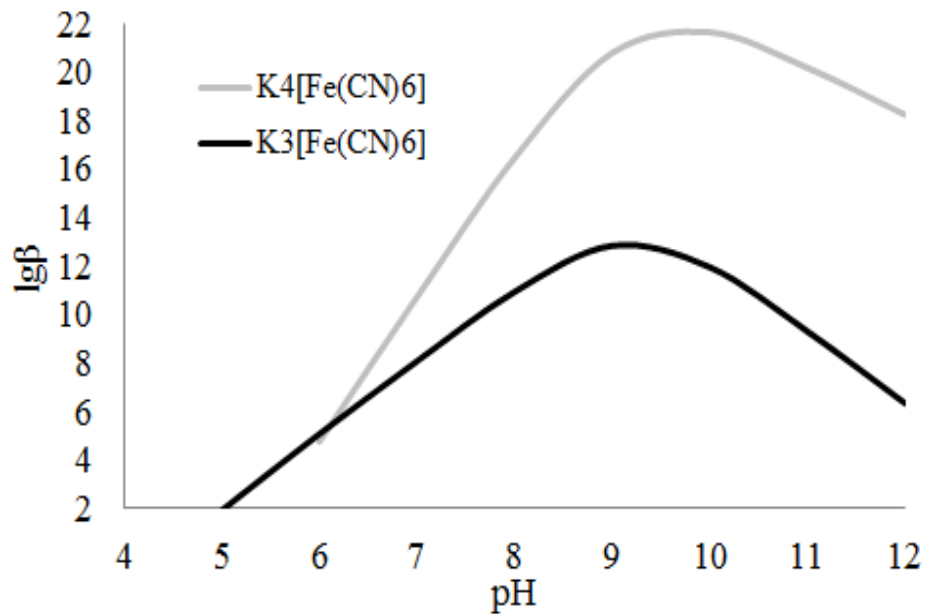


Рисунок 4.2 - Зависимость условной константы устойчивости комплексов $[\text{Fe(II)-EDTA}]^{2-} / [\text{Fe(III)-EDTA}]^{-}$ (а) и $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] / \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ от pH

Количественный анализ при pH близком к 7 будет возможен в случае, если константа устойчивости комплексов превышает значение 10^8 . Данному условию удовлетворяют оба выбранных реагента, т.е. $[\text{Fe(II)-EDTA}]^{2-}$ и $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ потенциально могут являться возможными акцепторами

радикалов. Однако, система $[\text{Fe(II)-EDTA}]^-/[\text{Fe(III)-EDTA}]^{2-}$ недостаточно обратима (рисунок 4.3), что может привести к искажению результатов ввиду неустойчивости равновесия окислительно-восстановительной системы [348].

На рисунках 4.4 и 4.5 приведены графики изменения потенциала системы и концентрации Fe^{2+} в составе комплексных соединений от времени реакции 4.1. Зависимости изменения концентрации комплексов $[\text{Fe(II)-EDTA}]^{2-}$ и $\text{K}_4[\text{Fe(CN)}_6]$ во времени (кривые 1 и 2 на рисунке 4.5) имеют практически линейный вид ($R^2=0,99$).

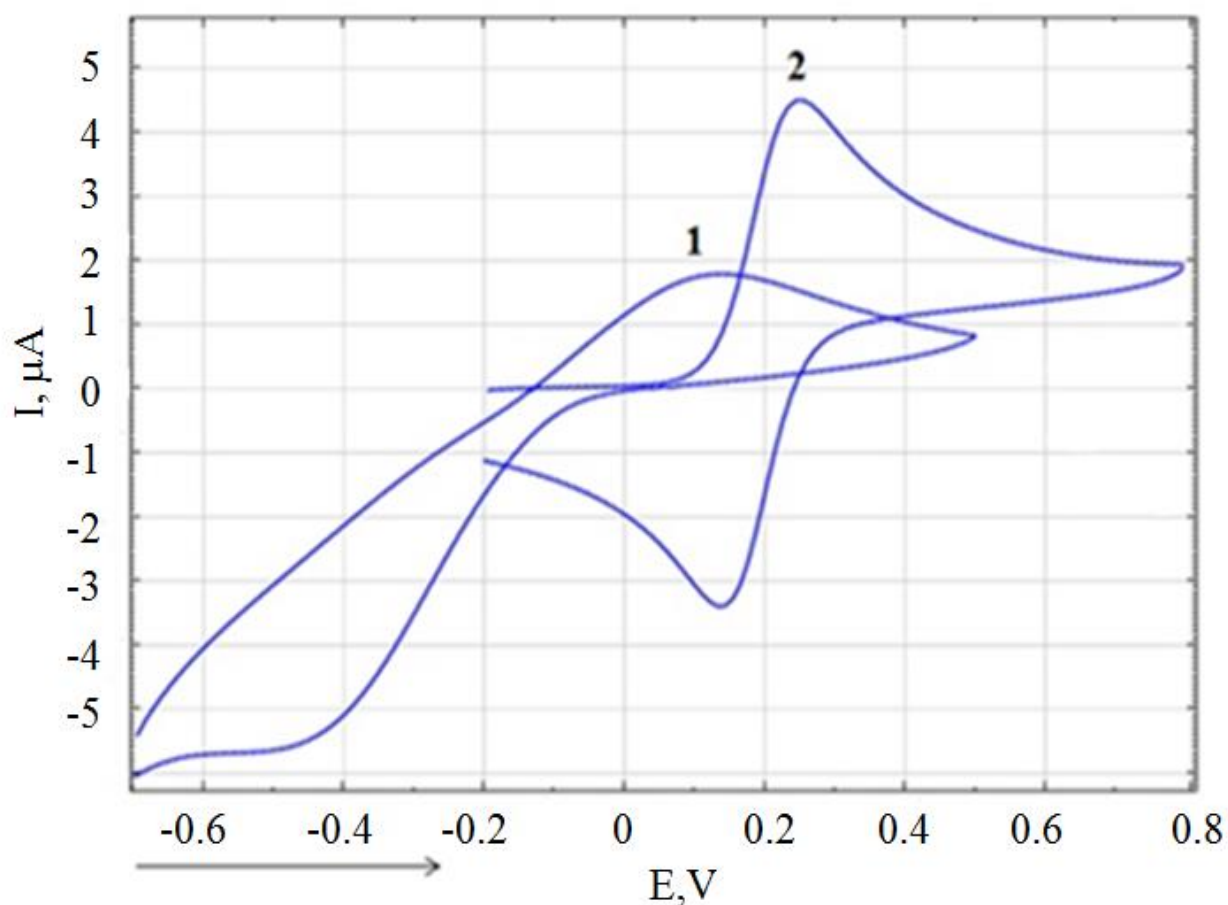


Рисунок 4.3 - Циклические вольтамперограммы комплексов железа (II). 1 - $[\text{Fe(II)-EDTA}]^{2-}$, 2 - $\text{K}_4[\text{Fe(CN)}_6]$. Фон: 0.1 М КСl. Скорость сканирования потенциала 0,2 В/с

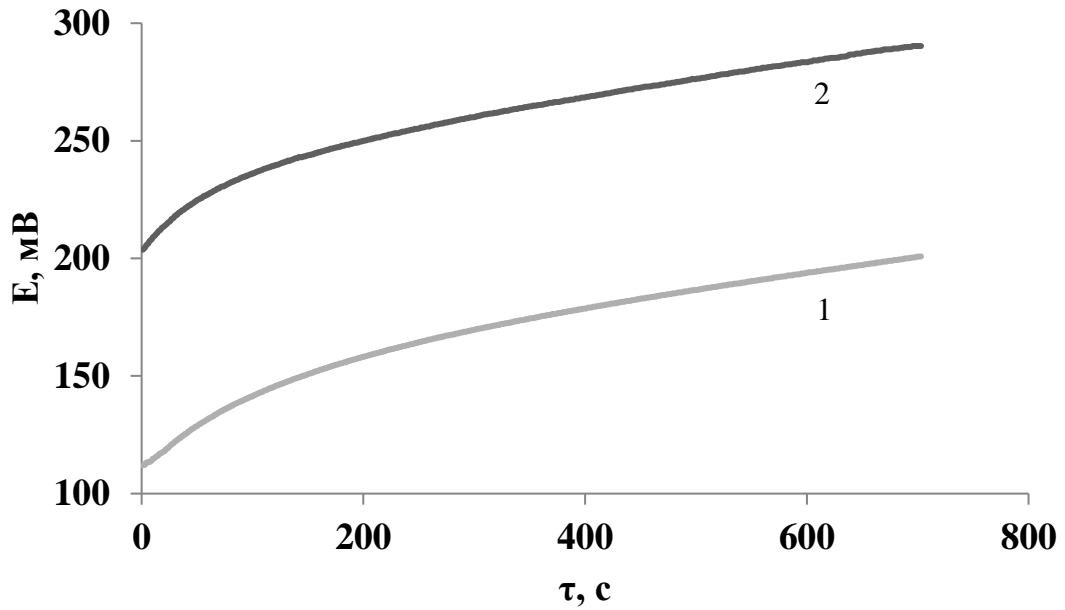


Рисунок 4.4 - Зависимости потенциала от времени, полученные при использовании комплексов железа (II). 1 - $[\text{Fe(II)-EDTA}]^{2-}$, 2 - $\text{K}_4[\text{Fe(CN)}_6]$

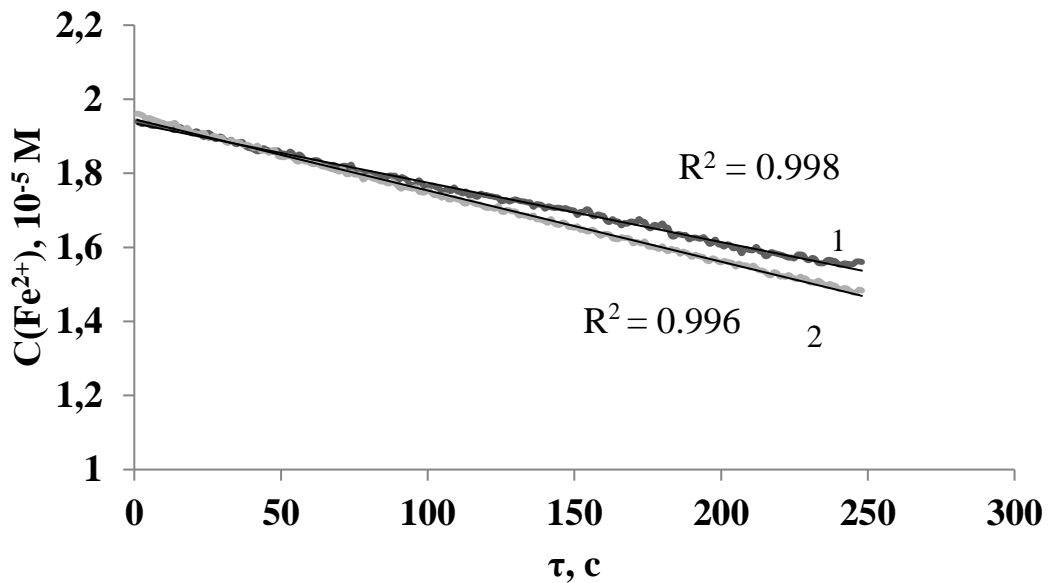


Рисунок 4.5 - Зависимости концентрации Fe^{2+} в составе комплексных соединений от времени. 1 - $[\text{Fe(II)-EDTA}]^{2-}$, 2 - $\text{K}_4[\text{Fe(CN)}_6]$

В таблицах 4.1 и 4.2 приведены значения величины скорости и константы скорости генерирования пероксильных радикалов, рассчитанные по изменению концентрации $[\text{Fe(II)-EDTA}]^{2-}$ и $\text{K}_4[\text{Fe(CN)}_6]$ в реакции 4.3.

Таблица 4.1 - Скорость (W_i) и константа скорости генерирования (k_i) пероксильных радикалов, рассчитанные по изменению концентрации $[\text{Fe(II)-EDTA}]^{2-}$ ($C_{\text{ААРН}}=0.1 \text{ M}$, $T=37^{\circ}\text{C}$) ($n=5$, $P=0.95$)

$C [\text{Fe(II)-EDTA}]^{2-}$, мМ	W_i , $10^{-7}\text{M}\cdot\text{c}^{-1}$	S_r	k_i , 10^{-6}c^{-1}	\bar{k}_i , 10^{-6}c^{-1}
0.20	2.4 ± 0.2	0.07	1.18 ± 0.08	1.00 ± 0.1 ($S_r=0.13$)
0.25	1.9 ± 0.2	0.08	0.97 ± 0.08	
0.30	1.7 ± 0.1	0.08	0.86 ± 0.07	

Таблица 4.2 - Скорость (W_i) и константа скорости генерирования (k_i) пероксильных радикалов, рассчитанные по изменению концентрации $\text{K}_4[\text{Fe(CN)}_6]$ ($C_{\text{ААРН}}=0.1 \text{ M}$, $T=37^{\circ}\text{C}$) ($n=5$, $P=0.95$)

$C (\text{K}_4[\text{Fe(CN)}_6])$, мМ	W_i , $10^{-7}\text{M}\cdot\text{c}^{-1}$	S_r	k_i , 10^{-6}c^{-1}	\bar{k}_i , 10^{-6}c^{-1}
0.15	1.7 ± 0.1	0.05	0.87 ± 0.07	0.92 ± 0.06 ($S_r=0.04$)
0.20	1.9 ± 0.2	0.06	0.94 ± 0.09	
0.25	1.8 ± 0.1	0.04	0.88 ± 0.06	
0.30	1.94 ± 0.09	0.03	0.97 ± 0.05	

Важно отметить, что данные, полученные с использованием $[\text{Fe(II)-EDTA}]^{2-}$ недостаточно воспроизводимы ($k_i \cdot 10^{-6} = 1.00\pm 0.1$), а значение константы скорости генерирования (k_i) зависит от концентрации акцептора. Это может быть связано с низкой электрохимической обратимостью системы $[\text{Fe(II)-EDTA}]^+ / [\text{Fe(II)-EDTA}]^{2-}$. Скорость генерирования, измеренная с

использованием $K_4[Fe(CN)_6]$ в изученных условиях не зависит от концентрации акцептора, из чего следует, что порядок реакции по $K_4[Fe(CN)_6]$ можно принять равным нулю, а полученные константы скорости генерирования хорошо воспроизводятся при разных концентрациях акцептора ($k_i \cdot 10^{-6} = 0.92 \pm 0.06$ ($S_r = 0.04$)). Таким образом, в качестве акцептора радикалов для изучения кинетических характеристик реакций радикал-генерирующих систем выбран гексацианоферрат калия, как наиболее полно удовлетворяющий перечисленным выше требованиям.

4.1.2 Исследование кинетики генерирования пероксильных радикалов с использованием $K_4[Fe(CN)_6]$

Из литературных источников [349] известно, что в отсутствие акцептора радикалов, в данном случае $K_4[Fe(CN)_6]$, устанавливается стационарная концентрация радикалов:

$$[RO_2^*] = (W_i/2k_2)^{0.5} \quad (4.15)$$

В присутствии $K_4[Fe(CN)_6]$ радикалы вступают в реакции рекомбинации и взаимодействия с реагентом. В стационарных условиях скорость инициирования радикалов равна скорости их расходования:

$$W_i = 2k_2 \cdot [RO_2^*]^2 + k_3 \cdot [RO_2^*][K_4[Fe(CN)_6]] \quad (4.16)$$

При высокой концентрации $K_4[Fe(CN)_6]$, когда выполняется условие (4.17):

$$k_3 \cdot [RO_2^*][K_4[Fe(CN)_6]] \gg 2k_2 \cdot [RO_2^*]^2 \quad (4.17)$$

практически все образующиеся радикалы реагируют с $K_4[Fe(CN)_6]$. При этом квадратичной гибелью RO_2^* можно пренебречь, и скорость расходования $K_4[Fe(CN)_6]$ (и накопления $K_3[Fe(CN)_6]$) равна скорости инициирования:

$$-d[K_4[Fe(CN)_6]] / dt = d[K_3[Fe(CN)_6]] / dt = W_i \quad (4.18)$$

Таким образом, при расчете скорости генерирования радикалов необходимо соблюсти следующие условия:

- концентрация $K_4[Fe(CN)_6]$ должна быть достаточной для подавления квадратичной гибели радикалов;
- скорость взаимодействия пероксильных радикалов с $K_4[Fe(CN)_6]$ должна быть несоизмеримо выше скорости генерирования самих радикалов.

Концентрацию $K_4[Fe(CN)_6]$, необходимую для подавления квадратичной гибели радикалов можно оценить, исходя из выражений (4.16-4.17), через величину k_3 , которая характеризует активность $K_4[Fe(CN)_6]$ в реакции с оксидантом $RO_2\cdot$:

$$[K_4[Fe(CN)_6]] \gg 2k_2 \cdot [RO_2\cdot] / k_3 \quad (4.19)$$

$$[K_4[Fe(CN)_6]] \gg (2k_2 \cdot W_i)^{0.5} / k_3 \quad (4.20)$$

Определить величину k_3 можно из анализа кинетических кривых расходования $K_4[Fe(CN)_6]$ при относительно высоких значениях скорости генерирования и малых концентрациях $K_4[Fe(CN)_6]$, когда радикалы вступают, преимущественно, в реакции рекомбинации.

Скорость расходования $K_4[Fe(CN)_6]$ в этом случае равна:

$$-d[K_4[Fe(CN)_6]] / dt = a[K_4[Fe(CN)_6]] \quad (4.21)$$

Интегральные кинетические кривые описываются уравнением 1-го порядка (4.22 – 4.23):

$$[K_4[Fe(CN)_6]] = [K_4[Fe(CN)_6]]_0 \exp(-a \cdot t) \quad (4.22)$$

$$\ln [K_4[Fe(CN)_6]] = \ln [K_4[Fe(CN)_6]]_0 - a \cdot t \quad (4.23)$$

где $a = k_3 \cdot [RO_2\cdot]$.

При $[K_4[Fe(CN)_6]] \rightarrow 0$ концентрация $[RO_2\cdot] \rightarrow (W_i/2k_2)^{0.5}$, а величина $a \rightarrow k_3 \cdot (W_i/2k_2)^{0.5}$.

На рисунке 4.6 представлены типичные кривые зависимости потенциала от времени при добавлении $K_4[Fe(CN)_6]$ в разных концентрациях к ААРН на примере $C_{ААРН} = 0.05$ М.

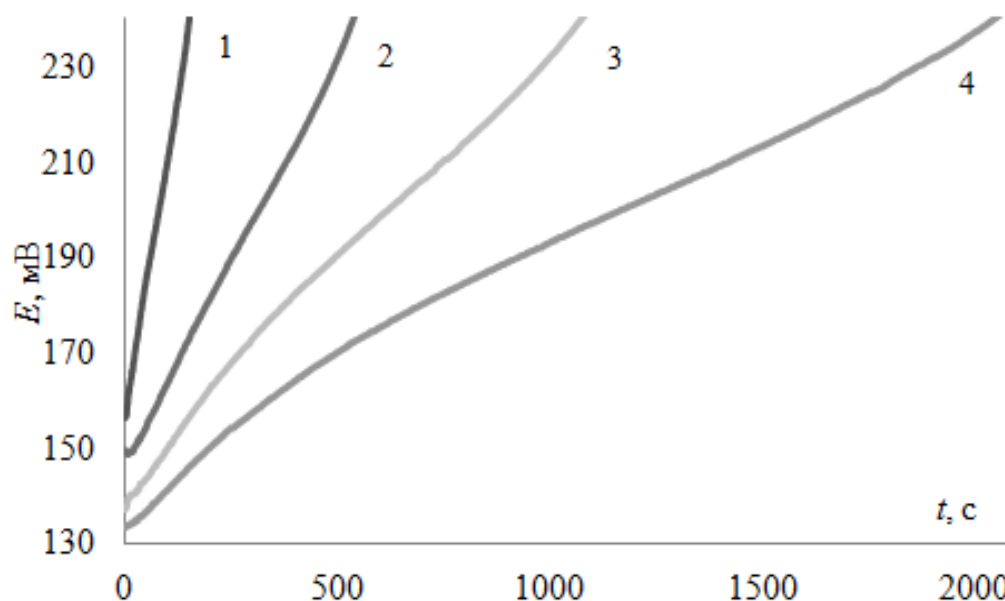


Рисунок 4.6 – Кривые зависимости потенциала от времени при добавлении $K_4[Fe(CN)_6]$ в разных концентрациях к ААРН в PBS при $37^{\circ}C$ на примере $C_{AAPH} = 0.05$ М (1 - 0.02 мМ $K_4[Fe(CN)_6]$; 2 - 0.05 мМ $K_4[Fe(CN)_6]$; 3 - 0.1 мМ $K_4[Fe(CN)_6]$; 4 - 0.2 мМ $K_4[Fe(CN)_6]$)

Проведен расчет теоретических значений логарифма отношений концентраций $K_3[Fe(CN)_6]$ и $K_4[Fe(CN)_6]$ от времени (Рисунок 4.7). Расчеты проведены для скорости генерирования равной $W_i = 1 \cdot 10^{-7} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$.

Поскольку экспериментальные и теоретические кривые, представленные на рисунках 4.6 и 4.7 имеют схожий вид, а потенциал системы прямо пропорционален логарифму отношения концентраций $K_3[Fe(CN)_6]$ и $K_4[Fe(CN)_6]$ в каждый момент времени, можно отметить, что регистрируемый потенциал подчиняется уравнению Нернста. Следовательно, изменение концентрации $K_4[Fe(CN)_6]$ может быть рассчитано по приведенным формулам (4.4 – 4.6).

Определение константы взаимодействия $K_4[Fe(CN)_6]$ с пероксильными радикалами k_3 проводили при концентрациях ААРН 0.05 М и 0.01 М.

На рисунке 4.8 и 4.9 представлены кинетические кривые расходования $K_4[Fe(CN)_6]$, которые представляют собой параллельные прямые с наклоном, равным скорости инициирования радикалов.

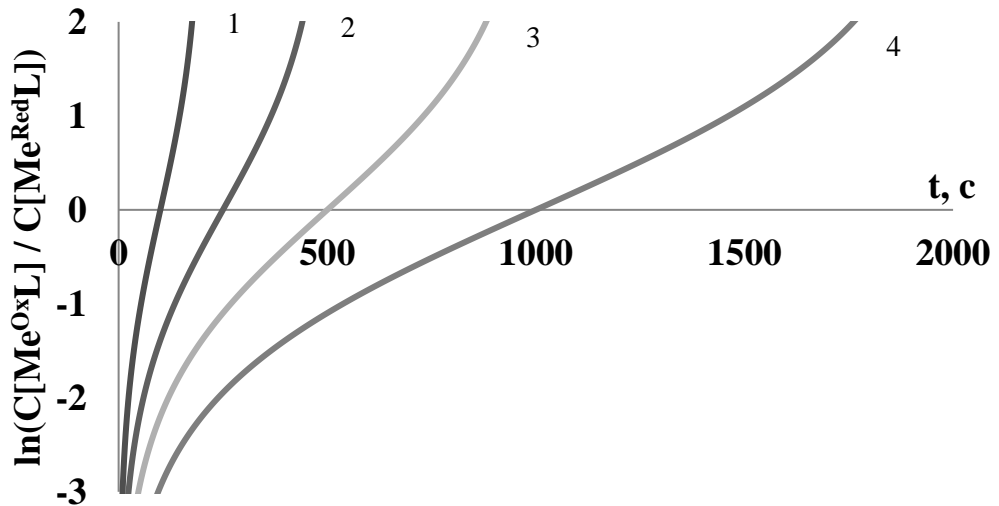


Рисунок 4.7 - Зависимость теоретического значения логарифма отношения концентраций $K_3[Fe(CN)_6]$ и $K_4[Fe(CN)_6]$ от времени, рассчитанные для скорости инициирования $1 \cdot 10^{-7} \text{ M} \cdot \text{c}^{-1}$, при разных концентрациях $K_4[Fe(CN)_6]$ (1 - 0.02 мМ $K_4[Fe(CN)_6]$; 2 - 0.05 мМ $K_4[Fe(CN)_6]$; 3 - 0.1 мМ $K_4[Fe(CN)_6]$; 4 - 0.2 мМ $K_4[Fe(CN)_6]$)

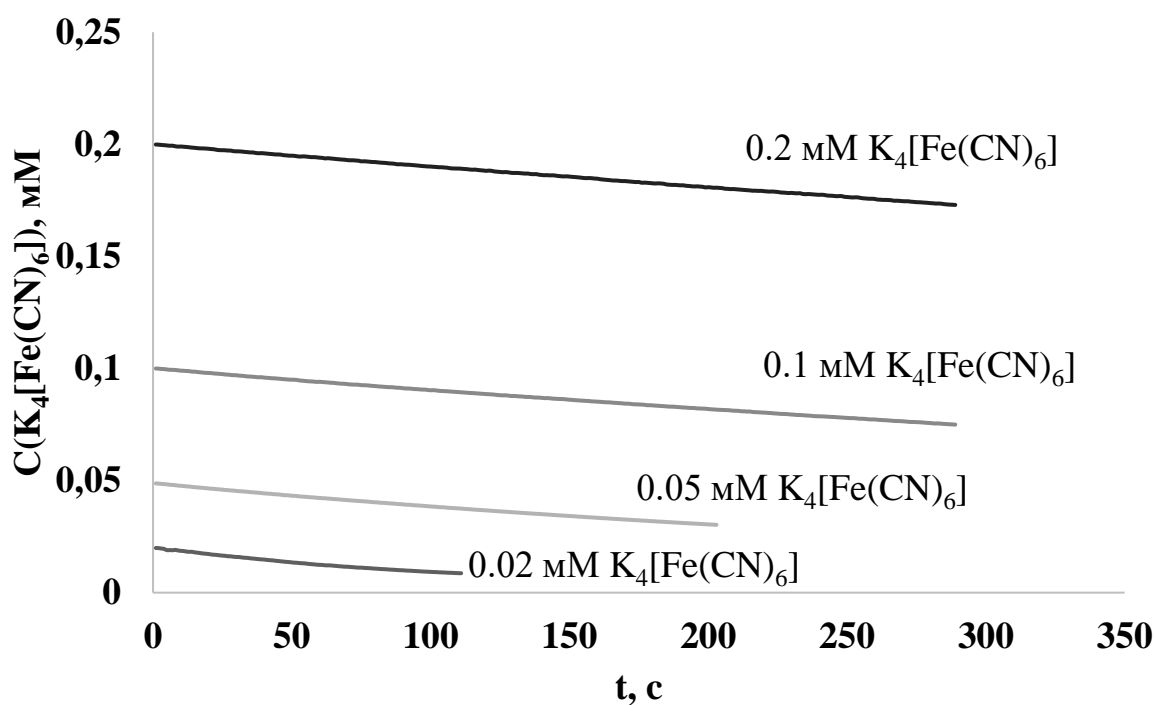


Рисунок 4.8 - Кинетические кривые расходования $K_4[Fe(CN)_6]$ при взаимодействии с радикалами из 0.05 М ААРН в PBS при 37°C

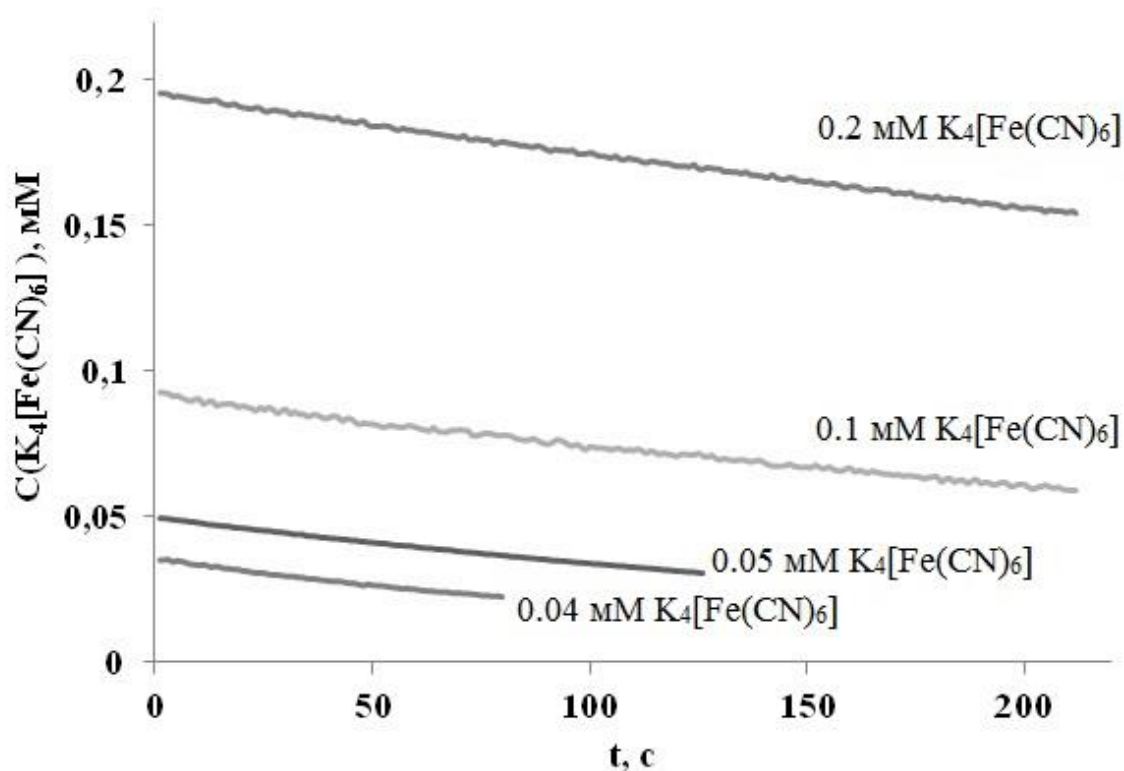


Рисунок 4.9 - Кинетические кривые расходования $K_4[Fe(CN)_6]$ при взаимодействии с радикалами из 0.1М ААРН в PBS при 37°C

На рисунках 4.10 и 4.11 представлены кривые расщедования $K_4[Fe(CN)_6]$ в полулогарифмических координатах, взятого в меньших концентрациях, чем для рисунка 4.8 для 0.05 М ААРН и рисунка 4.9 для 0.1 М ААРН.

В таблице 4.3 представлены значения скорости расщедования $K_4[Fe(CN)_6]$ при взаимодействии с радикалами из 0.05 М ААРН в PBS при 37°C, в таблице 4.4 представлены скорости расщедования акцептора при взаимодействии с радикалами из 0.1М ААРН в PBS при 37°C.

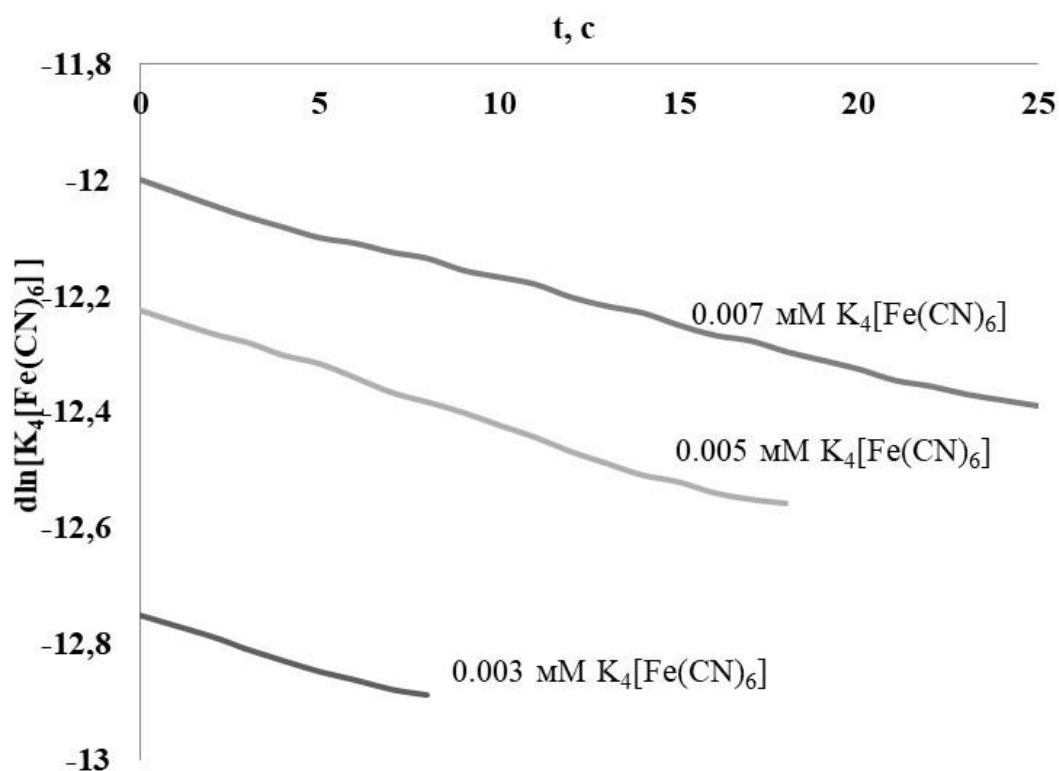


Рисунок 4.10 - Кинетические кривые расщедования $K_4[Fe(CN)_6]$ в полулогарифмических координатах для 0.05 М ААРН

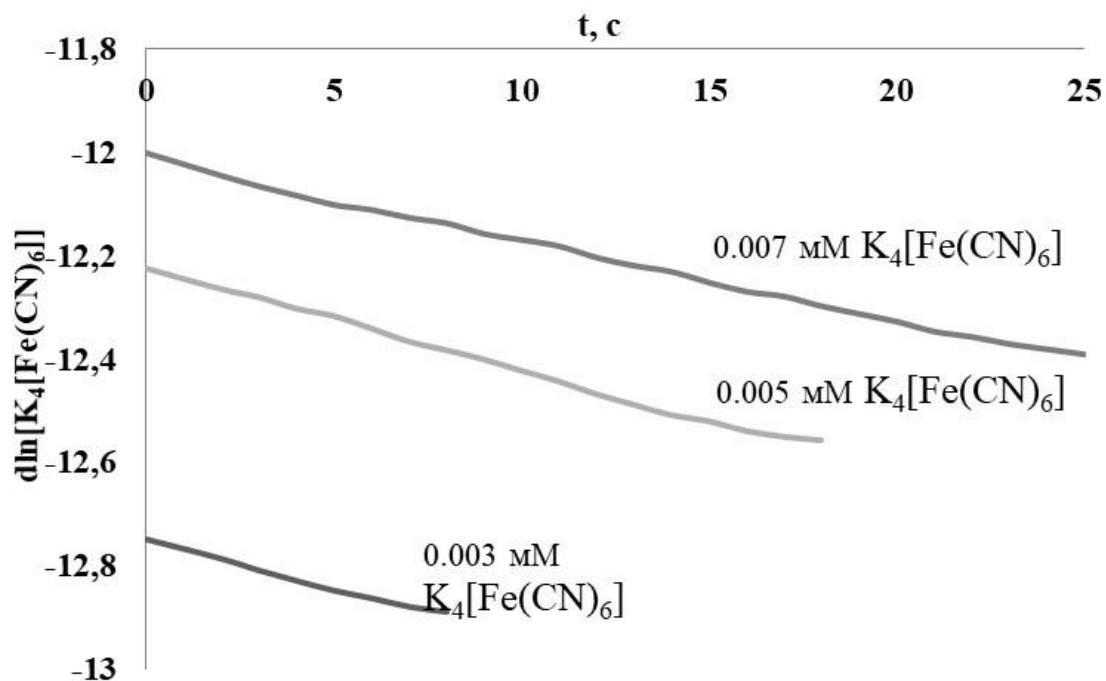


Рисунок 4.11 - Кинетические кривые расходования $K_4[Fe(CN)_6]$ в полулогарифмических координатах для 0.1М ААРН

Таблица 4.3 - Скорость расходования $K_4[Fe(CN)_6]$ при взаимодействии с радикалами из 0.05М ААРН (PBS, 37⁰С, n = 5, P=0.95)

$C(K_4[Fe(CN)_6]), \text{мМ}$	$-d[K_4[Fe(CN)_6]] / dt, 10^{-7} \text{М} \cdot \text{с}^{-1}$	S_r
0.002	0.46 ± 0.01	0.02
0.003	0.61 ± 0.01	0.02
0.005	0.73 ± 0.01	0.02
0.007	0.95 ± 0.01	0.02
0.010	0.99 ± 0.02	0.02
0.020	1.05 ± 0.01	0.01
0.030	1.01 ± 0.03	0.03
0.040	1.07 ± 0.01	0.01
0.050	1.09 ± 0.02	0.02
0.100	1.06 ± 0.02	0.02
0.200	1.04 ± 0.01	0.01

Исходя из данных таблицы 4.3, при концентрациях реагента $K_4[Fe(CN)_6] \geq 0.01$ мМ значения скорости расходования акцептора не имеют статистически значимой разницы и составляют значение $(1.00 \pm 0.03) \cdot 10^{-7} \text{ M} \cdot \text{c}^{-1}$ ($S_r=0.03$) для 0.05 М ААРН. Для 0.1М ААРН значения расходования акцептора не имеют статистически значимой разницы при концентрации $K_4[Fe(CN)_6] \geq 0.04$ мМ и составляют значение $(2.00 \pm 0.04) \cdot 10^{-7} \text{ M} \cdot \text{c}^{-1}$ ($S_r=0.02$) (Таблица 4.4). В данных диапазонах концентрации акцептора достаточно для подавления квадратичной гибели радикалов, таким образом, все образующиеся пероксильные радикалы вступают в реакции взаимодействия с акцептором. Из этого следует, что при концентрациях $K_4[Fe(CN)_6] \geq 0.01$ мМ для 0.05 М ААРН и $K_4[Fe(CN)_6] \geq 0.04$ мМ для 0.1 М ААРН скорость расходования акцептора соответствует скорости генерирования радикалов. Константа скорости генерирования пероксильных радикалов в обоих случаях составила $1.00 \cdot 10^{-6} \text{ c}^{-1}$, можно считать, что условие (4.18) выполняется.

Таблица 4.4 - Скорость расходования $K_4[Fe(CN)_6]$ при взаимодействии с радикалами из 0.1 М ААРН (PBS, 37⁰С, n = 5, P=0.95)

$C(K_4[Fe(CN)_6]), \text{ мМ}$	$-d[K_4[Fe(CN)_6]] / dt, 10^{-7} \text{ M} \cdot \text{c}^{-1}$	S_r
0.003	0.77 ± 0.02	0.02
0.005	1.05 ± 0.02	0.02
0.007	1.11 ± 0.01	0.01
0.010	1.31 ± 0.03	0.02
0.020	1.51 ± 0.01	0.01
0.030	1.72 ± 0.03	0.02
0.040	2.06 ± 0.02	0.01
0.050	1.99 ± 0.04	0.02
0.100	2.03 ± 0.02	0.01
0.200	1.97 ± 0.02	0.01
0.300	1.94 ± 0.09	0.03
0.500	1.97 ± 0.02	0.01

Таким образом, скорость генерирования и константа скорости генерирования не зависят от концентрации реагента в интервале (0.01 – 0.2) мМ для 0.05 М ААРН и (0.04 – 0.5) мМ для 0.1 М ААРН, следовательно, порядок реакции по $K_4[Fe(CN)_6]$ можно принять равным нулю.

Из неравенства (4.17) следует, что $k_3 \gg (2k_2 \cdot W_i)^{0.5} / [K_4[Fe(CN)_6]]$.

Полагая, что $2k_2 = 5.2 \cdot 10^4 \text{ (М} \cdot \text{с)}^{-1}$ [338], получаем:

$$k_3 \gg (5.2 \cdot 10^4 \cdot 2 \cdot 10^{-7})^{0.5} / 0.00004 = 2.5 \cdot 10^3 (\text{М}^{0.5} \cdot \text{с})^{-1} \quad (4.24)$$

На рисунке 4.12 приведена зависимость начального наклона полулогарифмических анаморфоз кривых изменения концентрации $K_4[Fe(CN)_6]$ от исходной концентрации $K_4[Fe(CN)_6]$.

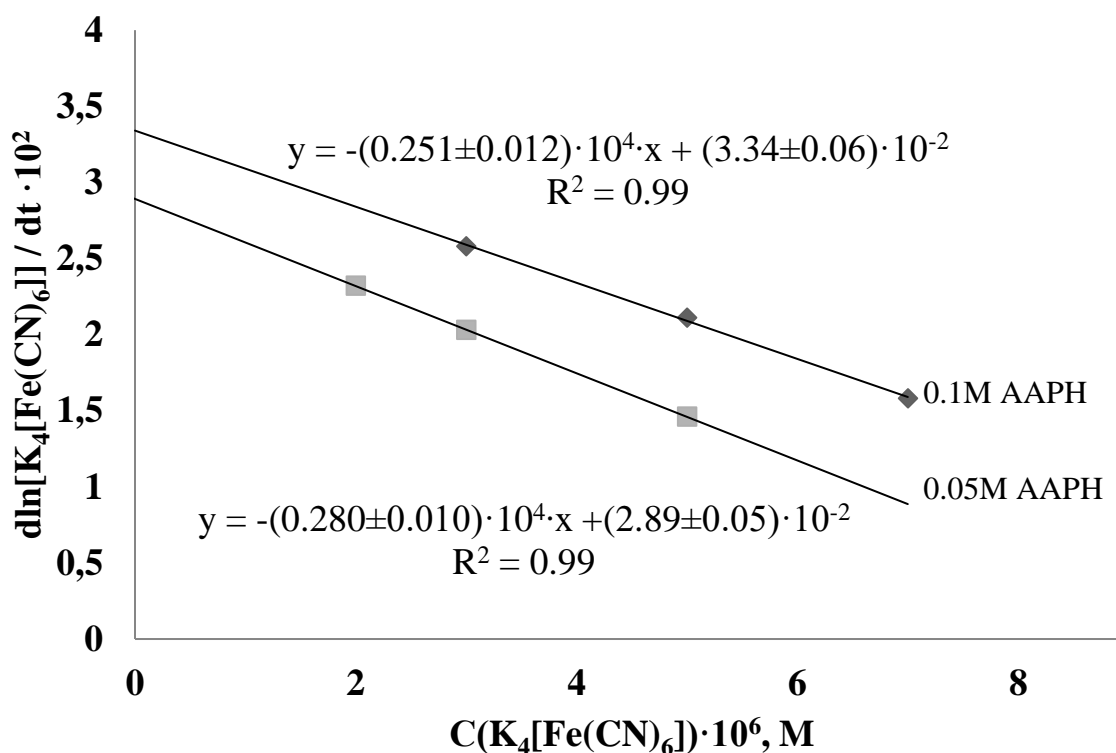
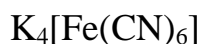


Рисунок 4.12 - Зависимость параметра a от начальной концентрации



Кривые линейризуются в полулогарифмических координатах и тангенс угла наклона анаморфоз (рисунок 4.11) увеличивается с уменьшением концентрации $K_4[Fe(CN)_6]$ до предельного значения 0.0334 для 0.1 М ААРН и 0.0289 для 0.05 М ААРН (рисунок 4.12). Используя значение константы

рекомбинации, приведенное в литературе [349], равное $2k_2 = 5.2 \cdot 10^4 \text{ (M}\cdot\text{c)}^{-1}$ можно оценить значение $k_3 = (1.9 \pm 0.2) \cdot 10^4 \text{ (M}\cdot\text{c)}^{-1}$.

Достаточно высокое значение k_3 указывает на высокую эффективность выбранного реагента $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ в качестве акцептора радикалов а также на то, что скорость взаимодействия пероксильных радикалов с $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ несоизмеримо выше, чем скорость образования самих радикалов. При концентрации $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \geq 0.01 \text{ мМ}$ для 0.05 М ААРН и $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \geq 0.04 \text{ мМ}$ для 0.1 М ААРН они расходятся с постоянной скоростью. Эти данные указывают на правомерность определения скорости и константы скорости генерирования пероксильных радикалов по убыванию $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

В таблице 4.5 приведены соответствующие значения скорости и константы скорости генерирования пероксильных радикалов, полученные при разных концентрациях ААРН в PBS при 37°C.

Таблица 4.5 - Скорость генерирования (W_i) и константа скорости генерирования (k_i) пероксильных радикалов определенные по реакции взаимодействия $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ с ААРН в разных концентрациях ($C(\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]) = 0.2 \text{ мМ}$, $n=5$, $P=0.95$)

$C_{(\text{ААРН})}$, М	W_i , $10^{-7} \text{ M}\cdot\text{c}^{-1}$	S_r	k_i , 10^{-6} c^{-1}
0.05	1.05 ± 0.01	0.01	1.00 ± 0.01
0.10	2.00 ± 0.04	0.02	1.00 ± 0.02
0.15	2.87 ± 0.03	0.01	0.96 ± 0.01
0.20	3.8 ± 0.1	0.03	0.96 ± 0.03
0.30	5.4 ± 0.1	0.02	0.90 ± 0.02
			$k_{\text{ср}} \cdot 10^6 = 0.96 \pm 0.04 \text{ c}^{-1}$ ($S_r=0,04$)

На рисунке 4.13 представлена зависимость скорости реакции генерирования пероксильных радикалов от концентрации инициатора (ААРН). Линейный характер зависимости ($R^2 = 0.99$) скорости образования

пероксильных радикалов от концентрации ААРН позволяет использовать для расчета скорости выражение (4.7), справедливого для реакции первого порядка по инициатору.

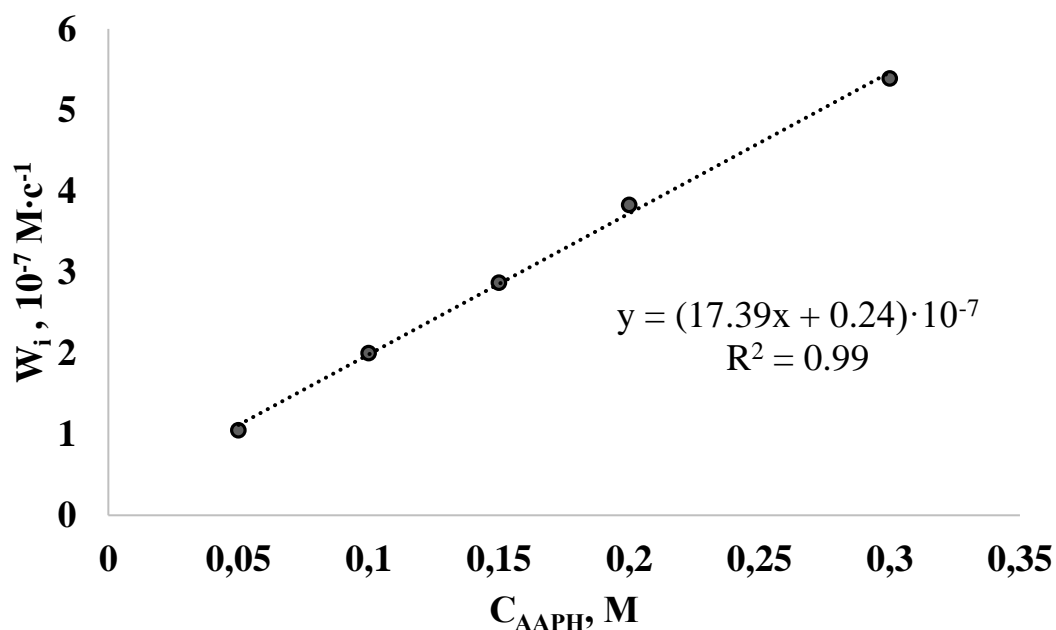


Рисунок 4.13 - Зависимость скорости реакции генерирования пероксильных радикалов от концентрации инициатора

В таблице 4.6 представлены результаты определения скорости и константы скорости генерирования пероксильных радикалов, полученные при разных температурах реакционной среды.

Таблица 4.6 - Скорость генерирования и константа скорости генерирования пероксильных радикалов, определенные при разных температурах ($C_{AAPN}=0,1 M$, $n=5$, $P=0.95$)

$T, ^\circ C$	$W_i, 10^{-7} M \cdot c^{-1}$	S_r	$k_i, 10^{-6} c^{-1}$
37	1.99 ± 0.04	0.02	0.99 ± 0.02
40	2.44 ± 0.07	0.03	1.22 ± 0.03
42	3.00 ± 0.06	0.02	1.50 ± 0.03
45	3.46 ± 0.07	0.02	1.73 ± 0.03

На рисунке 4.14 приведена зависимость логарифма константы скорости генерирования от обратной температуры.

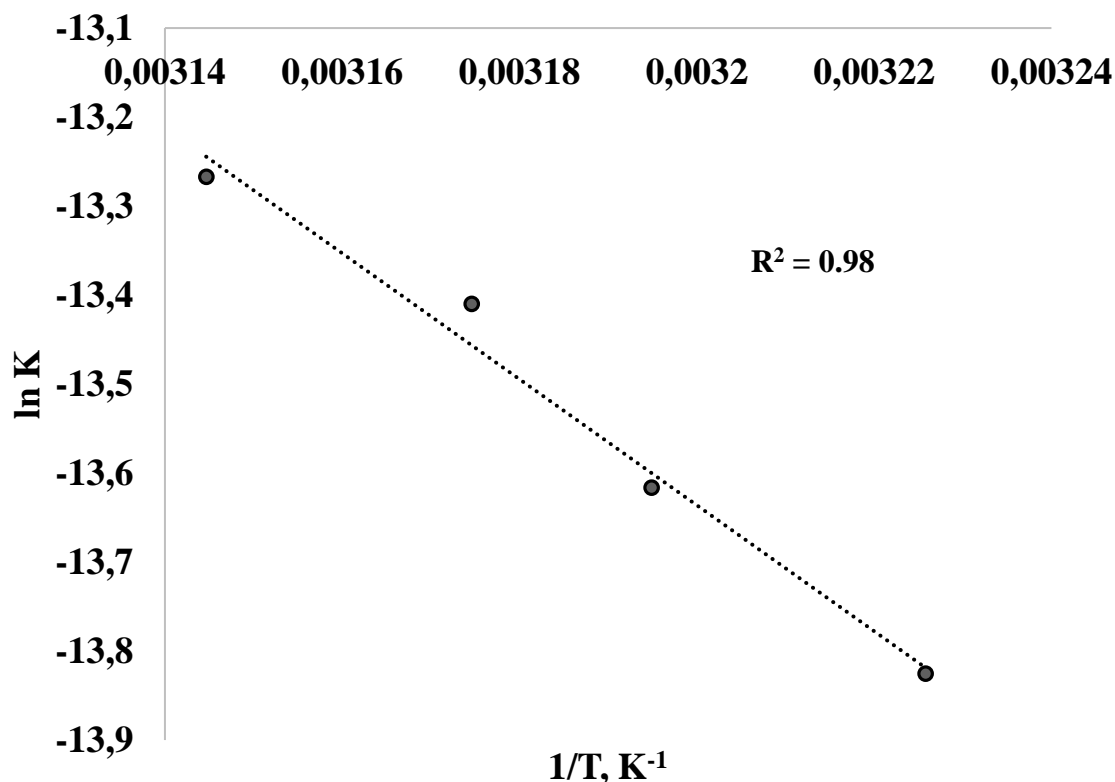


Рисунок 4.14 – График зависимости логарифма константы скорости реакции 4.1 от обратной температуры

Линейность зависимости логарифма константы скорости реакции 4.1. от обратной температуры ($R^2=0.98$) соответствует классическому термоактивационному закону изменения константы скорости от температуры, а найденная в эксперименте энергия активации составляет порядка 64 кДж/моль, что согласуется с данными, представленными в литературных источниках [350].

В ходе исследования кинетики генерирования пероксильных радикалов были определены диапазоны рабочих концентраций реагента при разных концентрациях инициатора, которые составили (0.01 – 0.2) мМ для 0.05 М ААРН и (0.04 – 0.5) мМ для 0.1 М ААРН.

Значение скорости и константы скорости генерирования пероксильных радикалов при концентрациях ААРН $C_{\text{ААРН}} = (0.05 - 0.3) \text{ М}$ составили $W_i = (1.05 - 5.39) \cdot 10^{-7} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$, $k_{\text{иср}} = (1.00 \pm 0.02) \cdot 10^{-6} \text{ с}^{-1}$. Полученные данные согласуются с литературными.

Таким образом, новый подход для исследования кинетики реакции генерирования пероксильных радикалов с использованием восстановленной формы металла в составе комплексного соединения $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ в качестве акцептора радикалов с потенциометрической детекцией позволяет получать достоверные данные о скорости и константе скорости генерирования пероксильных радикалов, согласующиеся с литературными данными [339-341].

Предложенный подход может быть применен для исследования кинетики других радикал-генерирующих систем, которые могут быть использованы в качестве модельных реакций образования свободных радикалов.

Определение кинетических параметров реакций представляет важное значение для аналитической химии, особенно, при изучении ингибирующих свойств соединений. В данном случае, полученное значение константы скорости генерирования пероксильных радикалов будет использоваться далее при расчете антирадикальной емкости потенциометрическим методом.

4.2 Потенциометрическое определение антирадикальной емкости

В данной работе впервые установлена закономерность изменения потенциала системы в процессе генерирования пероксильных радикалов и в реакциях антиоксидантов, доноров электронов, с генерируемыми пероксильными радикалами ААРН [351, 352].

В литературе описан хемилюминесцентный подход для изучения антиоксидантных свойств соединений, основанный на реакции термического распада ААРН. На рисунке 4.15 представлены классические кривые изменения люминесценции при добавлении к ААРН тролокса в разных

концентрациях [333]. На графике участок АВ соответствует инициированию радикальной реакции, ВС - взаимодействию генерируемых радикалов с ингибитором (период индукции), CD - завершению периода индукции и дальнейшему радикальному инициированию. На рисунке 4.16 приведены типичные кинетические кривые изменения потенциала от времени при добавлении к ААРН аскорбиновой кислоты при протекании тех же процессов.

Данная зависимость представляет собой частный случай, в то время как характер изменения потенциала во время генерирования радикалов и их последующего взаимодействия с различными антиоксидантами имеют идентичный вид, описанный далее.

Кинетические кривые изменения потенциала и кривые тушения хемилюминесценции при добавлении антиоксидантов к радикал-генерирующей системе ААРН имеют схожий характер зависимости. Такая тенденция схожести кинетических кривых, а также электронно-протонно-донорно-акцепторный характер взаимодействия антиоксидантов с пероксильными радикалами позволили предложить методику определения антирадикальной емкости антиоксидантов, основанную на измерении потенциала системы.

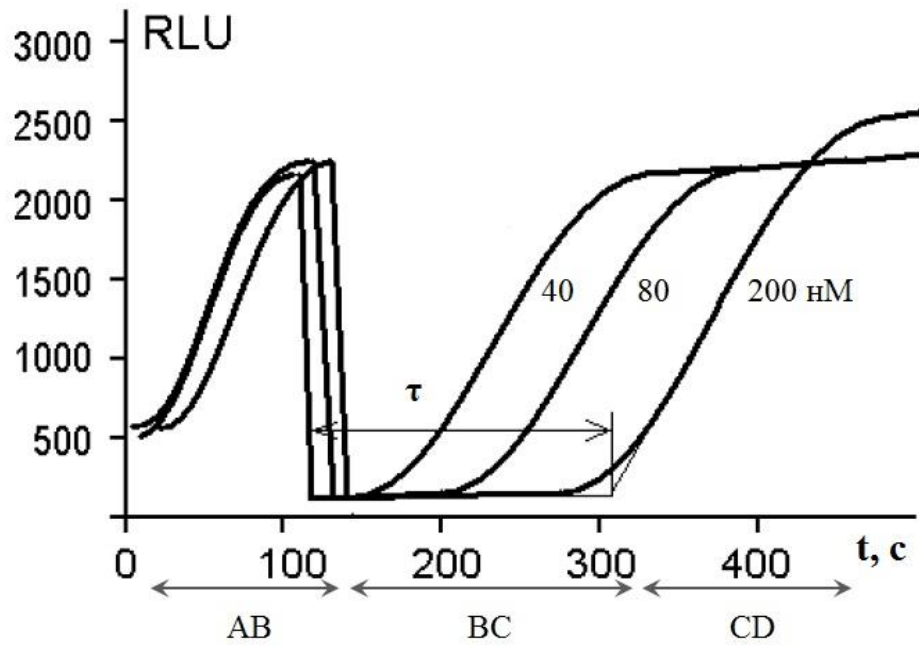


Рисунок 4.15 - Изменение интенсивности люминесценции при добавлении к ААРН 40, 80 и 200 нМ Тролокса

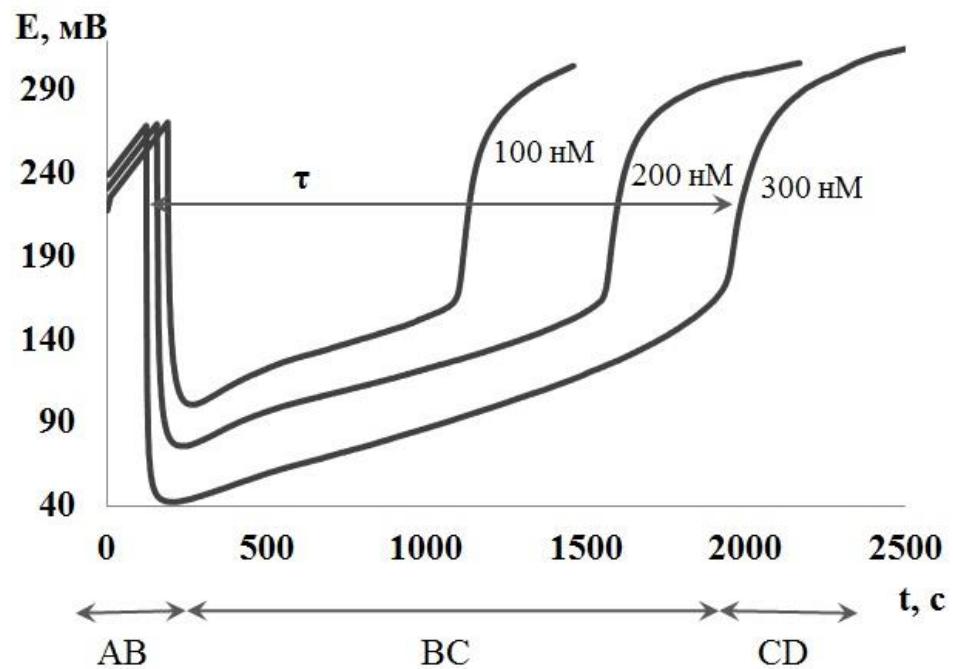


Рисунок 4.16 - Кинетическая кривая изменения потенциала при добавлении к 0,1М ААРН 100, 200 и 300 нМ аскорбиновой кислоты

4.2.1 Исследование закономерности изменения окислительно-восстановительного потенциала в процессах генерирования радикалов и ингибирования их антиоксидантами

Все исследования антирадикальной емкости антиоксидантов проводили в фосфатном буферном растворе рН 7.4 при температуре 37°C. Условия эксперимента подобраны наиболее близко к физиологическим.

На рисунке 4.7 представлены типичные кинетические кривые изменения потенциала в интегральной форме, зарегистрированные в растворе 0.1 М ААРН (1) и при введении аскорбиновой кислоты ($C_{AK} = 0.2$ мМ) в раствор ААРН (2) (t_1 – момент введения аскорбиновой кислоты в раствор ААРН, t_2 – момент полного расходования аскорбиновой кислоты). Из рисунка 4.17 видно, что определение момента полного расходования антиоксиданта соответствует точке перегиба кривой t_2 , которую по интегральной кривой зависимости потенциала от времени достаточно сложно определить с высокой точностью. Для этого нами предложено использовать момент максимальной скорости изменения потенциала $(dE/dt)_{max}$, являющегося максимумом производной функции зависимости потенциала от времени при введении антиоксиданта в раствор ААРН. На рисунке 4.18 приведены производные зависимости потенциала от времени, полученные при 0.1 М ААРН (1) и при введении аскорбиновой кислоты ($C_{AK} = 0.2$ мМ) в раствор ААРН (2) (t_1 – момент введения аскорбиновой кислоты в раствор ААРН, t_2 – момент полного расходования аскорбиновой кислоты).

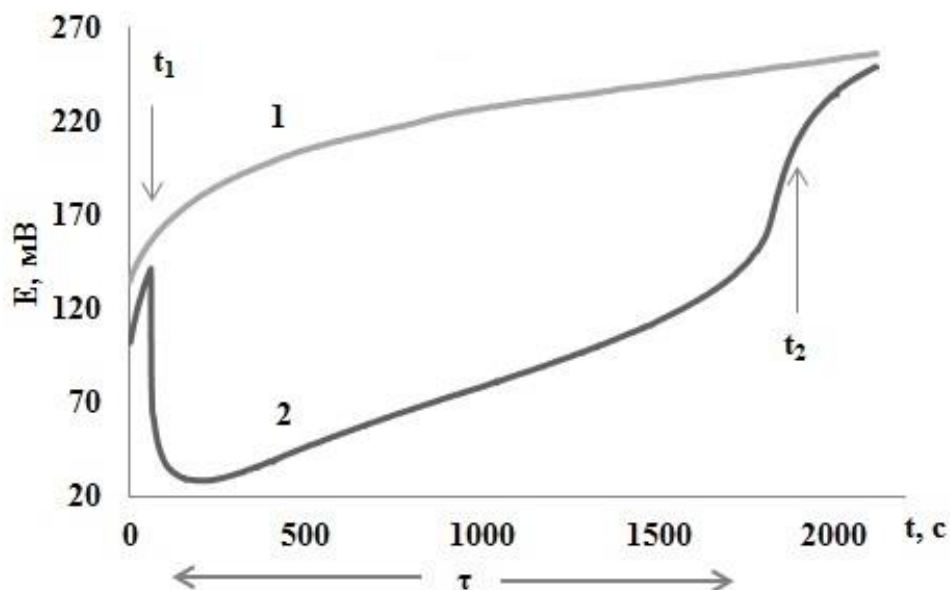


Рисунок 4.17 - Кинетическая кривая изменения потенциала от времени при добавлении к 0.1М ААРН аскорбиновой кислоты ($C_{AK} = 0.2\text{мМ}$). t_1 – введение аскорбиновой кислоты в раствор ААРН, t_2 – момент полного расходования аскорбиновой кислоты, 1 – 0.1 М ААРН, 2 – введение 0.2 мМ аскорбиновой кислоты в раствор ААРН

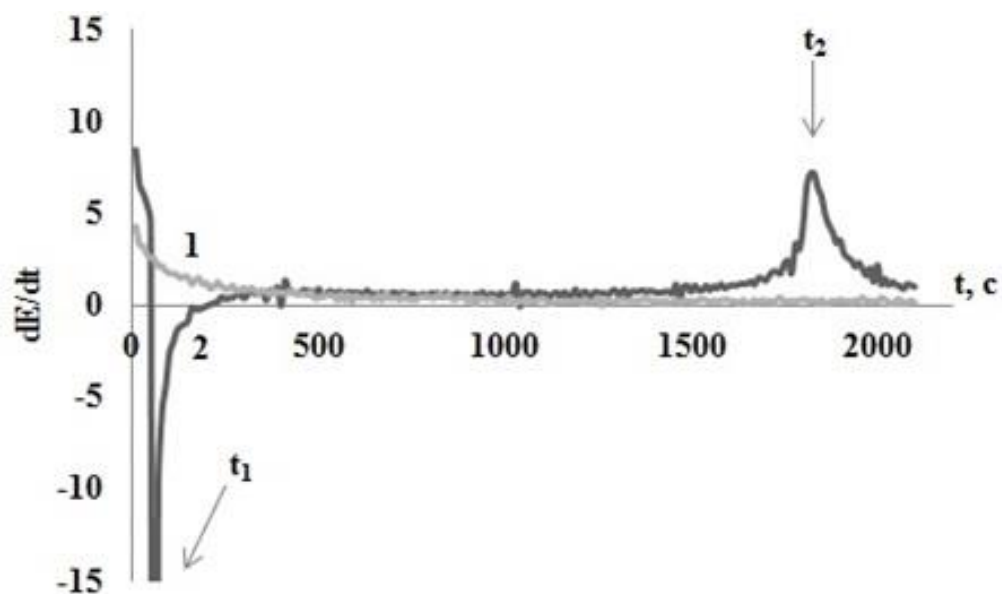
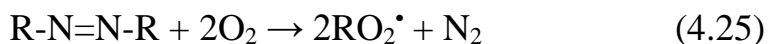


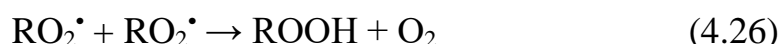
Рисунок 4.18 - Производная зависимости потенциала от времени при введении к 0.1М ААРН аскорбиновой кислоты ($C_{AK} = 0.2\text{мМ}$). t_1 – введение аскорбиновой кислоты в раствор ААРН, t_2 – момент полного расходования аскорбиновой кислоты, 1 – 0.1 М ААРН, 2 – введение 0.2 мМ аскорбиновой кислоты в раствор ААРН

Ключевыми стадиями свободнорадикального окисления являются инициирование радикалов и ингибирование их антиоксидантами.

На рисунке 4.17 до точки t_1 наблюдается рост потенциала за счет генерирования пероксильных радикалов в системе:

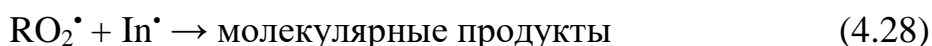


В случае отсутствия продолжения цепей, а также отсутствия ингибиторов гибель радикалов происходит за счет квадратичного обрыва цепи по реакции [348]:



В данном случае вид кривых на рисунках 4.17 и 4.18 говорит об отсутствии иных механизмов тушения свободных радикалов, за исключением ингибирования радикальной реакции антиоксидантами.

Введение в электрохимическую ячейку ингибиторов (аскорбиновая кислота, фенолы, амины, тиольные соединения) (InH) радикальных реакций (точка t_1 , рисунок 4.17) сопровождается снижением потенциала системы в результате реакции ингибиторов с пероксильными радикалами по реакциям (4.27 – 4.29):



При наличии в системе антиоксидантов потенциал остается неизменным или незначительно увеличивается. Завершение периода индукции, то есть времени полного расходования антиоксиданта в реакционной смеси, сопровождается резким повышением потенциала (точка t_2 на рисунке 4.17).

Период индукции может быть определен из кинетической кривой в точке перегиба (т. t_2 на рисунке 4.17), как принято в классических методах [334, 353]. В данной работе предлагается определять период индукции как время от введения антиоксиданта в раствор инициатора до точки, соответствующей максимальной скорости изменения потенциала $(dE/dt)_{\max}$ (точка t_2 на рисунке 4.18).

Антирадикальная емкость рассчитывается по формуле:

$$APE = f[InH] = k_i \cdot [AAPH] \cdot \tau, \quad (4.30)$$

где APE – антирадикальная емкость, М-экв;

τ – период индукции, с; [InH] – концентрация антиоксиданта, М;

k_i – константа скорости генерирования пероксильных радикалов, с⁻¹;

[AAPH] – концентрация инициатора радикалов, М;

f - коэффициента ингибирования, который показывает, сколько обрывов радикальных цепей приходится на одну молекулу ингибитора.

В данном случае под антирадикальной емкостью подразумевается эффективная эквивалентная концентрация антиоксидантов, вступивших в реакцию с радикалами.

4.2.2 Исследование и выбор условий для определения APE

Для регистрации сигнала использовали платиновый рабочий электрод и хлорид-серебряный электрод сравнения. Выбор платинового электрода обусловлен его широким диапазоном измеряемых потенциалов (от -0.1 В до +0.9 В) и чувствительностью к протекаемым при анализе окислительно-восстановительным реакциям. Среди твердых электродов также рассматривались в качестве индикаторного золотой и стеклоуглеродный электроды. Золотые электроды имеют достаточно ограниченную область измеряемых потенциалов (от -1В до +0,3В), поэтому не использовались в данной работе. Стеклоуглеродный электрод дает менее выраженный аналитический сигнал и, как следствие, менее выраженную точку перегиба при определении периода индукции (Рисунок 4.19 и 4.20).

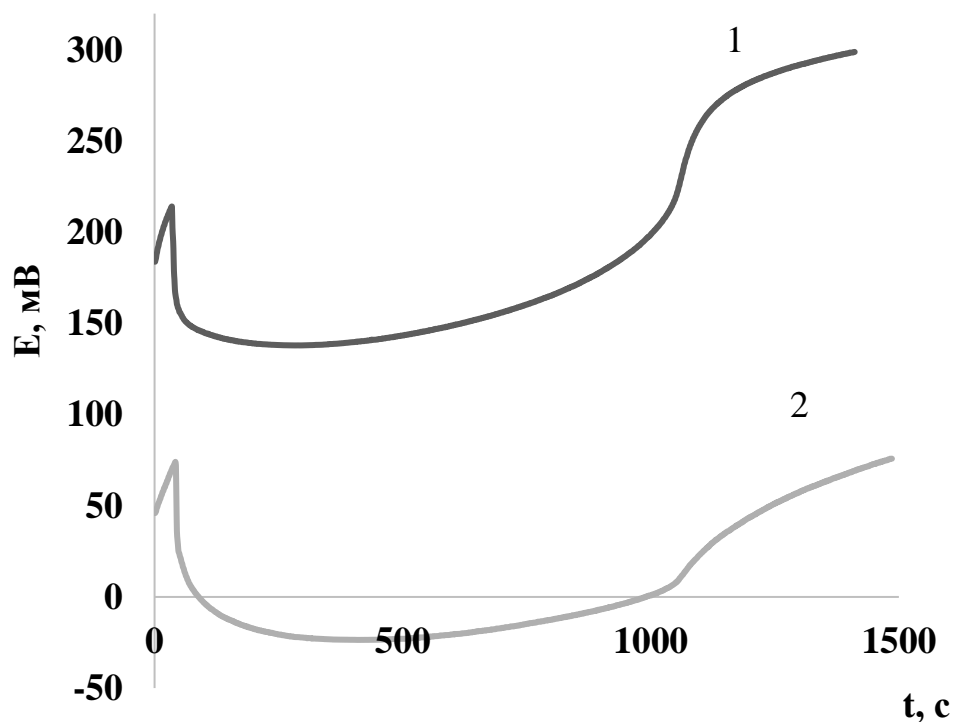


Рисунок 4.19 – Кинетические кривые изменения потенциала от времени при введении в 0.1 М ААРН аскорбиновую кислоту ($C_{\text{АК}} = 0.2 \text{ мМ}$). 1 – Платиновый электрод, 2 – Стеклоуглеродный электрод

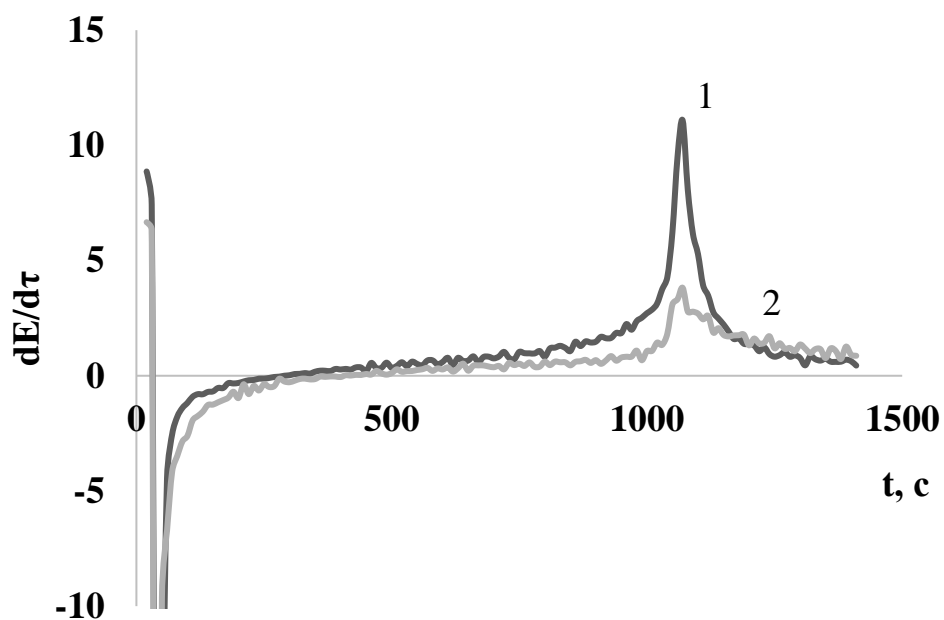


Рисунок 4.20 – Производная зависимости потенциала от времени при введении в 0.1 М ААРН аскорбиновую кислоту ($C_{\text{АК}} = 0.2 \text{ мМ}$). 1 – Платиновый электрод, 2 – Стеклоуглеродный электрод

С целью исключения влияния ионной силы (I) и буферной емкости (B) на результаты определения АРЕ были проведены исследования по выбору фосфатного буфера ($pH=7.4$) с разной суммарной концентрацией солей NaH_2PO_4 и K_2HPO_4 (Таблица 3.9).

На рисунке 4.21 и 4.22 представлены кинетические кривые в интегральной и дифференциальной формах при введении аскорбиновой кислоты ($C_{AK} = 0.1$ мМ) в раствор ААРН ($C_{AAPH} = 0.1$ М) при разных суммарных концентрациях солей NaH_2PO_4 и K_2HPO_4 фосфатного буфера.

Значения АРЕ аскорбиновой кислоты ($C_{AK} = 0.1$ мМ) при разных суммарных концентрациях солей NaH_2PO_4 и K_2HPO_4 фосфатного буфера представлены в таблице 4.7.

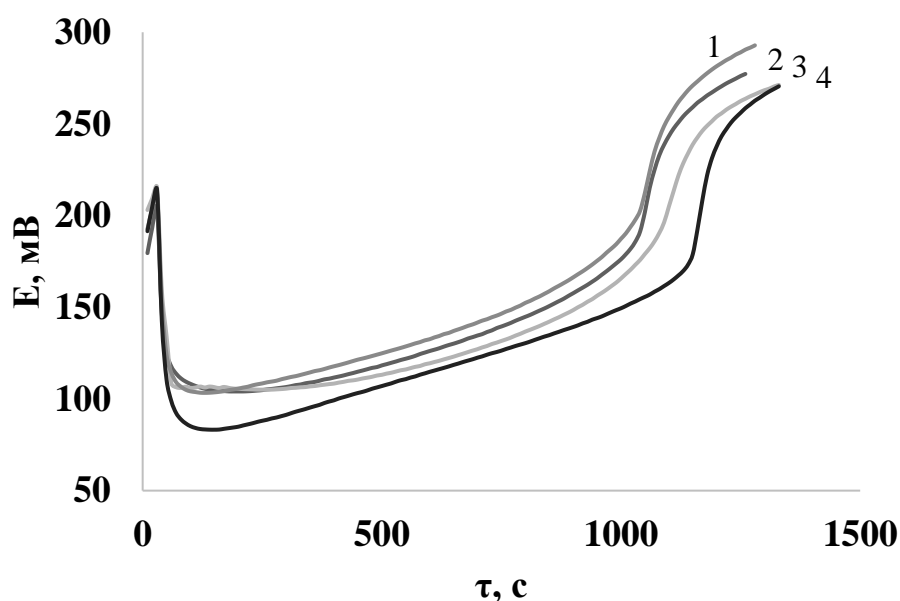


Рисунок 4.21 - Кинетические кривые изменения потенциала от времени при добавлении к 0.1М ААРН аскорбиновой кислоты ($C_{AK} = 0.1$ мМ) при разных суммарных концентрациях солей NaH_2PO_4 и K_2HPO_4 фосфатного буфера. 1 – 0.014 М, 2 – 0.027 М, 3 – 0.067 М, 4 – 0.135 М

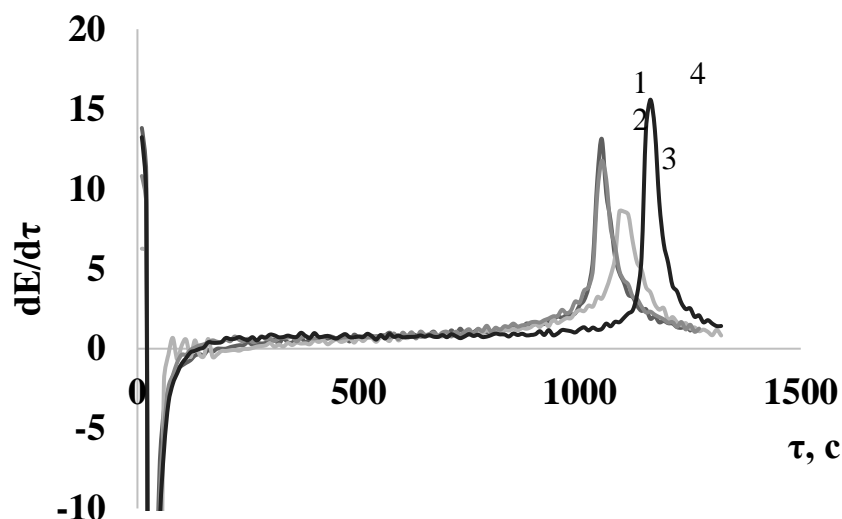


Рисунок 4.22 - Производные зависимости потенциала от времени при введении к 0.1М ААРН аскорбиновой кислоты ($C_{\text{АК}} = 0.1 \text{ мМ}$) при разных суммарных концентрациях солей NaH_2PO_4 и K_2HPO_4 фосфатного буфера. 1 – 0.014 М, 2 – 0.027 М, 3 – 0.067 М, 4 – 0.135 М

Таблица 4.7 – АРЕ аскорбиновой кислоты ($C_{\text{АК}} = 0.1 \text{ мМ}$) при разных суммарных концентрациях солей NaH_2PO_4 и K_2HPO_4 фосфатного буфера ($C_{\text{ААРН}} = 0.1$, pH 7.4, 37°C, n = 5, P = 0.95)

№ п/п	$\Sigma C_{\text{соли}}, \text{ М}$	АРЕ, 10^{-4} моль-экв/дм ³	S_r
1	0.014	2.11 ± 0.01	0.05
2	0.027	2.10 ± 0.01	0.04
3	0.067	2.12 ± 0.01	0.05
4	0.135	2.51 ± 0.01	0.03

По данным таблицы 4.7 можно сделать вывод, что в диапазоне суммарной концентрации солей NaH_2PO_4 и K_2HPO_4 от 0.014 до 0.067 влияние ионной силы на результаты измерений не обнаружено. На основании этих исследований выбран буферный раствор с суммарной концентрацией солей 0.067 М (ионная сила 0.120, буферная емкость 0.031 М), как рекомендовано для аналитических измерений.

Таким образом, для исследования антирадикальной емкости, аналогично как и для антиоксидантной емкости, использован метод постоянной ионной силы, где в качестве электролита используется буферный раствор с высокой буферной емкостью. Принимая во внимание, что объекты исследования не относятся к сильным электролитам и их концентрации в растворе не превышают 0.5 мМ, соответственно при диссоциации дают в раствор несоизмеримо малые концентрации анионов и протонов. Тем самым в процессе проведения эксперимента в выбранных условиях ионная сила и рН остаются постоянными.

4.2.3 Определение периода индукции

Для подтверждения правильности определения периода индукции с использованием метода дифференцирования функции зависимости потенциала от времени, проводили определение остаточной концентрации антиоксиданта в течение всего периода индукции.

В ходе взаимодействия антиоксиданта с радикалами ААРН отбирали аликвоту через определенные промежутки времени и анализировали раствор при помощи потенциометрической методики с использованием системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ в качестве модели окислителя [315, 354].

Скорость генерирования пероксильных радикалов является кинетическим параметром, зависящим от температуры эксперимента. При 37°C скорость генерирования пероксильных радикалов составляет $W_i(37) = 2 \cdot 10^{-7} \text{ M/c}^{-1}$. При переносе аликвоты из реакционной массы в систему $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ температура понижается до 25°C, скорость генерирования радикалов снижается до величины $W_i(25) = 5 \cdot 10^{-8} \text{ M/c}^{-1}$.

При приближении к завершению периода индукции в условиях снижения остаточной концентрации антиоксиданта, вклад реакции рекомбинации радикалов увеличивается. В этой ситуации вкладом реакции образующихся радикалов с восстановленной формой реагента можно пренебречь и принять,

что изменение потенциала обусловлено только увеличением концентрации восстановленной формы реагента, возникающей в реакции с антиоксидантом.

На рисунке 4.23 приведены зависимости потенциала системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$, зарегистрированные при разном времени взаимодействия ААРН с аскорбиновой кислотой (время от введения в радикал-генерирующую систему аскорбиновой кислоты до отбора аликвоты реакционной смеси). На кривых 5 – 29 минут (Рисунок 4.23) наблюдается падение потенциала за счет взаимодействия антиоксидантов с $K_3[Fe(CN)_6]$ и образования эквивалентного количества $K_4[Fe(CN)_6]$. При полном расходовании антиоксидантов в системе, которое определено нами как отсутствие минимума на кинетической кривой изменения потенциала системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (Рисунок 4.23, 30 мин), наблюдается рост потенциала за счет взаимодействия генерируемых радикалов с $K_4[Fe(CN)_6]$.

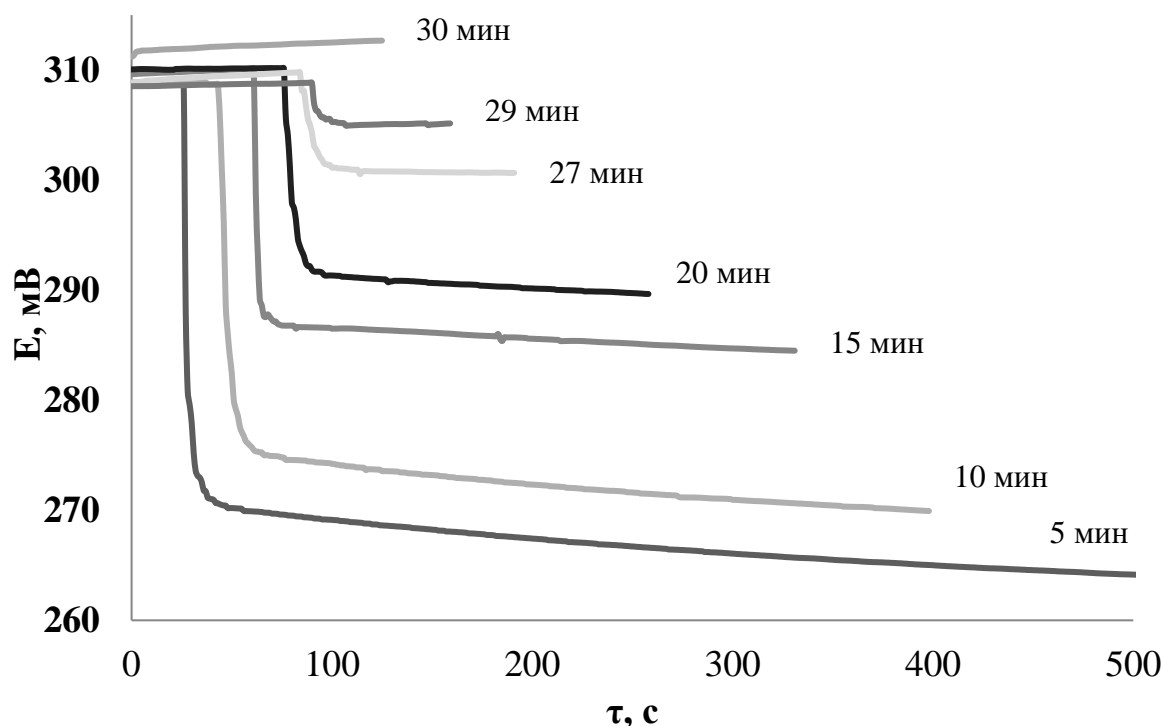


Рисунок 4.23 - Кинетическая кривая изменения потенциала системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$, зарегистрированные при различном времени взаимодействия 0.1 М ААРН с 0.2 мМ аскорбиновой кислотой в PBS (pH=7,4) при 37°C

На рисунке 4.24 приведена зависимость остаточной концентрации аскорбиновой кислоты от времени взаимодействия с ААРН, полученная при приближении к завершению периода индукции.

Согласно предложенному подходу по графику производной (Рисунок 4.18), период индукции, определенный по максимальной скорости изменения потенциала, составил 29.1 минут. Найденный методом экстраполяции период индукции (Рисунок 4.24) составил 29.4 минуты.

В таблице 4.8 представлены результаты определения периода индукции, полученные из производной зависимости потенциала от времени (τ^*) и найденные экстраполяцией зависимости остаточной концентрации аскорбиновой кислоты и цистеина от времени взаимодействия (τ^{**}).

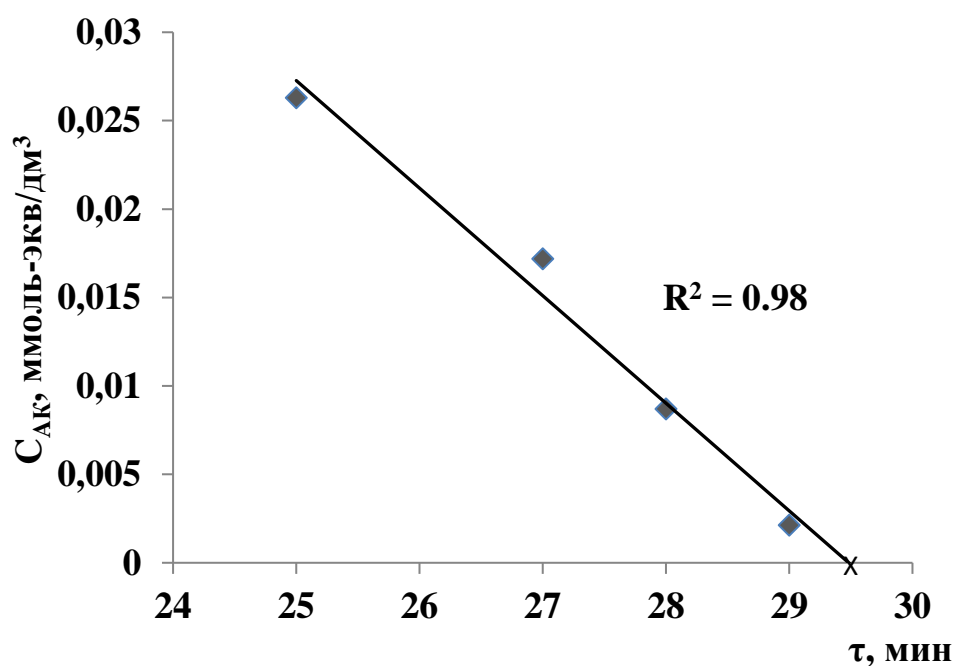


Рисунок 4.24 - Зависимость остаточной концентрации аскорбиновой кислоты ($C_{исх.}=0.2$ ммоль-экв/дм³) от времени взаимодействия с 0.1М ААРН

Таблица 4.8 - Результаты определения периода индукции аскорбиновой кислоты и цистеина при разных концентрациях (n=5, P=0.95)

Антиоксиданты	C, mM	τ^* , мин	S_r	τ^{**} , мин	S_r
Аскорбиновая кислота	0.1	14.9±0.3	0.02	15.3±0.5	0.03
	0.2	29.1±0.8	0.03	29.4±0.9	0.03
Цистеин	0.1	11.5±0.3	0.03	11.1±0.3	0.03
	0.2	18.2±0.4	0.02	17.7±0.4	0.02

Статистически значимых различий между полученными значениями не выявлено. Таким образом, анализ данных таблицы 4.8 показывает, что определение периода индукции по точке максимальной скорости изменения потенциала $(dE/dt)_{\max}$ является обоснованным.

4.2.4 Определение APE модельных антиоксидантов

На рисунке 4.25 приведены кинетические кривые изменения потенциала при добавлении к 0.1 М ААРН цистеина в разных концентрациях, на рисунке 4.26 приведены производные зависимости потенциала от времени.

Результаты определения коэффициентов ингибирования (f), периодов индукции (τ) и антирадикальной емкости аскорбиновой кислоты и цистеина в разных концентрациях приведены в таблице 4.9.

Коэффициент ингибирования уменьшается с ростом концентрации, что согласуется с литературными данными, полученными при использовании методов регистрации, основанных на других физико-химических принципах [333, 355].

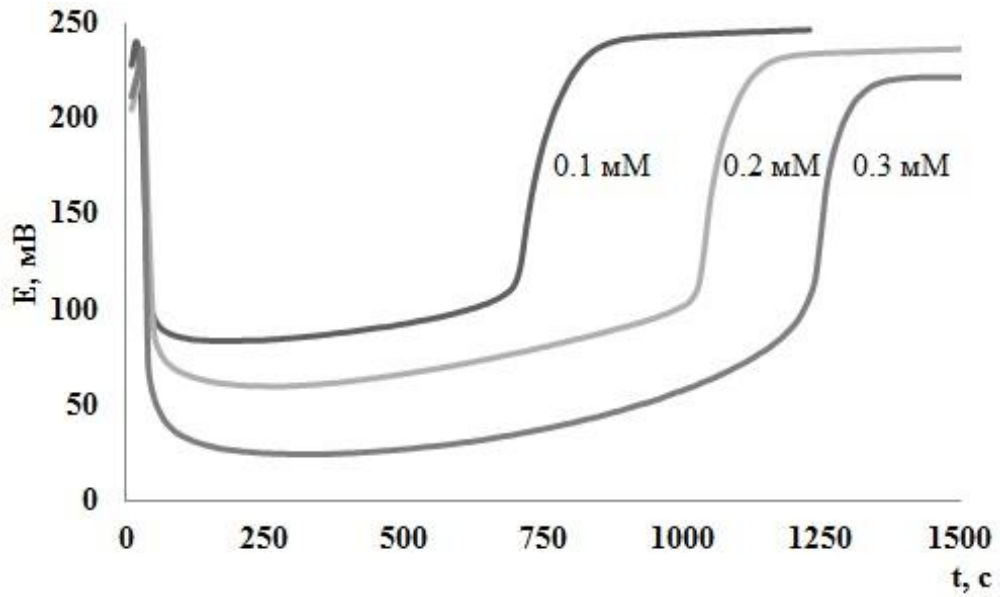


Рисунок 4.25 - Кинетические кривые изменения потенциала при добавлении к 0.1М ААРН цистеина в разных концентрациях

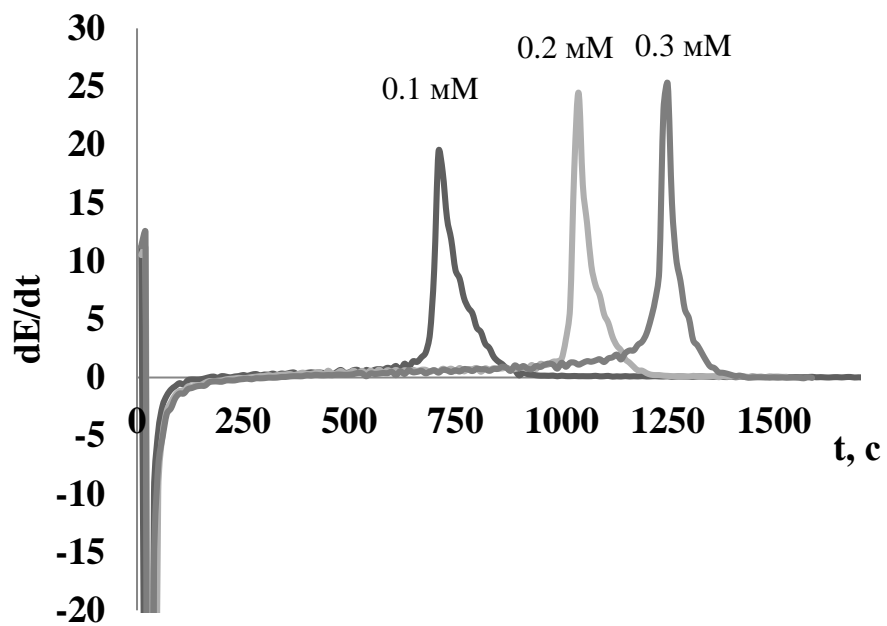
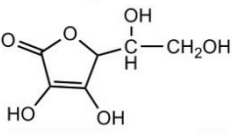
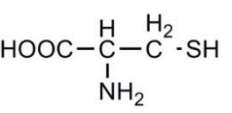


Рисунок 4.26 - Производные зависимости потенциала от времени при добавлении к 0.1М ААРН цистеина в разных концентрациях

Таблица 4.9 – Антирадикальная емкость, период индукции и коэффициент ингибирования аскорбиновой кислоты и цистеина ($C_{AAPH}=0.1M$; $n=5$, $P=0.95$)

Антиоксидант	Структурная формула	C , ммоль/дм ³	АРЕ, ммоль- экв/дм ³	τ , мин	f	S_r
Аскорбиновая кислота		0.1	0.22±0.01	18.2	2.2	0.05
		0.2	0.36±0.04	30.2	1.8	0.01
		0.3	0.44±0.02	34.5	1.5	0.04
		0.4	0.52±0.05	42.8	1.3	0.01
Цистеин		0.1	0.13±0.01	11.5	1.3	0.01
		0.2	0.20±0.01	18.1	1.0	0.05
		0.3	0.23±0.04	20.0	0.8	0.02
		0.4	0.32±0.03	27.2	0.7	0.01

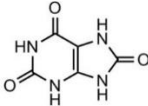
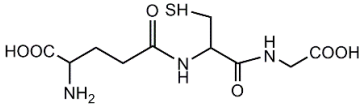
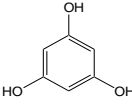
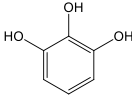
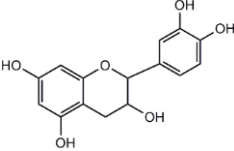

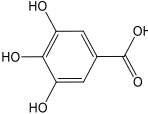

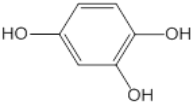
Исследованы модельные растворы антиоксидантов, содержащих -ОН, -NH, -SH функциональные группы. Результаты приведены в таблице 4.10.

Коэффициенты ингибирования изученных антиоксидантов принимают значения от 1 до 4, что связано как с их строением, т.е. с количеством активных групп в молекуле антиоксиданта, так и с механизмом обрыва цепей на молекуле антиоксиданта.

В случае исследования многокомпонентных объектов антирадикальная емкость представляет собой суммарное содержание антиоксидантов, т.е.

$$APE = \sum_i f_i \cdot [InH]_i \quad (4.31)$$

Таблица 4.10 – Антирадикальная емкость, период индукции и коэффициент ингибирования модельных растворов антиоксидантов ($C_{\text{ААРН}}=0.1\text{М}$, $C_{\text{АО}}=10^{-4}\text{М}$; $n=5$, $P=0.95$)

Антиоксидант	Структурная формула	τ , мин	f	АРЕ, 10^{-4} моль- экв/дм ³	S_r
Мочевая кислота		26.2	3.1	3.1 ± 0.2	0.05
Глутатион		10.8	1.3	1.31 ± 0.03	0.02
Флороглюцин		17.7	2.1	2.1 ± 0.1	0.07
Пирогаллол		27.8	3.2	3.2 ± 0.2	0.05
Катехин		35.6	4.2	4.23 ± 0.08	0.02
Кверцетин		24.2	2.9	2.85 ± 0.06	0.02
Галловая кислота		13.0	4.1	4.1 ± 0.2	0.05
Гидрохинон		31.8	3.8	3.75 ± 0.04	0.01
Оксигидрохинон		7.2	0.9	0.85 ± 0.03	0.03

4.2.5 Оценка предела обнаружения АРЕ

На рисунке 4.27 приведена зависимость относительного стандартного отклонения от величины антирадикальной емкости при разных концентрациях аскорбиновой кислоты. Согласно критерию 3σ , предел обнаружения в водных растворах (на примере аскорбиновой кислоты) составил $6.20 \cdot 10^{-6}$ М - экв ($n = 5$, $P = 0.95$).

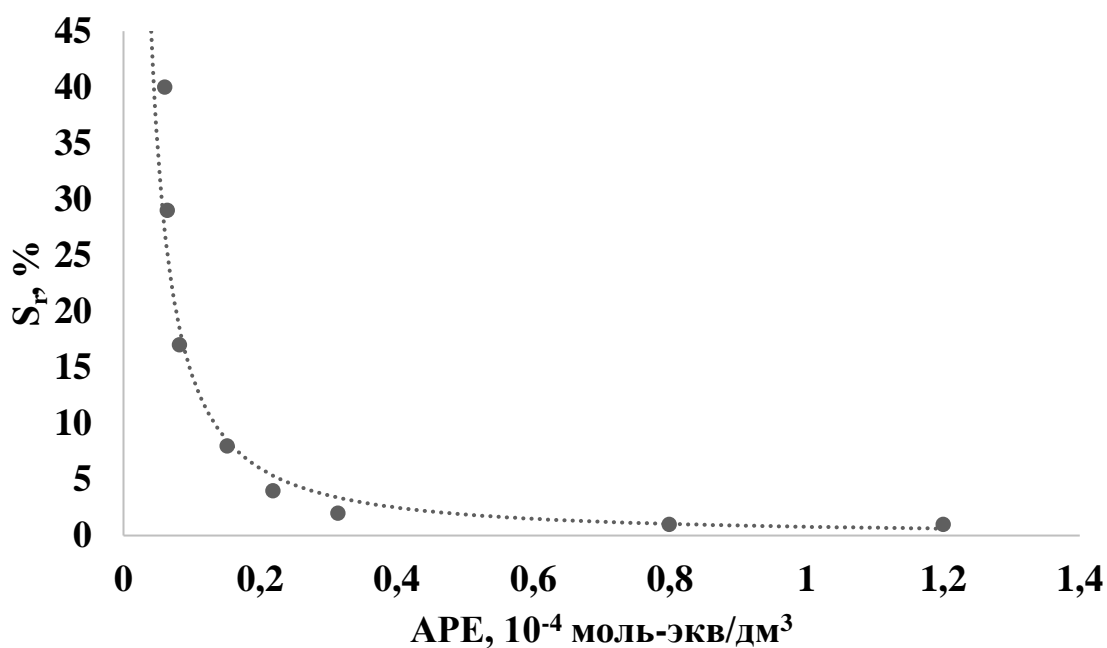


Рисунок 4.27 - Зависимость S_r от АРЕ при разных концентрациях аскорбиновой кислоты ($n = 5$, $p = 0.95$)

Таким образом, в данной работе впервые изучена зависимость изменения окислительно-восстановительного потенциала системы при протекании реакций генерирования пероксильных радикалов и ингибирования их антиоксидантами. Закономерное изменение потенциала связано с переносом атомов водорода (которое в водной среде можно рассматривать как перенос электрона, сопровождающийся переносом протона) с молекулы антиоксиданта на молекулу радикала в процессе ингибирования антиоксидантом пероксильных радикалов, инициируемых ААРН. На основе изучения этих

зависимостей предложена оригинальная прямая методика прямого безреагентного определения антирадикальной емкости.

Предложенный новый подход позволяет определять как кинетические характеристики, такие как период индукции, так и термодинамические характеристики, а именно APE и коэффициент ингибирования индивидуальных антиоксидантов.

Методики являются достаточно информативными, простыми в исполнении, не требуют дорогостоящего оборудования и реактивов, позволяют проводить исследования разных по составу проб, получать воспроизводимые результаты.

ГЛАВА 5 ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ И АНТИРАДИКАЛЬНОЙ ЕМКОСТИ РЕАЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ

5.1 Определение АОЕ природных окси- и бензо- производных кумаринов

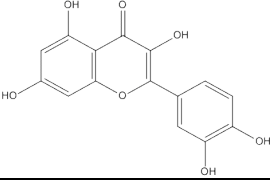
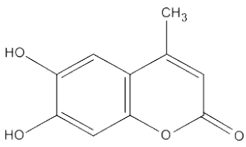
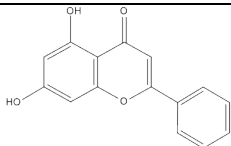
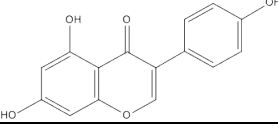
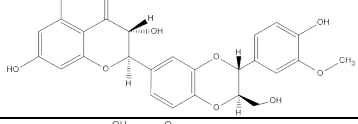
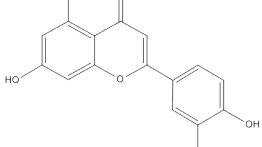
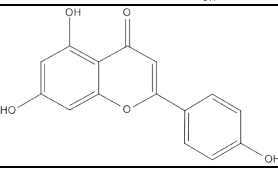
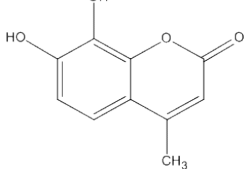
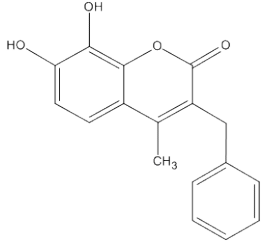
Кумарины широко распространены в растительном мире. Они обнаружены в более, чем в 200 видах высших и низших растений из 34 семейств. Наиболее богаты кумаринами растения семейств *Ariaceae*, *Fabaceae*, *Rutaceae*, *Asteraceae*, *Saxifragaceae*, *Hypocastanaceae* и др. Некоторые кумарины встречаются в продуктах животного происхождения (желчь бобра, сельди и другие). Биологическая роль кумаринов для растений пока еще до конца не выяснена. Предполагают, что кумарины:

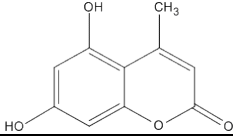
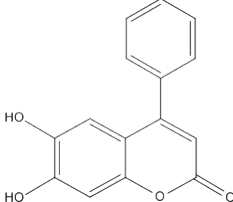
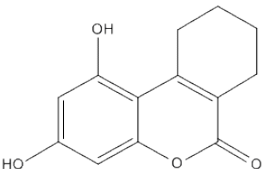
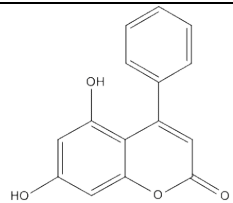
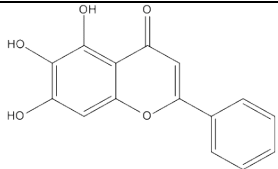
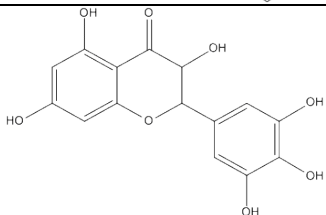
- являются регуляторами роста (в больших концентрациях угнетают рост растений, в малых - стимулируют рост);
- выступают в роли защитных веществ против заболеваний и вредителей растений;
- предохраняют молодые органы растения от избыточного действия ультрафиолетовых лучей.

Предполагают, что наличие данных видов биологической активности этих соединений связано с их способностью взаимодействовать с АКМ подобно кверцетину. Известно, что окси- и бензо- производные кумаринов обладают антиоксидантными свойствами и рассматриваются как перспективные нетоксичные антиоксиданты для применения в медицине [356].

В таблице 5.1 приведены данные по определению АОЕ природных окси- и бензо- производных кумаринов.

Таблица 5.1 - АОЕ, стехиометрические коэффициенты и период полупревращения окси- и бензо- производных кумаринов ($C=10^{-4}$ М)

№ п/п	Название	Структура	АОЕ, 10^{-4} моль-экв/дм ³	S_r	$\bar{n}_{\text{эксп}}$	$\tau_{1/2}$, с
1	2	3	4	5	6	7
1	Кверцетин		4.8 ± 0.2	0.05	4.8	19
2	4-Метилскулетин		3.25 ± 0.07	0.02	3.25	78
3	Хризин		0.21 ± 0.01	0.05	0.21	
4	Генистеин		0.22 ± 0.01	0.04	0.22	
5	Силубин		0.23 ± 0.01	0.01	0.23	
6	Лютеолин		2.3 ± 0.1	0.05	2.3	23
7	Апигенин		-	-	-	
8	4-Метил-7,8-дигидроксикумарин		3.54 ± 0.06	0.03	3.54	286
9	3-Бензил-7,8-дигидрокси-4-метил-2Н-хромен-2-он		2.5 ± 0.1	0.05	2.5	209

№ п/п	Название	Структура	АОЕ, 10 ⁻⁴ моль-экв/дм ³	S _r	$\bar{n}_{\text{эксп}}$	$\tau_{1/2}$, с
1	2	3	4	5	6	7
10	4-метил-5,7-дигидроксикумарин		0.98±0.05	0.05	0.98	1087
11	Нордалбергин		2.96±0.07	0.03	2.96	26
12	1,3-дигидрокси-7,8,9,10-тетрагидро-6H-бензо[с]хромен-6-он		1.20±0.05	0.04	1.20	745
13	Серратин		0.64±0.01	0.01	0.64	1658
14	Байкалеин		2.2±0.2	0.08	2.2	
15	Дигидромирицетин		3.42±0.06	0.02	3.42	10

$\bar{n}_{\text{эксп}}$ – стехиометрический коэффициент уравнения 3.15, рассчитанный по формуле 3.20.

Из данных, приведенных в таблице 5.1, можно сделать вывод, что наблюдается отчетливая тенденция зависимости величины АОЕ от структуры соединений. Различное положение ОН-групп (орто-положение групп относительно друг друга в молекулах 2,6,8,9,11,14,15 и мета-положение в молекулах 3,4,5,7,10,12,13) сопровождается различием их антиоксидантных

свойств. Данные характеристики говорят о затрудненном переносе электрона от функциональных ОН- групп молекул с мета-положением, что приводит к менее выраженному антиоксидантному действию или его отсутствию и согласуется с расчетными данными, описанными в литературе [357].

Представленные данные демонстрируют, что результаты в целом объективно отражают антиоксидантные свойства природных производных кумаринов, а предложенный подход может быть использован для изучения их АОЕ.

5.2 Интегральная оценка АОЕ пищевых продуктов

В условиях техногенного развития нашего общества, потребление качественных продуктов, которые являются основными источниками поступления АО в организм человека, приобретает все большее значение. К таким продуктам относятся продукты питания растительного происхождения: овощи, фрукты, соки на их основе, экстракты лекарственных трав, чай, биодобавки и т.д. [358]. Исследование антиоксидантных свойств этих объектов является очень актуальным, т.к. параметр АОЕ может рассматриваться как один из аспектов качества пищевых продуктов и БАВ [359].

В данном разделе диссертации представлены результаты потенциометрического определения АОЕ различных объектов. Проведение корреляционных исследований с применением разных методик, основанных на других физико-химических принципах, применяется для дополнительной характеристики новых разработанных методик [360], а также используется для подтверждения достоверности получаемых результатов. В качестве независимых методов исследования применяли спектроскопические способы оценки антиоксидантных свойств.

5.2.1 Определение АОЕ алкогольных продуктов

Известно, что вино, особенно красное, содержит довольно большое количество полифенольных соединений, которые и обеспечивают в основном его антиоксидантные свойства. Для оценки антиоксидантных свойств объектов, получаемых из растительного сырья, в частности вин, как правило, принято определять общее содержание полифенолов (ОСПФ) методом Фолина-Чокальтеу [361]. ОСПФ в образцах оценивают в пересчете на полифенольное соединение, характерное для исследуемого вида растительного материала. В данной модификации метода, для оценки антиоксидантных свойств вин, в качестве стандартного АО использовали (+)катехин.

В таблице 5.2 приведены результаты потенциометрического определения АОЕ вин в сравнении с общим содержанием полифенольных соединений.

На рисунке 5.1 представлены результаты сравнения определения антиоксидантной емкости потенциометрическим методом и общего содержания фенольных соединений в исследованных образцах вина. Коэффициент корреляции составил 0.97.

Значения АОЕ, измеренные потенциометрическим методом, коррелируют с антиоксидантной активностью, определенной методом RANDOX. На рисунке 5.2 представлены результаты потенциометрического определения АОЕ и RANDOX в 10 образцах вина. Коэффициент корреляции составляет 72% [320].

Для оценки достоверности получаемых результатов АОЕ дополнительно использовали метод «введено-найдено», как это принято для объектов со сложной матрицей, к которым относятся вина. В качестве добавки выбрана аскорбиновая кислота, а результаты ее определения представлены в таблице 5.3, из которой видно, что отклонения найденного методом «введено-найдено» значения содержания добавки не превышают 10 %.

Таблица 5.2 - Результаты потенциометрического определения АОЕ вин и общего содержания фенольных соединений (ОПФ) (n=6, p=0.95)

Объект исследования	№	Потенциометрия		Метод Фолина-Чокальтеу	
		АОЕ, ммоль экв./дм ³	S _r	мм (+)катехина	S _r
натуральные белые полусладкие вина	1	1.2	0.01	1.1	0.02
	2	1.6	0.05	1.0	0.02
	5	1.6	0.01	1.0	0.02
	6	1.9	0.01	0.8	0.01
	7	2.0	0.01	1.1	0.03
натуральные белые сухие вина	3	1.6	0.07	0.9	0.01
	4	1.6	0.05	1.2	0.02
	8	2.4	0.01	1.1	0.02
	9	2.8	0.04	1.3	0.01
	10	3.0	0.04	1.2	0.04
натуральные красные полусладкие вина	11	5.9	0.05	2.6	0.02
	12	12.3	0.03	6.1	0.01
	13	12.3	0.04	6.1	0.01
	14	17.6	0.04	5.7	0.02
натуральные красные сухие вина	15	14.1	0.02	8.1	0.01
	16	20.6	0.05	8.0	0.01
	17	23.9	0.05	8.7	0.01
	18	30.4	0.07	10.4	0.01
	19	32.0	0.01	10.9	0.01

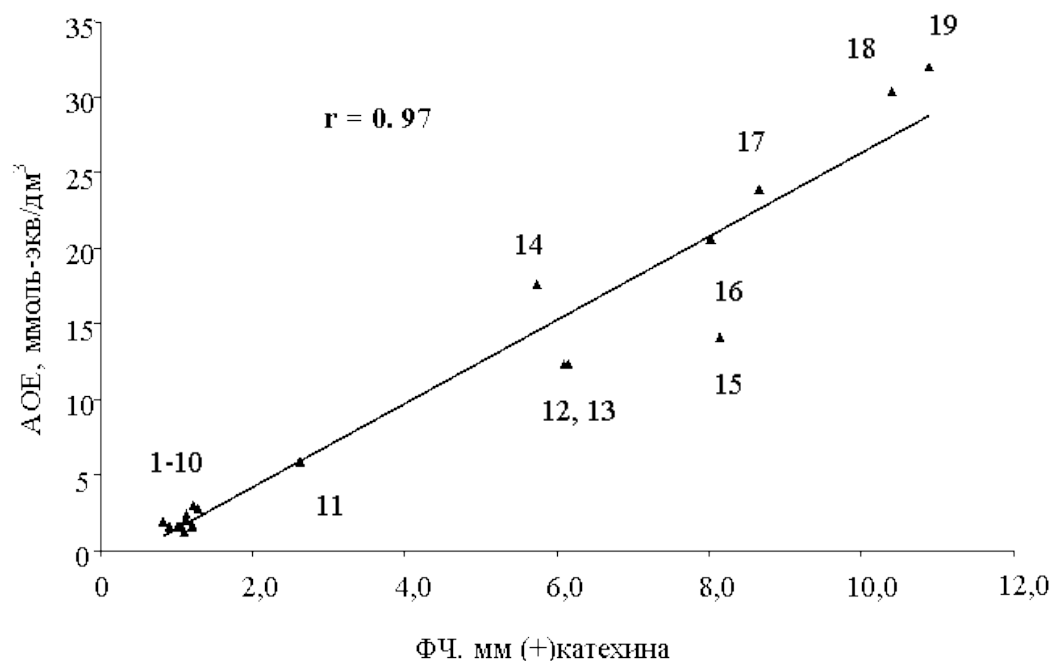


Рисунок 5.1 - Корреляция результатов интегрального параметра АОЕ и общего содержания полифенольных соединений в вине (Номера исследованных объектов соответствуют номеру в таблице 5.2) [318].

Полифенольный состав винных сортов винограда достаточно хорошо изучен и представляет собой широкий ряд фенольных соединений различных классов включая: флаванолы (гликозиды дигидрокверцетина и дигидрокэмферола), и антоцианины (дельфинидин, петунидин, мальвидин и др.), флавонолы (кверцетин), флаванолы ((+)-катехин, (-)-эпикатехин, (+)-галлокатехин, (-)-эпигаллокатехин), стильбены (ресвератрол) и др. [362]. В зависимости от сорта изготавливаемого вина используются различные части ягод, имеющие различный полифенольный состав [363, 364]. Особенности технологии приготовления вин отражаются и на их величине АОЕ. Существует достаточно большое количество работ, демонстрирующее более высокие значения интегрального показателя АОЕ, измеренного разными способами, для красных вин по сравнению с белыми [365, 366]. Результаты определения АОЕ 60 образцов алкогольных напитков, изготовленных из виноградного сырья приведены на рисунке 5.3. Для каждой группы напитков, в которой были

объединены образцы, изготовленные по аналогичной технологии, было определено среднее значение величины АОЕ. Исследованные в представленной работе спиртные напитки были объединены в группы в соответствии с особенностями технологии изготовления. Из данных, приведенных на рисунке 5.3 видно, что самыми высокими значениями показателя АОЕ обладают натуральные и специальные красные вина, а самыми низкими - винные напитки, что коррелирует с литературными данными о полифенольном составе исследованных групп алкогольных напитков [367], а также с особенностями технологии их изготовления (таблица 5.4).

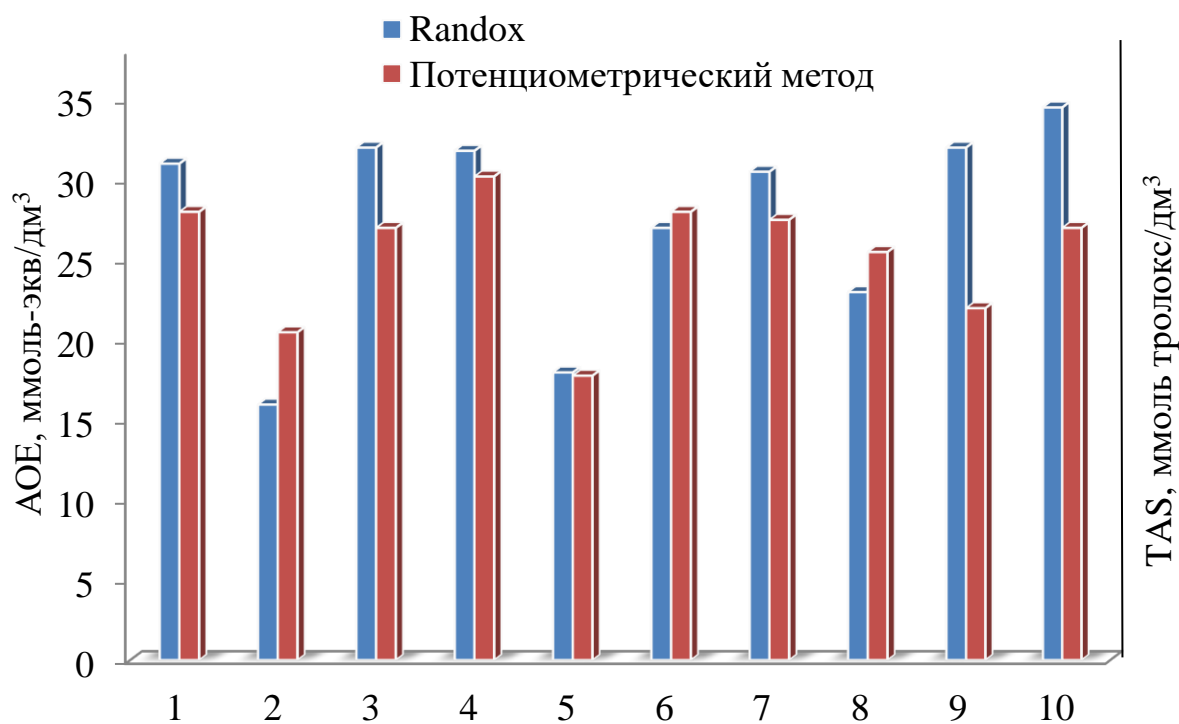


Рисунок 5.2 - АОЕ образцов вин, измеренная потенциометрическим методом и методом RANDOX.

Исследуемые образцы: (1) Uina Hermina, Rioja 2002, Испания; (2) Vin de Pays d'Ос Jean de Beauvais, Merlot 2002, Франция; (3) El Condor, Cabernet Sauvignon 2002, Чили; (4) Sunny Ridge, Cabernet Sauvignon 2002, ЮАР; (5) Pravova Valley, Sangiovese 1999, Special reserve, Румыния; (6) Trivento Bonarda 2003, Аргентина; (7) Oltina, La Revedere, Швеция; (8) Cabernet Sauvignon 2001, Болгария; (9) Merlot, Болгария; (10) Tsar Assen, Cabernet Sauvignon 2002, Болгария

Таблица 5.3 - Определение АОЕ некоторых вин методом «введено-найдено» (n=6, p=0,95)

Образец	АОЕ образца (C ₁), ммоль экв./дм ³	S _r	Введено АОЕ(C ₂), ммоль экв./дм ³	Найдено		Найдено (R),%*
				АОЕ (C ₃), ммоль экв./дм ³	S _r	
Вино натуральное красное полусладкое	12.7	0.05	10	21.6	0.05	90
Вино натуральное белое полусладкое	5.1	0.04	10	15.4	0.04	103
Напиток винный «Кизил на коньяке»	5.1	0.05	10	15.3	0.05	102

$$* R = \frac{C_3 - C_1}{C_2} \cdot 100$$

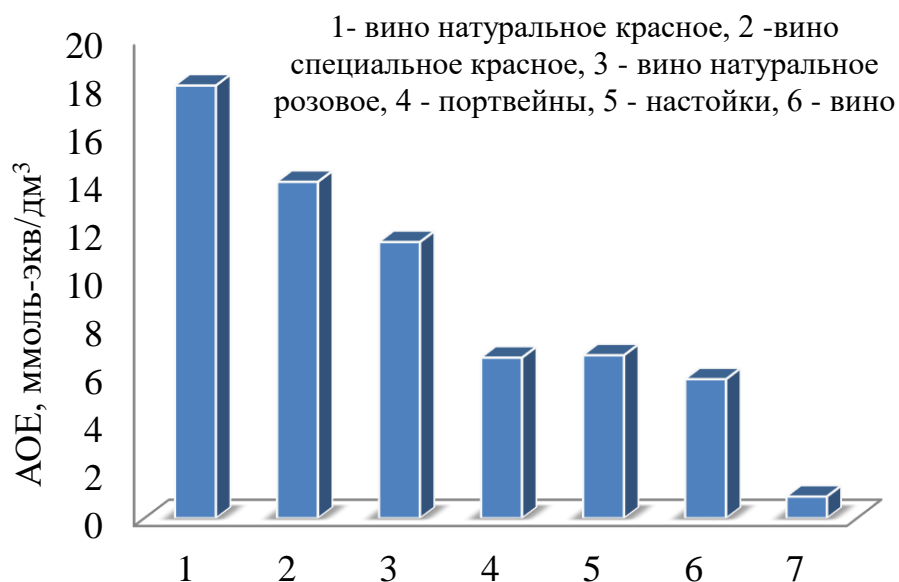


Рисунок 5.3 - АОЕ (ммоль-экв/дм³) различных групп алкогольных напитков, изготовленных на основе виноградного сырья (1- вино натуральное красное, 2 - вино специальное красное, 3 - вино натуральное розовое, 4 - портвейны, 5 - настойки, 6 - вино натуральное белое, 7 - винные напитки) [367]

Таблица 5.4 – Технология изготовления алкогольных напитков из виноградного сырья [368]

Группы напитков	Технология
Вино натуральное	Получают в результате сбраживания (полного или частичного) виноградного сусла и мезги
Вино специальное	Получают в результате неполного сбраживания виноградного сусла и мезги с добавлением спирта-ректификата и купажирования виноматериалов
Портвейн	Вид специального вина с содержанием спирта 17-20%, сахара 6-14% и характерными вкусовыми качествами
Настойки	Напитки, основу которых составляет спиртованный натуральный сок фруктов и ягод и их настои
Винные напитки	Получают из виноградных и плодовых виноматериалов с добавлением ректифицированного этилового спирта, коньячных, виноградных и плодовых спиртов, пищевых вкусо-ароматических добавок, пищевых красителей и др. компонентов согласно технологической инструкции

Получены результаты, подтверждающие возможность использования показателя АОЕ для установления подлинности виноградного вина. Применение потенциометрического метода для определения антиоксидантной емкости позволит проводить экспрессный отбор образцов виноградного вина для их дальнейшей идентификации.

На рисунке 5.4 представлены результаты исследования АОЕ образцов пива разных сортов. Исследования показали, что антиоксидантная емкость исследованных образцов в целом коррелирует с содержанием экстрактивных веществ в исходном сырье. Наименьшее значение АОЕ было найдено для безалкогольного пива, а наибольшее – в темных сортах пива. Полученные результаты согласуются с данными определения содержания восстанавливающих соединений в пиве с 2,6-дихлорфенол-индофенолятом На методом вольтамперометрии [369], приведенными в таблице 5.5, где наиболее высокий уровень был отмечен при исследовании темного пива, а самый низкий – в сортах, подвергавшихся дезалкоголизации.



Рисунок 5.4 - Антиоксидантная емкость разных образцов пива, содержание экстрактивных веществ в сусле

Таблица 5.5 - Содержание редуцирующих веществ в разных образцах пива [369]

Образец пива	Содержание редуцирующих веществ, экв. аскорбиновой кислоты
Темное	2.50 – 3.56
Безалкогольное	1.14 – 1.66
Pilsener	1.57 – 2.01

5.2.2 Определение АОЕ фруктов и овощей

Фрукты и овощи содержат большое количество разнообразных веществ, способных выступать в качестве антиоксидантов и являются основным источником поступления этих веществ в организм человека. В таблице 5.6 представлены данные о составе некоторых продуктов питания с точки зрения возможного проявления их биологической активности, в том числе антиокислительной за счет содержания в них полифенольных соединений.

Таблица 5.6 - Полифенольные соединения, содержащиеся в некоторых овощах и фруктах [370]

Объект исследования	Полифенольные антиоксиданты
Виноград	Гликозиды дигидрокверцетина и дигидрокемферола, ресвератрол, (+)катехин, (-)эпикатехин, гликозиды мальвидина
Цитрусовые	Феруловая кислота, нарингинин, нарингин, эриодиктиол, изосакуранетин, гесперетин,
Яблоки	Хлорогеновая кислота, (-)эпикатехин, процианидин В2, гиперин, цианидин-3-галактозид
Абрикосы, сливы, персики	Гликозиды кемферола и кверцитина, рутин, хлорогеновая кислота
Томаты	Кумаровая кислота, нарингинин, прунин, хальконарингинин
Вишня	3-Рутиназид и 3-глюкозид цианидина, пеонидин, кумароилхиновые кислоты, хлорогеновая кислота, кафеоилтартаровая кислота
Груша	Хлорогеновая кислота, (-)эпикатехин, гликозиды кверцитина и изорамнетин
Ягоды	Кумаровая, кофейная, феруловая кислоты, мирицетин, кверцитин, кемферол
Оливки	Кумаровая, сириговая и ванилиновая кислоты, тирозол, гидрокситирозол, лигстрозид и вербаскозид

Употребление овощей, фруктов, а также приготовленных из них соков, способно снизить риск развития болезней, связанных с дисбалансом прооксидантов и антиоксидантов в организме [371]. Этим объясняется интерес как к составу веществ, обеспечивающих антиоксидантные свойства, так и к

определению интегрального показателя антиоксидантной емкости этих объектов [372, 373].

АОЕ соков, приготовленных из ягод представлена на рисунке 5.5 [374].

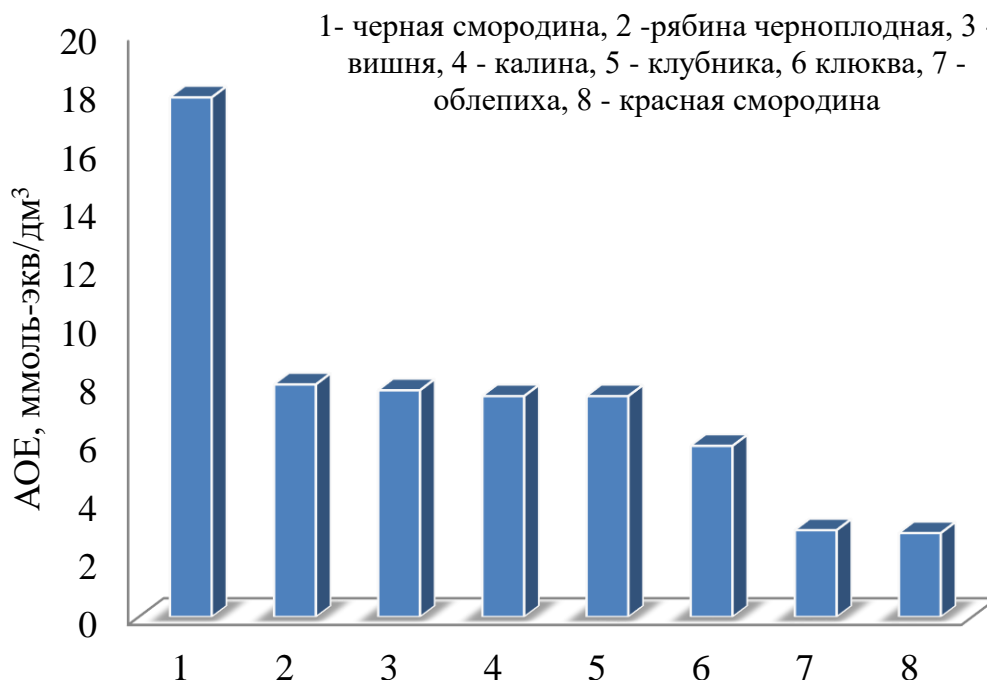


Рисунок 5.5 - Антиоксидантная емкость соков, приготовленных из ягод

АОЕ исследованных свежеприготовленных соков ягод варьировалась от 3 до 18 ммоль экв./дм³. Наибольшее значение АОЕ наблюдалось в свежавыжатом соке черной смородины, а наименьшее в соке красной смородины, что достаточно хорошо согласуется с литературными данными о содержании полифенольных АО этой группы объектов.

На рисунке 5.6 представлены результаты определения интегрального параметра АОЕ соков, приготовленных из свежих фруктов [374].

На рисунке 5.7 представлены результаты определения интегрального параметра АОЕ в соках и сокосодержащих напитках промышленного изготовления [374]. Стоит отметить, что в целом антиоксидантная емкость соков промышленного изготовления несколько ниже, чем выжатых соков, приготовленных из свежих фруктов и ягод и варьируется от 0.8 до 8.0 ммоль экв./дм³. Это может быть связано как с качеством начального сырья, так и

технологией промышленного изготовления соков (например, одновременное воздействие высоким давлением или повышением температуры).

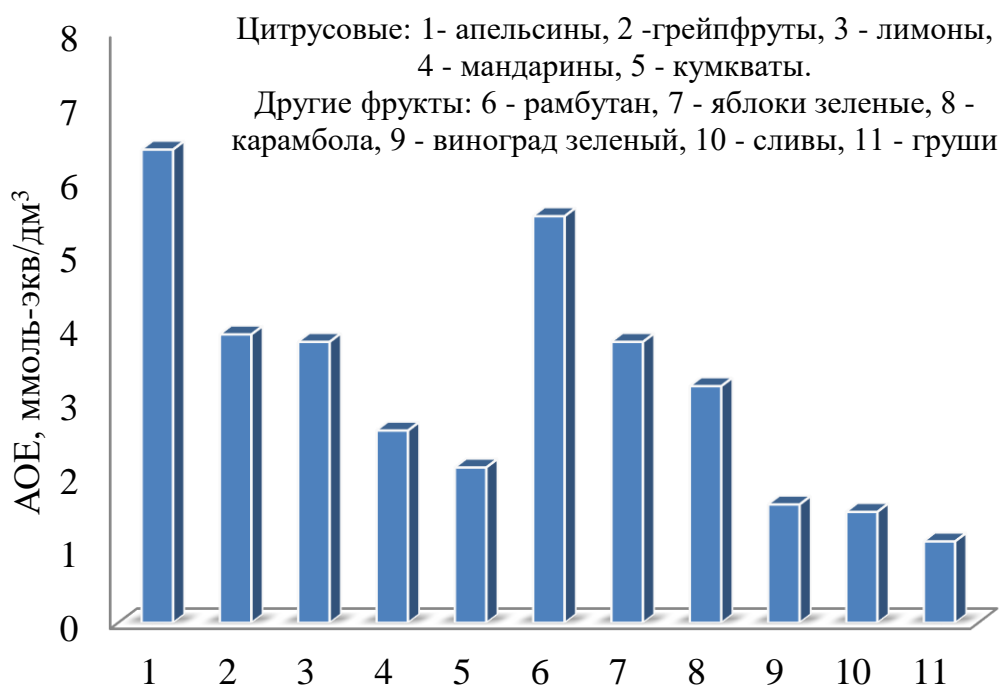


Рисунок 5.6 - Антиоксидантная емкость соков, выжатых из свежих фруктов

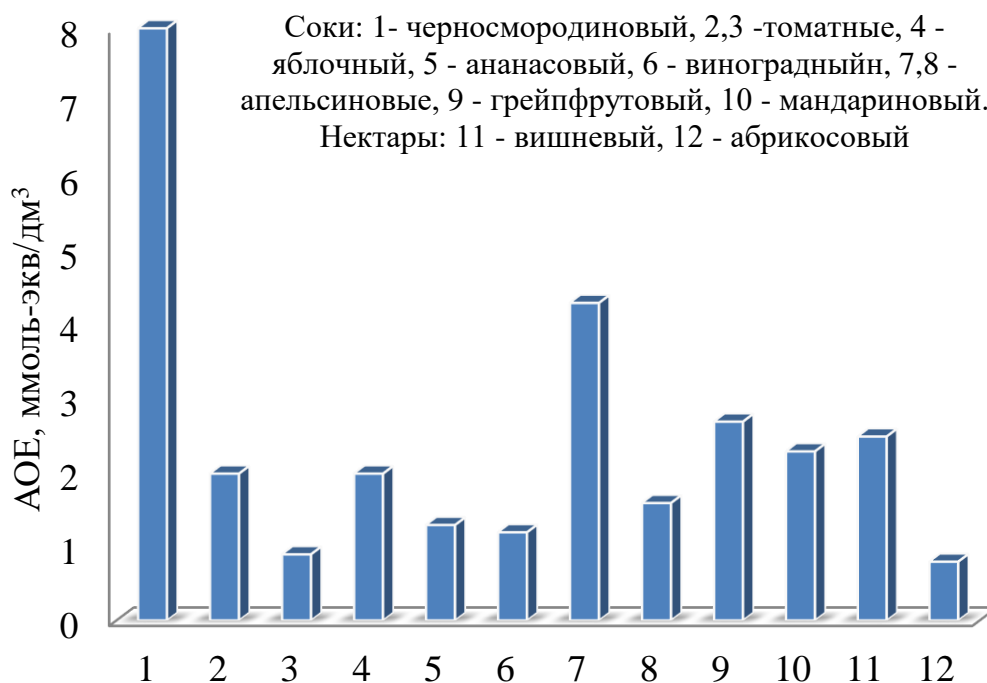


Рисунок 5.7 - АОЕ соков и сокосодержащих напитков промышленного изготовления

На рисунке 5.8 представлены результаты определения АОЕ соков, приготовленных из свежих овощей [374].



Рисунок 5.8 - Антиоксидантная емкость соков, выжатых из свежих овощей

Значения АОЕ свежесжатых овощных соков в целом ниже, чем для большинства ягод и некоторых фруктов и варьируется для исследованных объектов от 0.3 ммоль экв./дм³ для тыквы до 5.6 ммоль экв./дм³ для капусты кольраби.

Таким образом, при исследовании растительных экстрактов и пищевых продуктов показана взаимосвязь общего уровня полифенолов и АОЕ вина, а так же высокая степень корреляции результатов определения антиоксидантной емкости методом потенциометрии с методами фотоколориметрии с использованием долгоживущего радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразида, люминесценции продуктов перекисного окисления липосом для экстрактов лекарственных растений, хемилюминесценции фотосенсибилизированного рибофлавина для бальзамов и настоек.

Полученные данные подтверждают высокую достоверность результатов потенциометрического определения АОЕ различных объектов.

Представленные результаты демонстрируют, что использование предложенного подхода позволяет проводить экспрессную оценку интегрального параметра антиоксидантной емкости продуктов питания в сочетании с высокой степенью достоверности получаемых результатов. Информация об антиоксидантной емкости продуктов питания может быть использована для оценки качества как самого продукта, так и характеристики сырья и анализа особенностей технологии его изготовления.

5.3 Определение АОЕ и АРЕ экстрактов растительного сырья

5.3.1 Определение АОЕ и АРЕ чая

Состав антиоксидантов чая – широко употребляемого в пищу напитка из листьев *Camellia sinensis*, довольно хорошо изучен. Биологическая активность чая обусловлена наличием полифенольных соединений различных классов: катехинов, теарубинов, флаванолов, кверцетинов, теафлавинов [375]. Антиоксидантные свойства чая, обеспечивающиеся присутствием в нем широкого круга флавоноидов, хорошо известны и заключаются как в способности эффективно улавливать свободные радикалы, так и хелатировать металлы переменной валентности, тем самым предотвращать процессы ПОЛ. Кроме того, флавоноиды чая способствуют повышению активности окислительно-восстановительных ферментов, участвующих в процессах защиты организма от свободных радикалов [376].

В работе исследована АОЕ различных сортов черного, зеленого и красного чая, результаты представлены на рисунке 5.9. Достаточно высокая АОЕ определена как для зеленых, так и черных сортов листового чая. Также из полученных данных видно, что пакетированные чаи черных сортов и напитки на основе цветов гибискуса значительно уступают по интегральному

показателю АОЕ листовым чаем черного и зеленого сорта. Среднее квадратичное отклонение результатов для исследованных образцов не превышало 0,02 при $n=3-5$, $p=0.95$ [374].

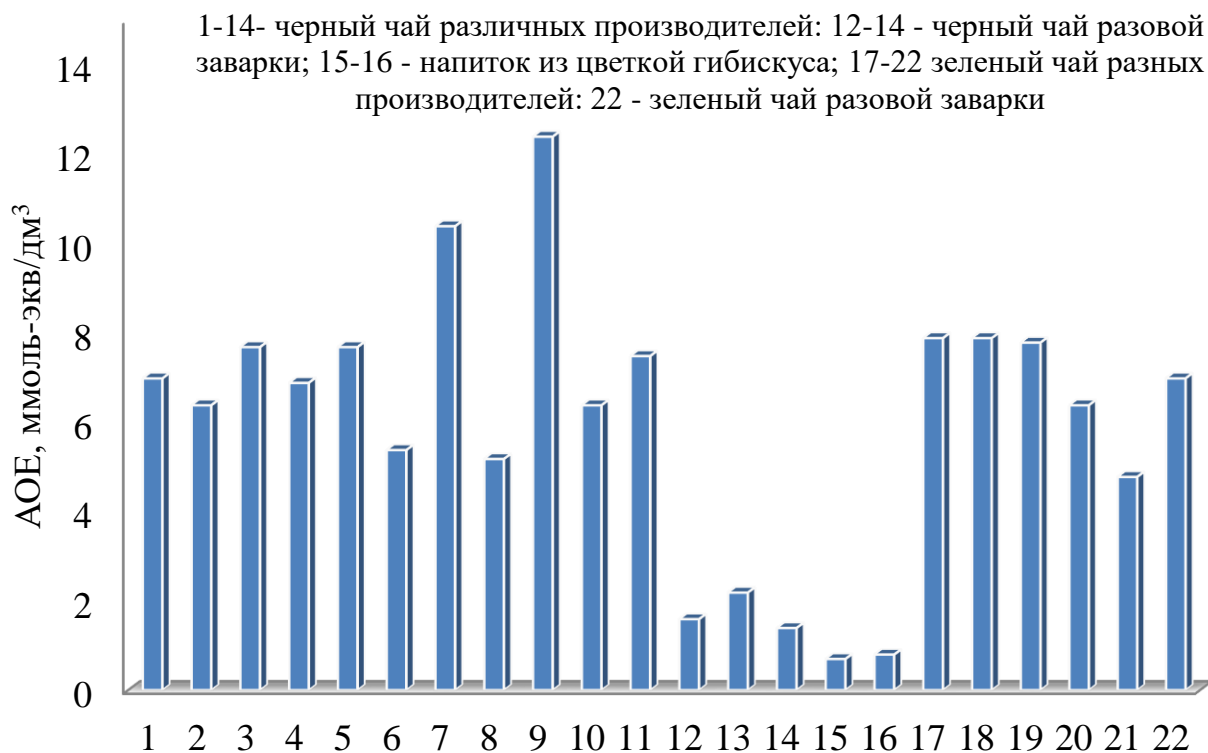


Рисунок 5.9 - Антиоксидантная емкость чая

В таблице 5.7 представлены результаты потенциометрического определения АРЕ и АОЕ экстрактов чая, основанными на реакции переноса электрона и реакции переноса атома водорода.

Значения АРЕ могут варьироваться как от сорта чая, качества сырья, так и от степени его ферментирования. В данном случае наибольшую как АРЕ, так и АОЕ проявил зеленый чай (Каждый день. Жасмин и Китайский зеленый чай) ввиду наибольшего содержания полифенолов.

На рисунке 5.10 представлен график корреляции двух методов.

Таблица 5.7 - Антирадикальная и антиоксидантная емкость разных сортов чая (P=0.95; n=5)

№ п/п	Марка чая	АРЕ, 10 ⁻² моль-экв/дм ³	S _r	АОЕ, 10 ⁻² моль-экв/дм ³	S _r
1	Marcony Чай черный	1.06±0.02	0.02	1.60±0.03	0.02
2	Nadin 1002 ночь	0.33±0.01	0.02	1.09±0.01	0.01
3	Greenfield. Earl Gray Fantasy	1.38±0.04	0.03	1.24±0.01	0.01
4	Rumuk. Black tea	0.72±0.01	0.02	1.49±0.04	0.03
5	Ahmad Breakfast	1.33±0.04	0.03	1.97±0.02	0.07
6	Каждый день. Жасмин	3.28±0.03	0.01	2.9±0.2	0.03
7	Китайский зеленый чай	3.79±0.04	0.01	2.92±0.03	0.08
8	Травяной чай «Витаминный»	0.44±0.01	0.01	0.32±0.03	0.05
9	Травяной чай «Отличное зрение»	0.35±0.01	0.03	0.56±0.03	0.01
10	Травяной чай «Для похудения»	0.28±0.01	0.03	0.56±0.02	0.01

В целом, значения АОЕ и АРЕ для исследованных чаев коррелируют: степень корреляции составила 85%. Разница в значениях АРЕ и АОЕ связаны с использованием различных моделей, основанных на разных механизмах реакции АО с окислителем: переносе электрона и переносе атома водорода. Приведенный пример демонстрирует, что АО, входящие в состав одного и того-же чая, могут по-разному проявлять себя в реакциях электронного и электронно-протонного переноса. Также стоит отметить, что в случае исследования АОЕ потенциометрическим методом возможными источниками погрешности результатов анализа могут являться влияние матрицы исследуемого объекта на установление равновесного потенциала системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ и возможное комплексообразование полифенолов чая с железом. В этом отношении предлагаемая методика

потенциометрического определения АРЕ имеет преимущество, т.к. является безреагентной, а аналитическим сигналом является момент максимальной скорости изменения потенциала системы, который не связан с матричным эффектом.

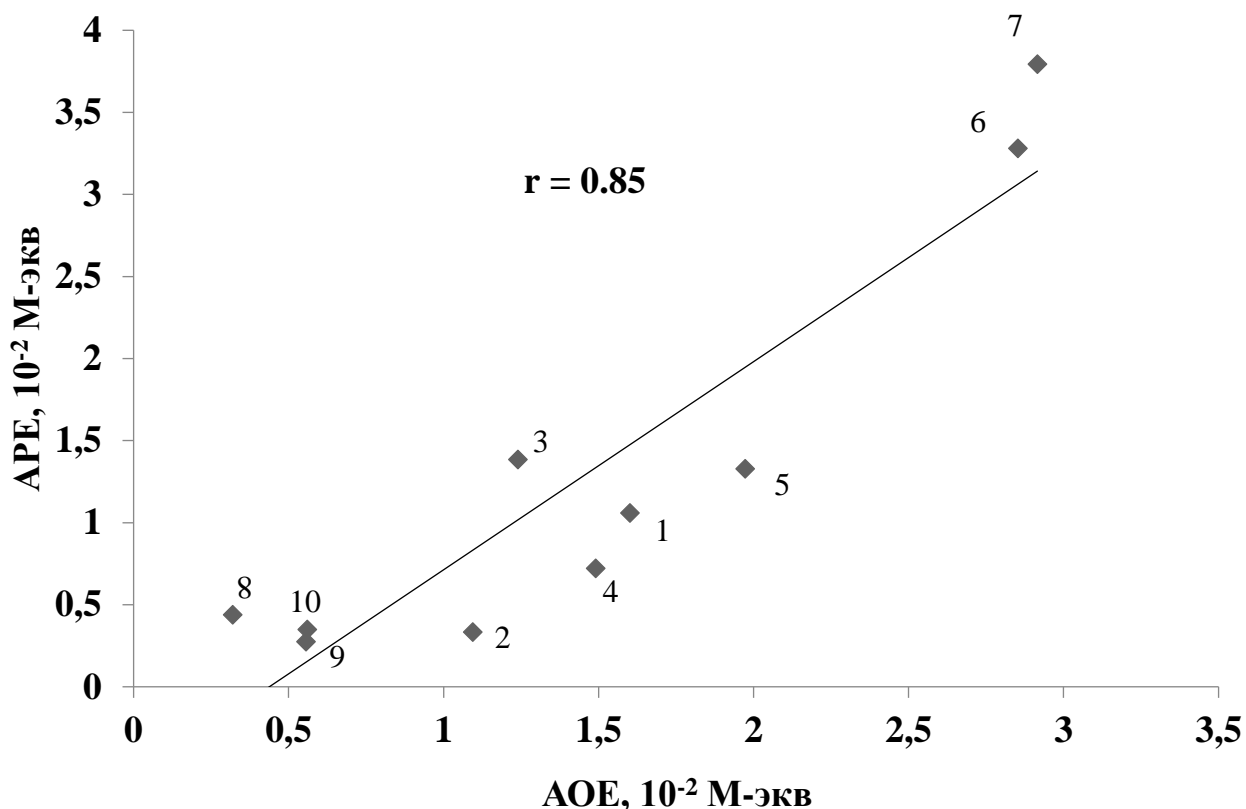


Рисунок 5.10 - Корреляционная зависимость результатов определения АРЕ и АОЕ настоев чая (1 – Marcony, 2 – Nadin, 3 - Greenfield. Eral Gray Fantasy, 4 – Rumuk. Black tea, 5 - Ahmad Breakfast, 6 - Каждый день. Жасмин, 7 - Китайский зеленый чай, 8 - Травяной чай «Витаминный», 9 - Травяной чай «Отличное зрение», 10 - Травяной чай «Для похудения»)

5.3.2 определение АОЕ и АРЕ экстрактов лекарственных трав

На рисунке 5.11 представлены зависимости полученных значений АОЕ водных настоев от времени экстрагирования на примере мяты перечной листьев и душицы травы [377]. Видно, что значение интегрального параметра

АОЕ зависит от времени экстрагирования. Максимальное значение АОЕ для обоих образцов достигнуто при времени экстрагирования 15 мин, что соответствует нормативной документации по приготовлению данных водных настоев. Таким образом, при исследовании настоев лекарственного сырья время экстрагирования соблюдали в соответствии с документацией.

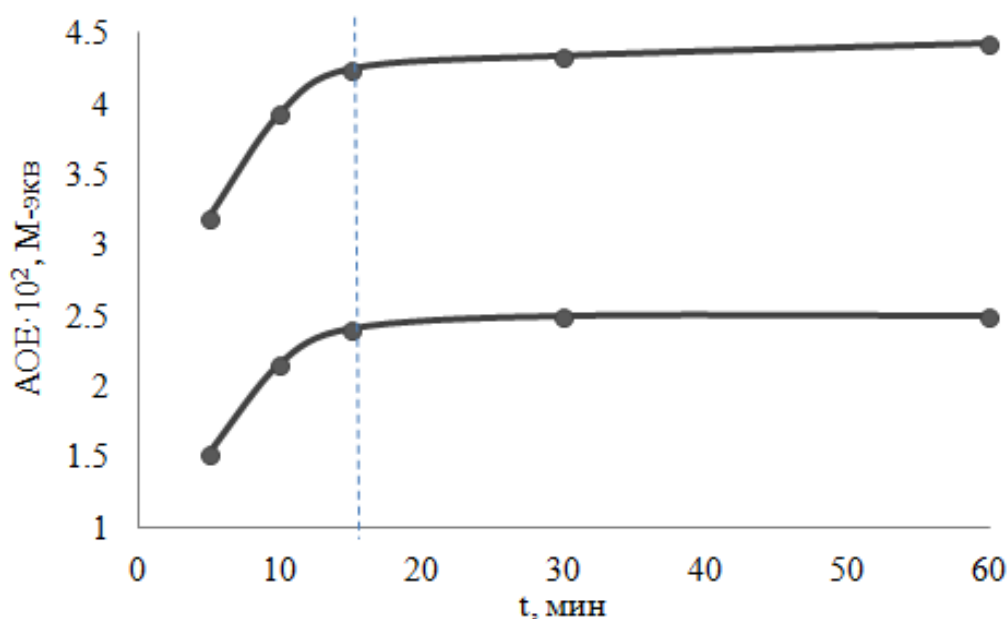


Рисунок 5.11 - Зависимость АОЕ водных настоев листьев мяты перечной (1), травы душицы (2) от времени экстрагирования

В таблице 5.8 приведены результаты определения АОЕ водных настоев лекарственных трав. Полученные значения АОЕ (I) соответствуют настою, приготовленному по нормативной документации. Принимая во внимание, что при нормативном приготовлении настоев использовали различные количества сухого вещества, в таблице 5.8 также приведены значения АОЕ (II), соответствующие антиоксидантной емкости в расчете на 1 г сухого сырья.

Основными соединениями, обеспечивающими антиоксидантные свойства лекарственного растительного сырья, являются полифенольные соединения. В таблице 5.9 представлены результаты определения общего содержания полифенолов в водных настоях лекарственного растительного сырья в эквивалентах галловой кислоты (ГК). Полученные значения сгк (I) также соответствуют настою, приготовленному по нормативной

документации, значения сгк (II) соответствуют концентрациям полифенольных соединений на 1 г сухого сырья.

Таблица 5.8 - Антиоксидантная емкость водных настоев лекарственного растительного сырья ($n = 5, P = 0.95$)

Лекарственное растительное сырье	АОЕ, ммоль-экв/дм ³		s _r
	(I)*	(II)**	
Душицы трава <i>Origanum herba</i>	42.4 ± 1.3	7.1 ± 0.2	0.03
Мяты перечной листья <i>Menthae piperitae folia</i>	22.9 ± 0.2	5.09 ± 0.05	0.01
Ноготков цветки <i>Calendulae flores</i>	4.12 ± 0.08	1.37 ± 0.03	0.02
Солодки корни <i>Glycyrrhizae radices</i>	0.64 ± 0.06	0.08 ± 0.01	0.09
Ромашки цветки <i>Chamomillae flores</i>	1.78 ± 0.07	0.59 ± 0.02	0.04
Зверобоя трава <i>Hyperici herba</i>	4.21 ± 0.04	1.40 ± 0.01	0.01
Березы листья <i>Betulae folia</i>	2.49 ± 0.02	0.83 ± 0.01	0.01
Пустырника трава <i>Leonuri herba</i>	3.31 ± 0.03	1.10 ± 0.01	0.01
Эхинацеи измельченная трава <i>Echinacea purpurea herba</i>	3.4 ± 0.1	2.28 ± 0.09	0.04
Полыни горькой трава <i>Absinthii herba</i>	5.2 ± 0.4	0.52 ± 0.04	0.08

* АОЕ (I) настоев, приготовленных по нормативной документации, **АОЕ (II), рассчитанная на 1 г сухого сырья.

Таблица 5.9 - Общее содержание полифенолов в водных настоях лекарственного растительного сырья ($n = 5, P = 0.95$)

Лекарственное растительное сырье	$c_{ГК}, \text{мМ}$		s_r
	(I)*	(II)**	
Душицы трава <i>Origanum herba</i>	11.0 ± 0.6	1.84 ± 0.09	0.05
Мяты перечной листья <i>Menthae piperitae folia</i>	6.7 ± 0.4	1.50 ± 0.09	0.06
Ноготков цветки <i>Calendulae flores</i>	0.31 ± 0.06	0.11 ± 0.02	0.06
Солодки корни <i>Glycyrrhizae radices</i>	0.23 ± 0.03	0.03 ± 0.01	0.04
Ромашки цветки <i>Chamomillae flores</i>	0.37 ± 0.07	0.12 ± 0.03	0.06
Зверобоя трава <i>Hyperici herba</i>	1.18 ± 0.09	0.39 ± 0.03	0.08
Березы листья <i>Betulae folia</i>	0.06 ± 0.01	0.021 ± 0.005	0.06
Пустырника трава <i>Leonuri herba</i>	0.38 ± 0.09	0.13 ± 0.03	0.07
Эхинацеи измельченная трава <i>Echinacea purpurea herba</i>	0.59 ± 0.04	0.39 ± 0.02	0.06
Полыни горькой трава <i>Absinthii herba</i>	0.65 ± 0.01	0.062 ± 0.001	0.01

* $c_{ГК}$ (I) в настоях, приготовленных по нормативной документации, ** $c_{ГК}$ (II), рассчитанная на 1 г сухого сырья.

На рисунке 5.12 представлена корреляционная зависимость результатов определения АОЕ и содержания полифенольных соединений в эквивалентах галловой кислоты в водных настоях лекарственного растительного сырья. Коэффициент корреляции полученных результатов составляет 98%.

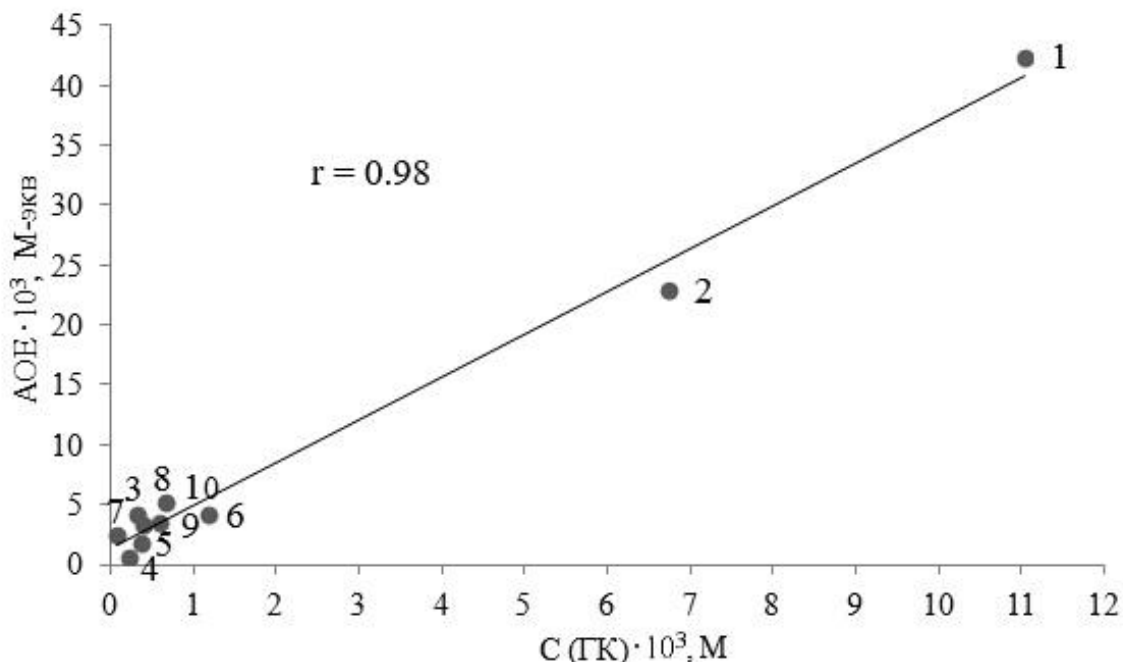


Рисунок 5.12 - Корреляционная зависимость результатов определения АОЕ и ОСПФ в водных настоях лекарственного растительного сырья

Высокая степень корреляции результатов подтверждает корректность получаемых результатов, а также правильность потенциометрического измерения интегрального параметра АОЕ.

Исследования антирадикальных свойств водных экстрактов лекарственных растений проводили потенциометрическим методом с использованием ААРН. Результаты исследования АРЕ потенциометрическим методом и общего содержания полифенолов в эквивалентах галловой кислоты (СГК) представлены в таблице 5.10.

Таблица 5.10 – АРЕ и общее содержание полифенолов водных экстрактов лекарственного растительного сырья ($C_{AAPH} = 0.1 \text{ M}$, $n = 10$, $P = 0.95$)

Название	АРЕ, 10^{-2} моль- экв/дм ³	S_r	$C_{ГК}$, 10^{-3} моль- экв/дм ³	S_r
Душицы трава (<i>Origanum herba</i>)	5.50±0.06	0.01	11.0±0.6	0.05
Мяты перечной листья (<i>Menthae piperitae folia</i>)	3.25±0.03	0.01	6.7±0.4	0.06
Ноготков цветки (<i>Calendulae flores</i>)	0.73±0.01	0.02	0.31±0.06	0.06
Зверобоя трава (<i>Hyperici herba</i>)	0.95±0.01	0.01	1.18±0.09	0.08
Березы листья (<i>Betulae folia</i>)	0.290±0.003	0.01	0.06±0.01	0.06
Полыни горькой трава (<i>Absinthii herba</i>)	0.53±0.03	0.05	0.65±0.01	0.01

На рисунке 5.13 представлена корреляционная зависимость потенциометрического и спектрофотометрического метода исследования. Коэффициент корреляции полученных результатов составил 99%. Различия абсолютных значений связаны с разной природой используемых радикальных моделей, а также с тем фактом, что в спектрофотометрическом методе не учитываются коэффициенты ингибирования веществ, входящих в состав экстрактов, а результаты представляются в эквивалентах галловой кислоты. Кроме того, источником погрешности в данном случае может служить влияние окраски исследуемых экстрактов на величину оптической плотности.

Поскольку основными компонентами лекарственных растений являются вещества разной гидрофильности, использование спиртовых или водно-спиртовых сред является наиболее целесообразным с точки зрения полноты протекания процесса экстракции. В данной работе проведены исследования антирадикальной емкости этанольных экстрактов лекарственных растений, приобретенных в аптечной сети.

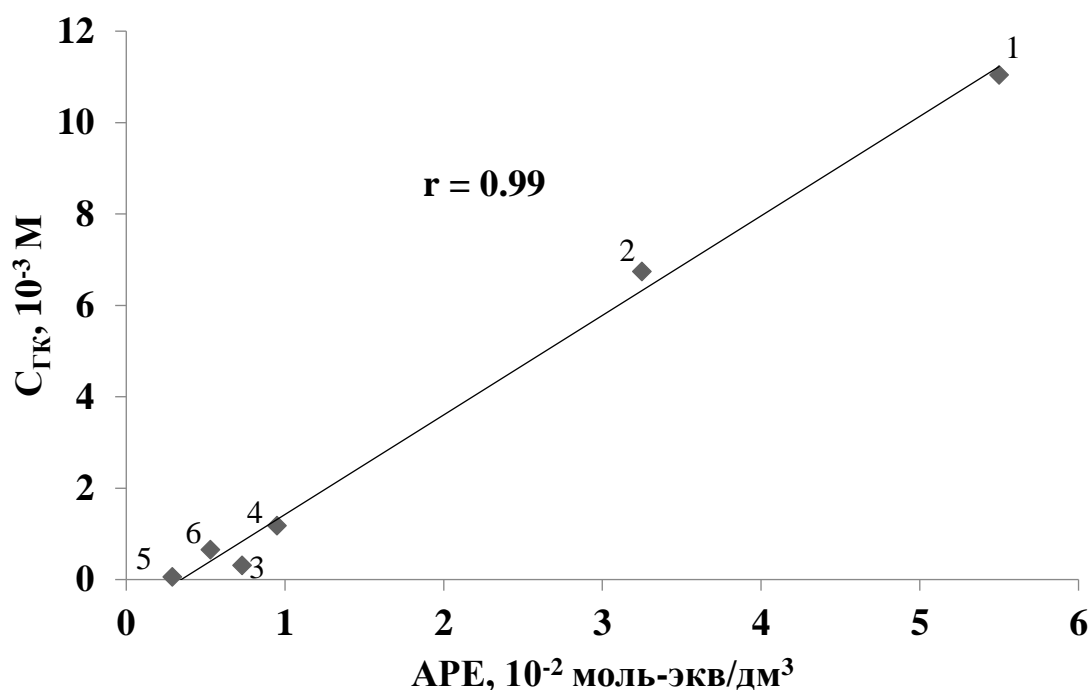


Рисунок 5.13 - Корреляционная зависимость результатов определения АРЕ и общего содержания полифенолов водных настоях лекарственного растительного сырья (1 – Душицы трава, 2 – Мяты перечной листья, 3 – Ноготков цветки, 4 – Зверобоя трава, 5 – Березы листья, 6 – Полыни горькой трава)

Антирадикальные свойства этанольных экстрактов исследовали потенциометрическим методом и спектрофотометрическим методом с использованием хромоген-радикалаДФПГ.

При выборе метода сравнения руководствовались требованиями:

- использование модели окислителя радикальной природы,
- возможность проведения анализа в спиртовых средах.

При использовании этанольных растворов, предварительно проводили исследования влияния спирта на сдвиг потенциала платинового электрода.

Исследования влияния спирта осуществляли на примере аскорбиновой кислоты ($C_{AK} = 0.1$ мМ), как хорошо изученного ингибитора радикальных реакций. Для этого в систему 0.1 М ААРН и аскорбиновой кислоты вводили аликвоты спирта в процессе регистрации сигнала, после чего проводили расчет АРЕ. Полученные данные представлены в таблице 5.11.

Таблица 5.11 – АРЕ аскорбиновой кислоты при добавлении аликвот спирта в разных концентрациях ($V_{p-ра} = 5$ мл, $C_{AK} = 0.1$ ммоль-экв/дм³, $C_{ААРН} = 0.1$ М, $n = 5$, $P = 0.95$)

Аликвота спирта, мкл	АРЕ, 10 ⁻⁴ моль-экв/дм ³	S _r
0	2.2±0.1	0.05
20	2.17±0.07	0.03
50	2.17±0.04	0.02
100	2.11±0.08	0.04
150	2.1±0.1	0.05
200	2.15±0.09	0.04
500	2.2±0.2	0.07
1000	2.3±0.2	0.08

Установлено, что соотношение буферный раствор / спирт более 25:1 не влияет на величину регистрируемого потенциала, статистически значимой разницы в значениях АРЕ не обнаружено.

Результаты антирадикальной емкости и противорадикальной активности этанольных экстрактов лекарственного растительного сырья представлены в таблице 5.12. Значения ПРА выражены в эквивалентах аскорбиновой кислоты (моль-экв/дм³ АК).

Таблица 5.12 – АРЕ и ПРА этанольных экстрактов лекарственного растительного сырья (n = 10, P = 0.95)

№ п/п	Наименование препарата	АРЕ, 10 ⁻² моль-экв/дм ³	S _r	ПРА (10 ⁻² моль- экв/дм ³ АК)	S _r
1	Календула (<i>Caléndula</i>)	1.08±0.03	0.03	0.35±0.02	0.07
2	Пустырник (<i>Leonúrus</i>)	1.65±0.02	0.01	0.50±0.01	0.02
3	Боярышник (<i>Crataégus</i>)	0.23±0.01	0.01	0.07±0.01	0.08
4	Женьшень (<i>Pánax</i>)	0.26±0.01	0.01	0.10±0.01	0.07
5	Родиола (<i>Rhodiola</i>)	13.4±0.8	0.06	6.44±0.06	0.01
6	Пион (<i>Paeónia</i>)	3.33±0.03	0.01	1.20±0.01	0.01
7	Элеутерококк (<i>Eleutherococcus</i>)	3.67±0.04	0.01	0.79±0.02	0.03
8	Эвкалипт (<i>Eucalyptus</i>)	6.32±0.06	0.01	2.83±0.06	0.02
9	Мята перечная (<i>Méntha piperíta</i>)	2.27±0.02	0.01	0.54±0.03	0.05
10	Лимонника семяна (<i>Schisándra</i>)	1.72±0.05	0.01	0.63±0.06	0.01
11	Полынь (<i>Artemisia</i>)	4.8±0.1	0.02	1.74±0.09	0.05
12	Перец стручковый (<i>Cápsicum ánnuum</i>)	2.29±0.02	0.01	0.17±0.04	0.04
13	Валериана (<i>Valeriána</i>)	1.16±0.08	0.07	0.37±0.08	0.02

Корреляционная зависимость результатов определения антирадикальной емкости потенциометрическим методом и антиоксидантной активности спектрофотометрическим методом с использованием ДФПГ приведены на рисунке 5.14.

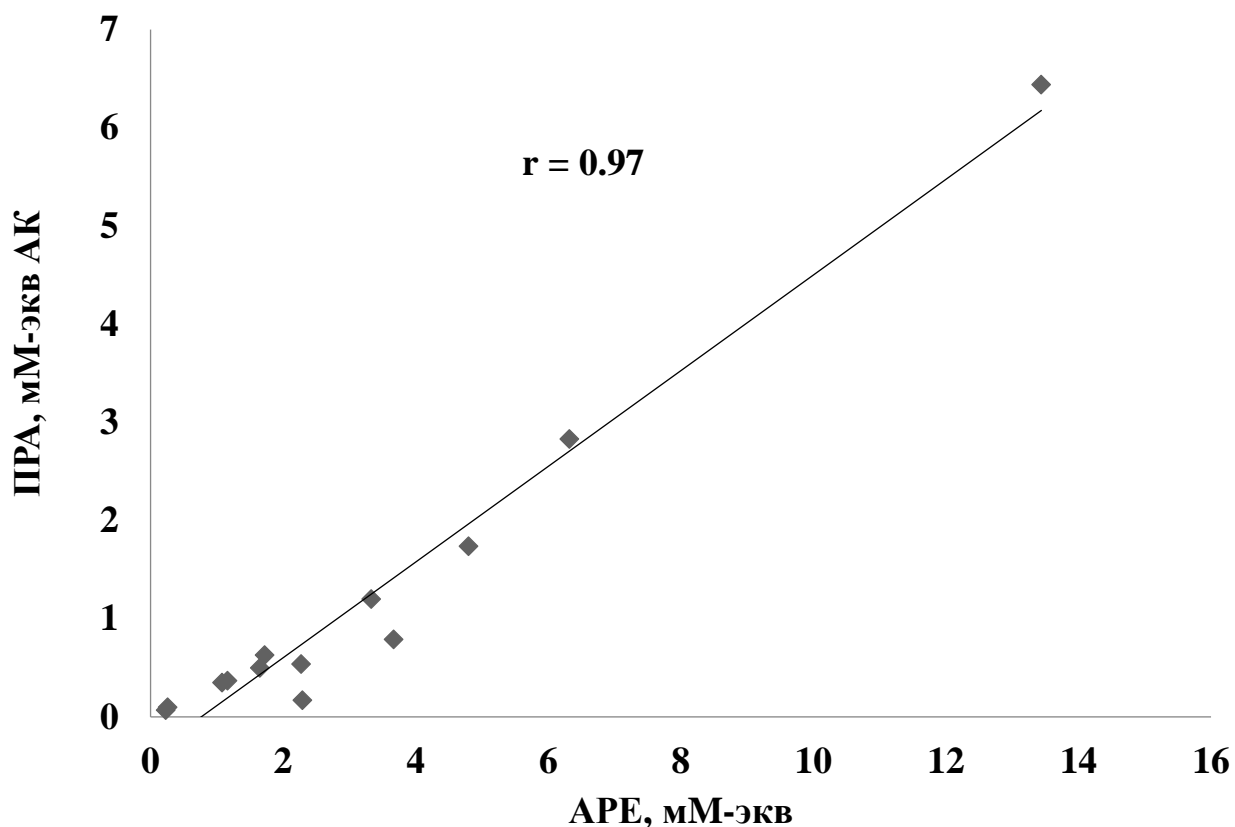


Рисунок 5.14 - Корреляционная зависимость результатов исследования антирадикальной емкости потенциометрическим методом и противорадикальной активности спектрофотометрическим методом с использованием ДФПГ

Степень корреляции полученных результатов составляет 97%. Разница в абсолютных значениях связаны с разной природой используемых радикальных моделей, а также как и в предыдущем случае, с тем фактом, что в оптическом методе не учитываются коэффициенты ингибирования веществ, входящих в состав экстрактов, а результаты представляются в эквивалентах аскорбиновой кислоты. Также источником погрешности может служить влияние окраски исследуемых экстрактов на величину оптической плотности.

В таблице 5.13 приведены результаты определения АОЕ экстрактов, приготовленных из различных частей лекарственных растений рода *Artemisia* (полыни), *Centaurea apiculata* Ledeb. (василька шипиконосного), *Achillea latiloba* (тысячелистника широколопастного), полученных потенциометрическим методом и методом перекисного окисления липидов, традиционно используемого для оценки степени повреждения макромолекул свободными радикалами [378]. Для корреляционных исследований АОЕ экстрактов различных частей лекарственных растений был выбран способ определения сверхслабого свечения продуктов ПОЛ на модели суспензии желтка куриного яйца [309].

На рисунке 5.15 представлены результаты сравнения потенциометрического определения АОЕ с методом определения сверхслабого свечения продуктов ПОЛ на модели суспензии желтка куриного яйца, которые коррелируют на 88%.

Еще одной группой объектов исследования в качестве источника природных АО служили водные и водно-спиртовые экстракты ряда лекарственных трав. В качестве метода сравнения при определении антиоксидантных свойств был выбран способ определения противорадикальной активности на модели долгоживущего радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила. В таблице 5.14 приведены результаты потенциометрического определения АОЕ и фотометрического определения ПРА свежеприготовленных водных и водно-этанольных экстрактов лекарственных растений. Различие абсолютных значений АОЕ и ПРА связано с применением в фотоколориметрическом способе аскорбиновой кислоты в качестве стандартного АО, которая способна переносить 2 электрона на молекулу окислителя.

Таблица 5.13 - Результаты определения АОЕ потенциметрическим методом и методом перекисного окисления липидов (n=6, p=0.95)

Название образца	№	Способ экстракции	Потенциметрия		ПОЛ	
			АОЕ, ммоль экв./дм ³	S _r	$A = \frac{M_k - M_o}{M_k}$	S _r
Полынь австрийская (Artemisia austriaca)	1	40% этанольный экстракт	6.5	0.1	0.12	0.02
	2	70% этанольный экстракт	18.2	0.1	0.21	0.10
Полынь однолетняя (Artemisia annua L.)	3	40% этанольный экстракт	15.5	0.1	0.17	0.03
	4	70% этанольный экстракт	18.6	0.01	0.23	0.01
	5	96% этанольный экстракт (сырье в фазе бутонизации)	16.8	0.02	0.17	0.02
	6	96% этанольный экстракт (сырье в фазе цветения)	7.5	0.01	0.15	0.05
Полынь сантолинолистная (Artemisia santolinifolia)	7	96% этанольный экстракт из шрота	13.5	0.08	0.15	0.10
	8	96% этанольный экстракт из шрота после обработки водой	7.2	0.04	0.13	0.03
	9	96% этанольный экстракт из шрота после обработки гексаном	17.01	0.1	0.19	0.04
Василёк шипиконосный (Centaurea ariculata Ledeb.)	10	40% этанольный экстракт	12.0	0.08	0.04	0.04
	11	70% этанольный экстракт	9.4	0.02	0.14	0.01
Тысячелистник широколопастный (Achillea latiloba)	12	70% этанольный экстракт	68.6	0.09	0.51	0.05
	13	90% этанольный экстракт	24.2	0.02	0.40	0.01

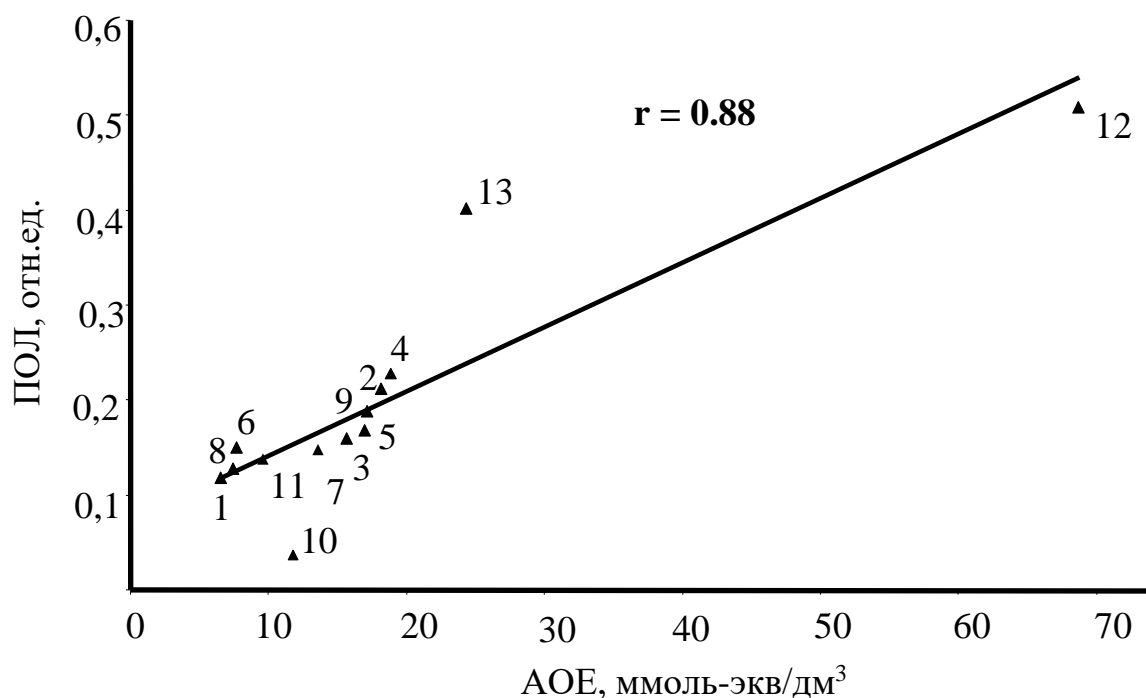


Рисунок 5.15 - Корреляция результатов АОЕ свежеприготовленных настоев лекарственных трав Кавказа, полученных методами потенциометрии с методом ПОЛ (номера образцов соответствуют номерам образцов в Таблице 5.13)

На рисунке 5.16 представлена зависимость, позволяющая оценить степень корреляции результатов определения АОЕ, полученных потенциометрическим и фотометрическим методами. Как для водных, так и для водно-спиртовых экстрактов коэффициент корреляции составил 0,99.

Растительные экстракты широко используются в рационе человека как тонизирующие и общеукрепляющие средства. Реакции окисления, протекающие по свободнорадикальному механизму, как правило, сопровождаются хемилюминесценцией [379]. Это свойство достаточно часто используется при исследовании антиоксидантных свойств веществ или различных объектов. Для сравнительной оценки интегрального параметра АОЕ бальзамов и настоек использовали способ индуцированной люминесценции продуктов перекисного окисления на модели фотоокисления глицил-триптофана [305]. В таблице 5.15 приведены результаты

потенциометрического определения АОЕ лекарственных настоев и бальзамов промышленного изготовления в сравнении с результатами, полученными хемиллюминесцентным методом.

Таблица 5.14 - Результаты определения АОЕ потенциометрическим методом и ПРА фотоколориметрическим методом с использованием долгоживущего радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразида (n=6, p=0.95)

№	Название образца	Вид экстракта	Потенциометрия		Фотоколориметрия	
			АОЕ, ммоль-экв/дм ³	S _r	ПРА, мМ аскорбиновой кислоты	S _r
1	Плоды боярышника	водный	4.9	0.01	2.1	0.02
		водно-этанольный	15.0	0.01	6.8	0.10
2	Плоды можжевельника	водный	4.3	0.02	1.9	0.04
		водно-этанольный	16.0	0.01	9.7	0.03
3	Корневища аира	водный	1.1	0.10	1.1	0.2
		водно-этанольный	6.1	0.03	4.2	0.10
4	Корни одуванчика	водный	1.9	0.05	1.0	0.03
		водно-этанольный	4.5	0.04	4.1	0.07
5	Кора дуба	водный	36.6	0.04	10.6	0.02
		водно-этанольный	72.2	0.02	28.4	0.02

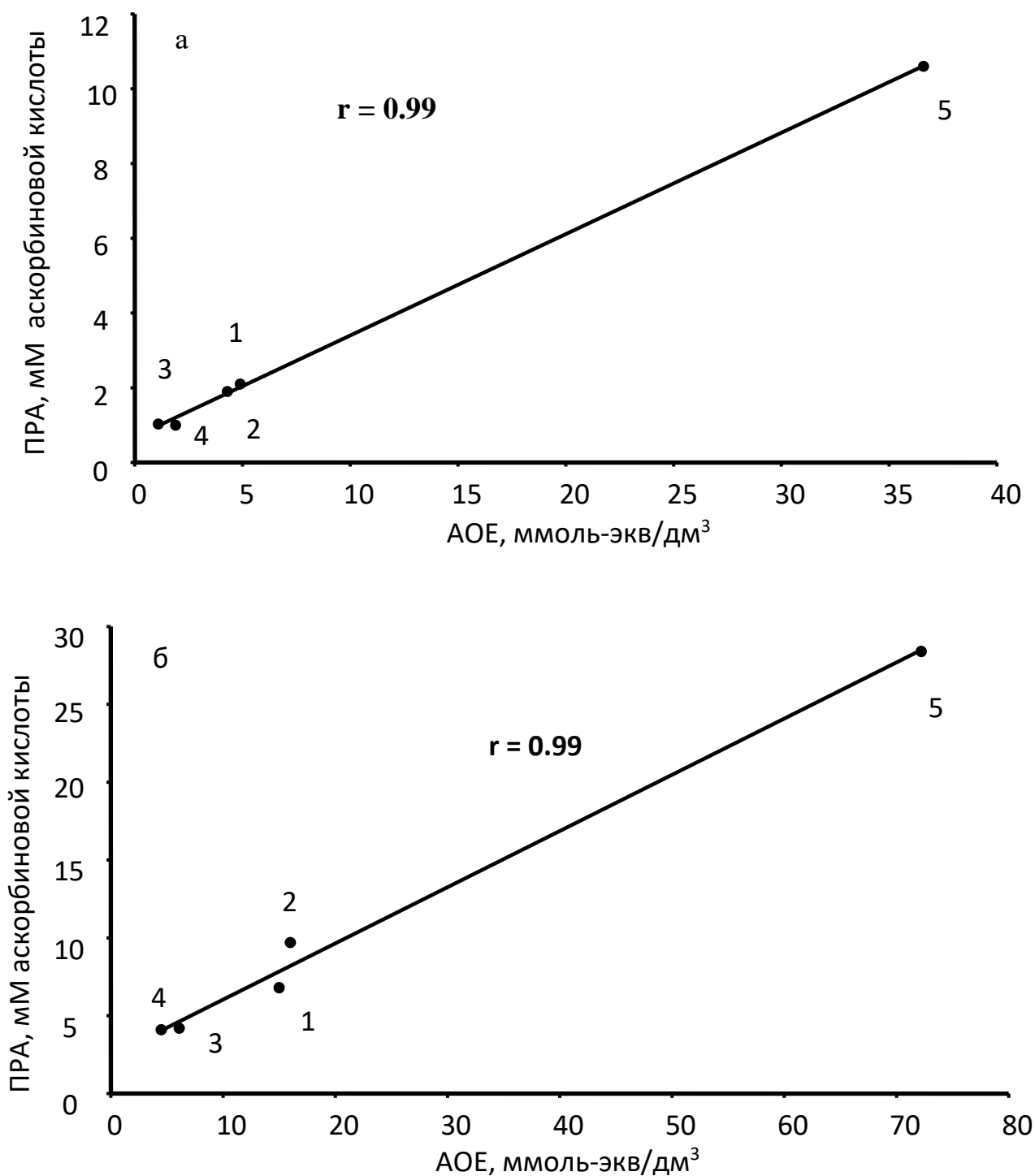


Рисунок 5.16 - Корреляция результатов АОЕ водных (А) и водно-этанольных (В) экстрактов лекарственных трав, полученных потенциометрическим методом с результатами ПРА, полученных спектрофотометрическим методом на модели 2,2-дифенил-1-пикрилгидразида

(Номера исследованных объектов соответствуют номеру в таблице 5.14)

Таблица 5.15 - Результаты определения АОЕ потенциметрическим и хемиллюминесцентным методами (n=6, p=0.95) [380]

№	Название образца	Потенциметрия		Хемиллюминесценция	
		АОЕ, ммоль- экв/дм ³	S _r	$A = \frac{C_{1/2}^x}{C_{1/2}^R}$	S _r
1	настойка боярышника	6.2	0.04	0.7	0.04
2	бальзам «Кедровит»	6.7	0.02	0.5	0.04
3	настойка валерианы	6.8	0.02	3.0	0.04
4	бальзам «Демидовский»	8.6	0.02	0.7	0.03
5	настойка мяты	10.0	0.01	1.0	0.04
6	бальзам «Алтайский»	10.7	0.1	0.8	0.03
7	настойка календулы	14.7	0.02	1.5	0.04
8	настойка женьшеня	14.9	0.02	0.1	0.04
9	настойка аралии	16.0	0.02	6.0	0.04
10	настойка пустырника	22.2	0.1	6.0	0.03
11	настойка полыни	46.1	0.01	9.0	0.03
12	настойка эвкалипта	91.0	0.01	4.0	0.03
13	настойка родиолы	235.7	0.01	12.0	0.04

Результаты сравнения АОЕ лекарственных бальзамов и экстрактов представлены на рисунке 5.17. Коэффициент корреляции – 0.76. Относительно невысокая степень корреляции может быть объяснена разными механизмами реакции АО в этих методах (перенос электрона в потенциметрии и перенос атома водорода в хемиллюминесценции).

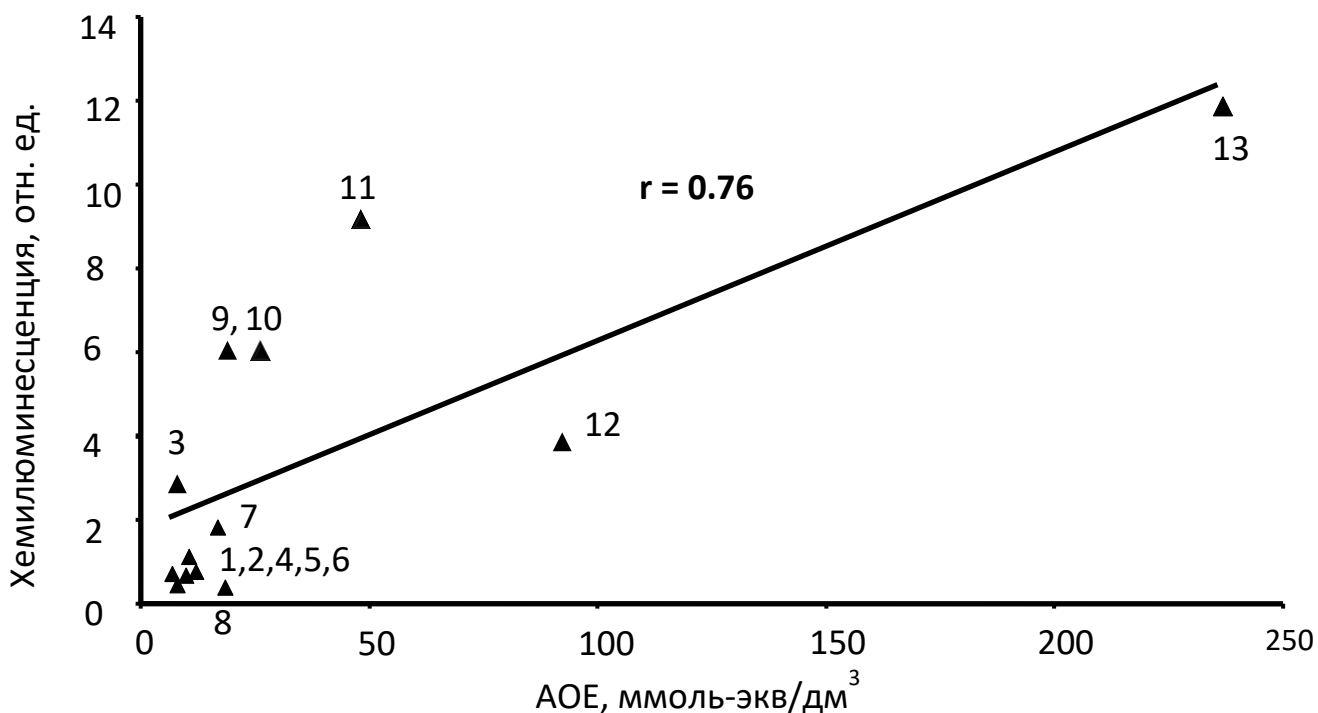


Рисунок 5.17 - График корреляционной зависимости результатов определения АОЕ бальзамов и настоек лекарственных трав, полученных методами потенциометрии и хемилюминесценции

(номера точек на графике соответствуют номеру исследуемого объекта из таблицы 5.15)

Исследования показали, что из выбранных образцов наиболее высокое значение АОЕ показала настойки радиолы, которую еще называют «золотой корень». Полученные данные согласуются с известными фактами о высоком содержании веществ с антиоксидантными свойствами в радиоле [381]. Показано также, что фитопрепараты, полученные на основе радиолы розовой статистически достоверно снижают уровень перекисного окисления липидов, повышают активность ферментов супероксиддисмутазы и каталазы, что можно считать возможными механизмами антиоксидантного действия препаратов [382].

5.4 Определение АОЕ биологических объектов

Учитывая сложный состав биологических объектов, необходимость использования антикоагулянтов для предотвращения свертываемости отобранных образцов и различие концентраций веществ с антиоксидантными свойствами, отличающихся на порядки в различных фракциях крови (цельная кровь, плазма, эритроцитарная масса), изучение антиоксидантной емкости этих объектов требует проведения дополнительных исследований связанных с анализом растворов, моделирующих состав крови, выбором рабочих концентраций компонентов модельного окислителя, выбора антикоагулянта, степени разбавления анализируемых образцов, влияния условий отбора, хранения и подготовки биологических образцов к анализу.

5.4.1 Определение АОЕ раствора, моделирующего состав плазмы крови

Согласно литературным данным [383-386] антиоксидантный состав плазмы крови формируется из следующих основных веществ: мочева кислота, аскорбиновая кислота, глутатион, цистеин и билирубин. Ранее уже было показано, что полученные стехиометрические коэффициенты в реакции 3.15 для этих веществ в целом соответствуют теоретически ожидаемым, т.е. количеству групп в молекуле антиоксиданта, отвечающих за его антиоксидантные свойства (-ОН в составе бензольного ядра; -SH; -ОН, -NH в составе герероциклического соединения). Модельный раствор плазмы крови для исследования антиоксидантной емкости состоял из указанных АО и альбумина для моделирования белкового состава данного объекта. При выборе концентраций АО для приготовления модельного раствора опирались на средние значения диапазона содержания, определенные из литературных данных. Результаты анализа модельного раствора приведены в таблице 5.16 [387].

Полученные результаты определения АОЕ модельного раствора соответствуют ожидаемому значению согласно его составу с учетом определенных стехиометрических коэффициентов, который был подобран так, чтобы он был близок к антиоксидантному составу реальных образцов плазмы крови.

Таблица 5.16 - Результаты определения АОЕ раствора, моделирующего антиоксидантный состав плазмы крови (ммоль-экв/дм³, n=5, P=0.95)

Соединение	Концентрация	АОЕ ожидаемая	АОЕ измеренная,	S _r
Мочевая кислота	0.37·10 ⁻³ М	0.70	0.75±0.03	0.02
Аскорбиновая кислота	0.06·10 ⁻³ М			
Глутатион	0.02·10 ⁻³ М			
Цистеин	0.015·10 ⁻³ М			
Билирубин	0.01·10 ⁻³ М			
Альбумин	45 г/л			

5.4.2 Выбор рабочих концентраций компонентов системы и степени разбавления анализируемых образцов при определении АОЕ биологических объектов

При выборе концентраций компонентов системы руководствовались критериями, сформулированными в разделе 3.2.3. Как уже отмечалось ранее, стократный избыток окисленного компонента системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ является оптимальным, т.к. обеспечивает высокую скорость реакции окисленного компонента системы с антиоксидантами пробы; максимальный сдвиг потенциала системы, возникающего в результате этой реакции при взаимодействии с АО в количестве, соизмеримым с концентрацией восстановленного компонента системы; стабильность потенциала системы до и после его взаимодействия с АО исследуемого образца.

Согласно экспериментальным данным, величина АОЕ для цельной крови и эритроцитарной массы имеет достаточно высокие значения и лежит в диапазоне 6.0-15.0 ммоль-экв/дм³, поэтому для анализа этих объектов выбрана система с соотношением компонентов 0.01М К₃[Fe(CN)₆]/0.0001М К₄[Fe(CN)₆]. Для анализа сыворотки, плазмы и диализной жидкости, которые содержат на порядок меньше антиоксидантов (0.60-2.10 ммоль-экв/дм³), чем кровь и эритроцитарная масса, оптимальным соотношением концентраций компонентов системы, соответственно, является 0.001 М К₃[Fe(CN)₆]/0.00001 М К₄[Fe(CN)₆]. Однако концентрации 0.00001 М раствора К₄[Fe(CN)₆] недостаточна для установления равновесного потенциала. Кроме того, растворы К₄[Fe(CN)₆] низкой концентрации неустойчивы из-за возможного окисления кислородом воздуха. В таблице 5.17 приведены расчетные значения сдвига потенциала, соответствующие различным исследуемым системам. Исходя из полученных данных для анализа плазмы и сыворотки крови была предложена система с содержанием 0.00005 М К₄[Fe(CN)₆], при использовании которой наблюдается достаточно быстрое установление потенциала и стабильность его во времени. Поскольку состав диализной жидкости близок к составу разбавленной сыворотки, то для анализа диализата использовали ту же систему, что и сыворотки крови.

Таблица 5.17 - Состав систем и расчётный сдвиг потенциала (АОЕ=0.70-2.10 ммоль-экв/дм³)

$C_{Ox}/C_{Red}, M/M$	$\Delta E, mV$
$10^{-3}/10^{-5}$	64 - 96
$10^{-3}/2 \cdot 10^{-5}$	34 - 62
$10^{-3}/5 \cdot 10^{-5}$	32 - 60
$10^{-3}/10^{-4}$	23 - 46

При выборе условий разбавления пробы (объема аликвоты) учитывались не только содержание антиоксидантов, но и доступность исследуемого образца. На рисунке 5.18 приведены зависимости аналитического сигнала антиоксидантной емкости от объема добавленного образца крови и ее фракций.

Небольшие значения величины АОЕ, определенные при малых объемах введенного образца могут быть обусловлены тем, что концентрация АО, введенных с образцом в систему мала, а условия сдвига окислительно-восстановительного равновесия реакции 3.15 в сторону образования продуктов не достигаются. Использование больших по объему аликвот не приводит к увеличению значения величины АОЕ, что может быть связано с возрастающим влиянием матрицы образцов, препятствующей полному протеканию реакции. На основании проведенных исследований осуществлен выбор рабочих условий определения АОЕ исследуемых образцов (Таблица 5.18).

Таблица 5.18 - Рабочие концентрации компонентов системы и степень разбавления анализируемых образцов при определении АОЕ крови и ее фракций

Объект	Концентрации компонентов системы C_{Ox}/C_{Red} , М/М	Объем буферного раствора с системой, мл	Объем аликвоты, мл	Разбавление образца
Эритроцитарная масса	$10^{-2}/10^{-4}$	10	0.1	100
Цельная кровь	$10^{-2}/10^{-4}$	10	0.2	50
Плазма, сыворотка	$10^{-3}/5 \cdot 10^{-5}$	1	0.2	6
Диализная жидкость	$10^{-3}/5 \cdot 10^{-5}$	-	-	Без разбавления

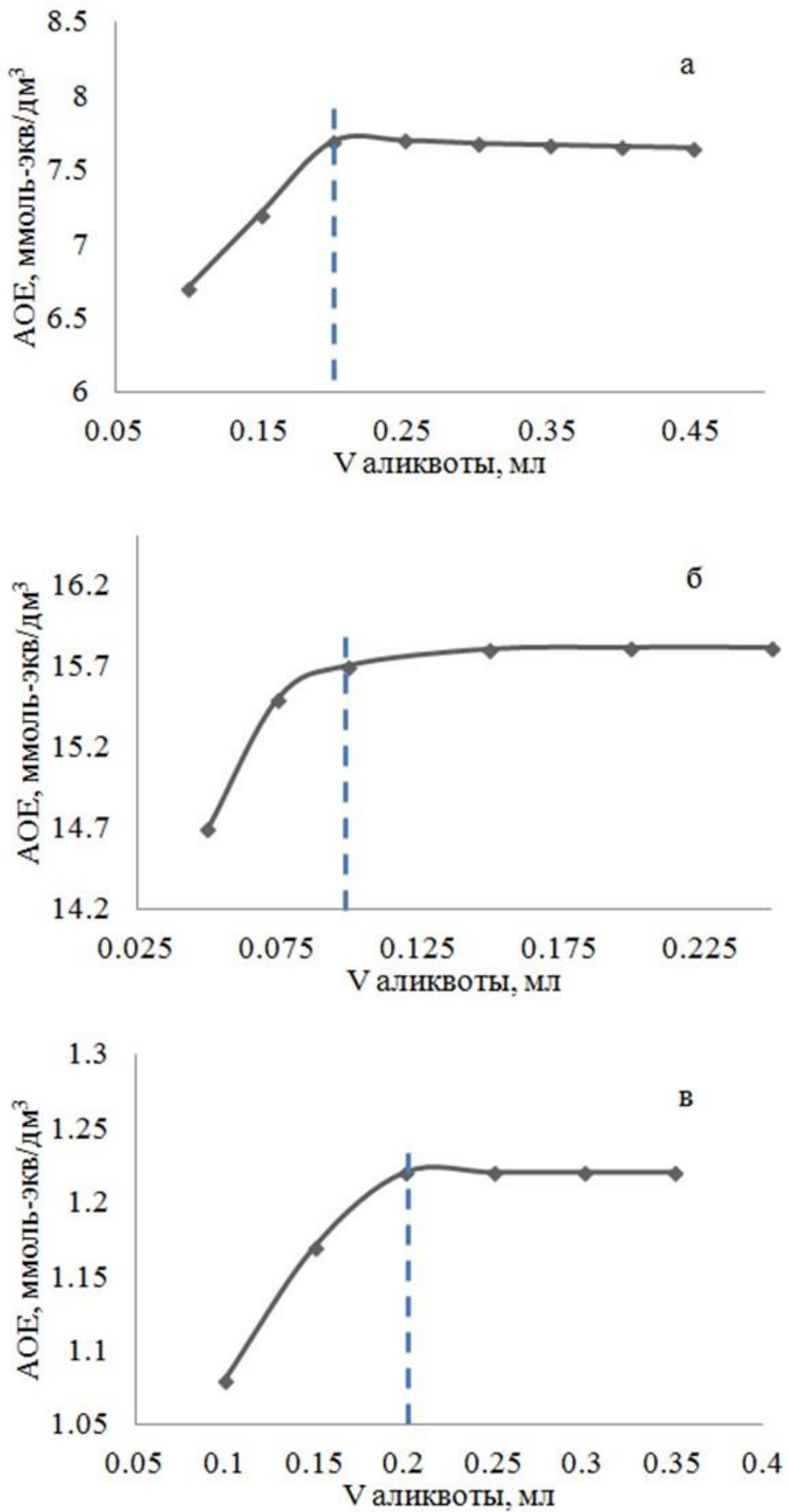


Рисунок 5.18 - Зависимость аналитического сигнала от аликвоты (а) цельной крови, (б) эритроцитарной массы, (в) плазмы крови. Общий фонового электролита: а,б -10 мл, в-1 мл

5.4.3 Исследование и выбор способа антикоагуляции цельной крови и гемолиза эритроцитов.

Одной из задач при анализе крови и ее фракций является предотвращение свертываемости исследуемых образцов. В лабораторной клинической диагностике для этих целей используются специальные вещества – антикоагулянты, к которым относятся гепарин, цитрат натрия и ЭДТА. Используемые в работе антикоагулянты приведены в таблице 5.19.

Таблица 5.19 - Антикоагулянты и их соотношения при смешивании с кровью

Антикоагулянт	Концентрация антикоагулянта*	Соотношение кровь : антикоагулянт
Гепарин	5000 ЕД/мл	19:1
Цитрат натрия	3.8%	19:1
ЭДТА	6.0%	9:1

* концентрация, рекомендованная к использованию в клинической диагностике

В дальнейших исследованиях данные приведены с учетом коэффициента разбавления за счет использования антикоагулянтов.

В таблице 5.20 приведены значения АОЕ, определенные для аскорбиновой кислоты, цистеина и их смеси в присутствии гепарина, цитрата натрия и ЭДТА. Антикоагулянты использованы в тех концентрациях, рекомендованных в клинической диагностике для предотвращения коагуляции цельной крови.

Таблица 5.20 - Результаты определения АОЕ модельных растворов антиоксидантов в присутствии антикоагулянтов (n=3, P=0.95)

АО	Введено, ммоль- экв/дм ³	Найдено, ммоль-экв/дм ³					
		Гепарин	R, %	Цитрат натрия	R, %	ЭДТА	R, %
АК	1.00	1.04±0.05	104	1.03±0.05	103	1.09±0.06	109
Цистеин	1.00	9.78±0.07	98	1.02±0.07	102	0.99±0.06	99
АК+Цистеин	2.00	2.03±0.08	101	2.11±0.07	105	1.9±0.1	97

Из данных таблицы 5.20 следует, что все перечисленные антикоагулянты практически не влияют на результаты определения АОЕ.

Поскольку эритроциты являются клеточной составляющей крови, то для исследования АОЕ цельной крови и эритроцитарной массы необходима предварительная пробоподготовка, связанная с разрушением мембран красных кровяных клеток, для того, чтобы обеспечить выход их содержимого в плазму или сыворотку крови. Процедура разрушения клеточных мембран эритроцитов называется гемолизом. Существует различные способы гемолиза эритроцитов [308]. Различают физический, химический, термический, осмотический, механический, лучевой способы получения гемолизата. Наиболее эффективными по полноте разрушения клеточных мембран считаются химический и термический способы. Однако, в химическом способе получения гемолизата необходимость использования сильных кислот ограничивает его применение в анализе, особенно, в тех ситуациях, когда очень важно поддерживать физиологические условия проведения эксперимента. В данной работе использовали термический способ получения гемолизата эритроцитов путем воздействия низких температур (-18° С). В процессе замораживания образцов внутриклеточная вода кристаллизуется, что способствует разрушению клеточных мембран [388].

В таблице 5.21 приведены значение АОЕ крови и ее гемолизата, полученного путем замораживания.

Таблица 5.21 - Результаты определения АОЕ цельной крови и гемолизата (n=3, P=0.95)

АОЕ крови, ммоль-экв/дм ³			
цельная кровь	S _r	гемолизат	S _r
1.23±0.08	0.03	9.6±0.6	0.03

АОЕ цельной крови без гемолиза обусловлена, по-видимому, только межклеточными АО, находящимися в плазме крови. В гемолизированных образцах в результате разрушения клеточных мембран, внутриклеточные АО попадают в межклеточное пространство и беспрепятственно вступают в реакцию с аналитическим реагентом. Поэтому для корректности и полноты оценки АОЕ цельной крови использовались термически гемолизированные образцы. Предположение, что межклеточные фракции крови (плазма, сыворотка) можно исследовать без предварительного гемолиза, подтверждают данные, приведенные в таблице 5.22. Данный факт весьма существенный, т.к. открывает возможность оценки АОЕ в масштабных клинических исследованиях.

Таблица 5.22 - Результаты определения АОЕ плазмы крови до и после замораживания (n=3, P=0.95)

№ образца	АОЕ плазмы, ммоль-экв/дм ³			
	До замораживания	S _r	После замораживания	S _r
1	0.96±0.04	0.02	0.92±0.06	0.03
2	1.22±0.05	0.02	1.19±0.07	0.03
3	1.10±0.06	0.03	1.14±0.04	0.02
4	1.21±0.06	0.02	1.23±0.05	0.02
5	1.20±0.06	0.02	1.12±0.09	0.04

В таблице 5.23 приведены результаты определения АОЕ одного и того же образца цельной крови, отобранной с перечисленными антикоагулянтами и подверженного термическому гемолизу.

Таблица 5.23 - АОЕ гемолизата цельной крови, отобранной с различными антикоагулянтами (n=3, P=0.95)

Антикоагулянт	АОЕ крови, ммоль-экв/дм ³	S _r
Гепарин	9.4±0.6	0.03
Цитрат натрия	9.6±0.6	0.03
ЭДТА	9.3±0.3	0.02

Таким образом, все перечисленные антикоагулянты могут быть использованы при определении АОЕ биологических образцов потенциометрическим методом, что видно при анализе реальных проб и индивидуальных антиоксидантов.

5.4.4 Определение АОЕ образцов крови и ее фракций и оценка достоверности полученных результатов

Результаты определения АОЕ крови и её фракций представлены в таблице 5.24.

Одним из подтверждений правильности получаемых результатов являются результаты анализа контрольного образца сыворотки крови, полученного предложенным потенциометрическим способом. В результате анализа контрольного образца сыворотки, концентрация антиоксидантов в котором составляет 1.55 ммоль-экв/дм³, найденная потенциометрическим методом АОЕ при комнатной температуре составила 1.07 ± 0.09 ммоль-экв/дм³, при $t = 37^\circ\text{C}$ - 1.50 ± 0.08 ммоль-экв/дм³. Соотношение между концентрацией АО в контрольном образце и найденными величинами АОЕ

составляет 1.5 ± 0.1 и 1.03 ± 0.05 при температурах 23°C и 37°C соответственно.

Таблица 5.24 - АОЕ цельной крови, плазмы и эритроцитарной массы ($n = 5$, $P = 0.95$) [389]

Объект	Цельная кровь		Эритроцитарная масса		Плазма	
	ммоль-экв/дм ³	S _r	ммоль-экв/дм ³	S _r	ммоль-экв/дм ³	S _r
1	12.0 ± 0.5	0.02	18.6 ± 0.7	0.05	1.01 ± 0.04	0.03
2	8.9 ± 0.1	0.05	19.5 ± 0.3	0.03	1.10 ± 0.07	0.03
3	11.6 ± 0.6	0.02	25.5 ± 0.6	0.07	1.59 ± 0.02	0.05
4	6.4 ± 0.3	0.02	18.5 ± 0.6	0.03	0.99 ± 0.06	0.03
5	10.3 ± 0.5	0.02	16.9 ± 0.5	0.04	0.96 ± 0.03	0.03
6	10.2 ± 0.2	0.01	22.8 ± 0.6	0.04	1.20 ± 0.08	0.02
7	12.6 ± 0.1	0.03	22.2 ± 0.8	0.04	1.06 ± 0.04	0.02
8	11.7 ± 0.3	0.01	18.8 ± 0.4	0.03	1.09 ± 0.05	0.03

Результаты сравнительного анализа образцов сыворотки крови методами TAS (Randox) и потенциометрии представлены в таблице 5.25. Результаты, полученные потенциометрическим методом при комнатной температуре (23°C), ниже результатов, полученных методом TAS (Randox) при $t = 37^{\circ}\text{C}$. Аналогичные данные получены в процессе анализа контрольного образца Randox. Соотношение между величинами (TAS/АОЕ), найденными методами Randox при $t = 37^{\circ}\text{C}$ и потенциометрии при комнатной температуре, составляет в среднем 1.40 ± 0.03 и 1.61 ± 0.04 для плазмы и сыворотки соответственно. Это явление, по-видимому, обусловлено разной биодоступностью групп, определяющих антиоксидантные свойства объектов, при разных температурах. Последнее подтверждается результатами исследования АОЕ плазмы и сыворотки крови потенциометрическим методом

при 37°C. Данные, полученные методами TAS (Randox) и потенциометрии при 37°C, достаточно близки: 1.01 ± 0.04 (для плазмы 44 пациентов) и 1.15 ± 0.03 (для сыворотки 10 пациентов). Несмотря на разницу в абсолютных значениях АОЕ, полученных при комнатной и физиологической температуре потенциометрическим методом, разброс соотношения результатов TAS/АОЕ статистически можно считать незначимым (1.40 ± 0.03 и 1.61 ± 0.04 для плазмы и сыворотки соответственно), что позволяет проводить исследования АОЕ крови и её фракций также и при комнатной температуре, учитывая соответствующие коэффициенты, что существенно может упростить процесс измерения.

Полученные результаты укладываются в пределы, указанные в литературе [390].

В таблице 5.27 приведены данные, полученные в результате анализа сыворотки крови пациентов, дифференцированных по гендерному и возрастному признакам.

Результаты хорошо согласуются с литературными данными [391]. Зафиксированная потенциометрическим методом разница в АОЕ сыворотки крови женщин разных возрастных групп соответствует литературным данным. Отсутствие такой разницы у мужчин также наблюдалось ранее другими авторами, пользовавшимися другими методами анализа [390].

Соответствие результатов потенциометрического определения АОЕ литературным данным, полученным независимыми методами, основанными на других принципах измерения, еще раз доказывает адекватность и достоверность полученных данных.

Таблица 5.25 - Результаты сравнительного анализа сыворотки (n = 5, P = 0.95) [389]

№	АОЕ, ммоль-экв/дм ³				
	TAS (Randox)	Потенциометрия			
		23°C	TAS/АОЕ	37°C	TAS/АОЕ
1	1.61±0.05 S _r =0.03	1.06±0.08 S _r =0.08	1.52	1.42±0.05 S _r =0.03	1.13
2	1.6±0.1 S _r =0.09	0.96±0.03 S _r =0.03	1.65	1.32±0.05 S _r =0.04	1.20
3	1.6±0.1 S _r =0.09	1.08±0.06 S _r =0.05	1.51	1.48±0.06 S _r =0.04	1.10
4	1.7±0.1 S _r =0.06	0.99±0.06 S _r =0.06	1.68	1.43±0.04 S _r =0.03	1.16
5	1.65±0.06 S _r =0.04	0.97±0.03 S _r =0.03	1.70	1.34±0.04 S _r =0.03	1.23
6	1.7±0.1 S _r =0.07	1.15±0.03 S _r =0.03	1.45	1.58±0.04 S _r =0.03	1.06
7	1.6±0.1 S _r =0.07	0.97±0.09 S _r =0.09	1.69	1.37±0.05 S _r =0.04	1.20
8	1.67±0.08 S _r =0.05	1.04±0.02 S _r =0.02	1.61	1.38±0.05 S _r =0.04	1.20
9	1.7±0.4 S _r =0.22	0.98±0.08 S _r =0.05	1.73	1.52±0.03 S _r =0.02	1.10
			1.61±0.04 S _r =0.03		1.15±0.03 S _r =0.04

В таблице 5.26 представлены результаты анализа плазмы крови группы относительно здоровых людей, получающих обычную диету.

Таблица 5.26 - АОЕ плазмы относительно здоровых людей (n = 5, P = 0.95) [389]

№	АОЕ, ммоль-экв/дм ³	S _r	Диапазон значений, полученный методом TAS (Randox)
1	1.00±0.07	0.03	0.83÷1.73
2	1.59±0.02	0.01	
3	0.90±0.06	0.03	
4	0.91±0.01	0.003	
5	0.86±0.04	0.02	
6	0.85±0.06	0.03	

Таблица 5.27 - АОЕ сыворотки мужчин и женщин различных возрастных групп (n = 5, P = 0.95) [389]

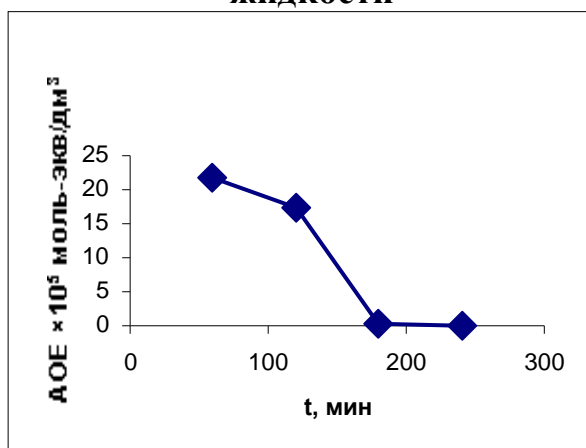
АОЕ, ммоль-экв/дм ³			
Женщины		Мужчины	
20 – 30 лет	60 – 75 лет	20 – 30 лет	60 – 75 лет
0.9 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.2

5.4.5 Определение АОЕ биологических образцов в процессе процедуры гемодиализа

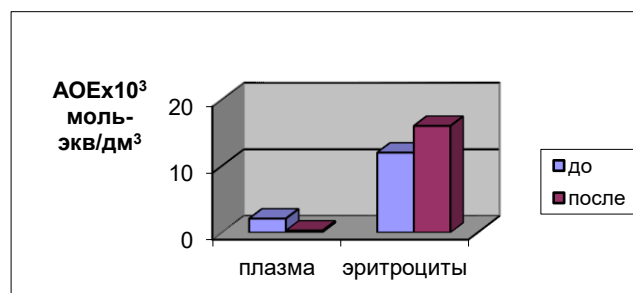
На рисунке 5.19 представлены результаты потенциометрического определения АОЕ диализной жидкости во время процедуры гемодиализа, эритроцитарной массы и плазмы крови, отобранной до и после процедуры гемодиализа для 5 пациентов. Анализируя полученные данные можно отметить, что во всех случаях происходит потеря пациентами антиоксидантов с диализной жидкостью, особенно в первый час процедуры гемодиализа. У пациентов 1, 4 и 5 наблюдается одинаковая тенденция изменения АОЕ диализной жидкости и фракций крови. У всех пациентов, кроме 2, происходит

уменьшение АОЕ плазмы. Уменьшение значения АОЕ плазмы крови может быть связано с потерей антиоксидантов во время процедуры гемодиализа. В эритроцитарной массе во всех случаях, кроме 3, напротив, наблюдается увеличение параметра АОЕ. Можно предположить, что такое изменение связано со специфическим откликом организма на потерю антиоксидантов плазмой. Если принять такое предположение, то характер изменения АОЕ пациента №2 можно объяснить тем, что отклик организма произошел раньше, чем у других пациентов (между 3 и 4 часом процедуры гемодиализа). У пациента №3 значение параметра АОЕ снизилось как в плазме, так и в эритроцитарной массе, что можно объяснить низкой активностью системы синтеза антиоксидантов в эритроцитах.

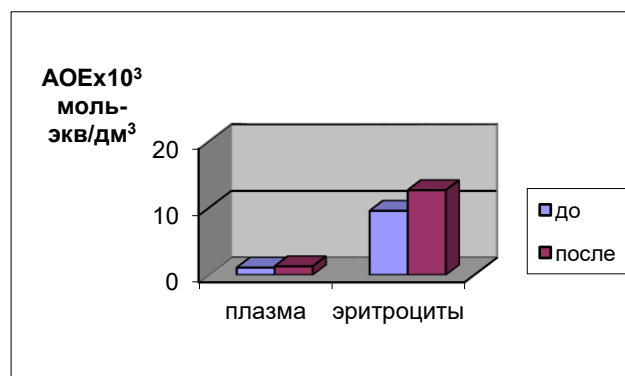
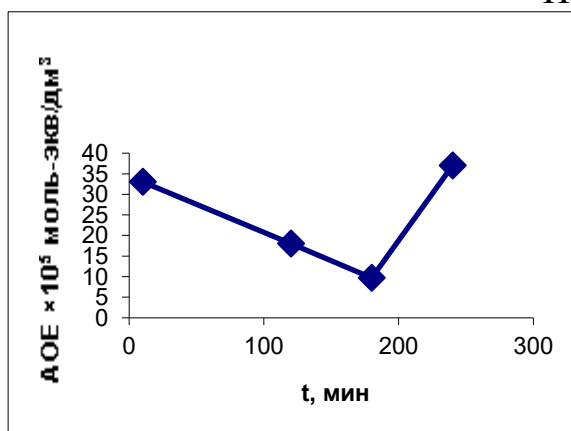
Изменение АОЕ диализной жидкости



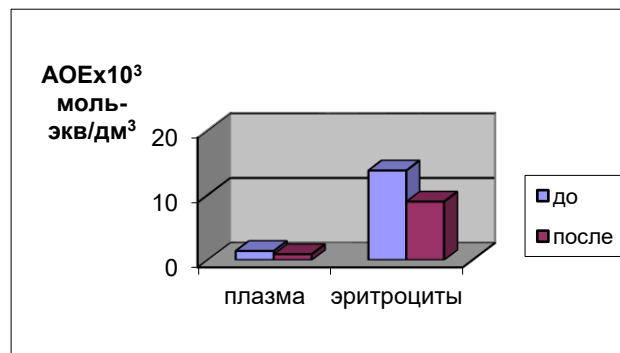
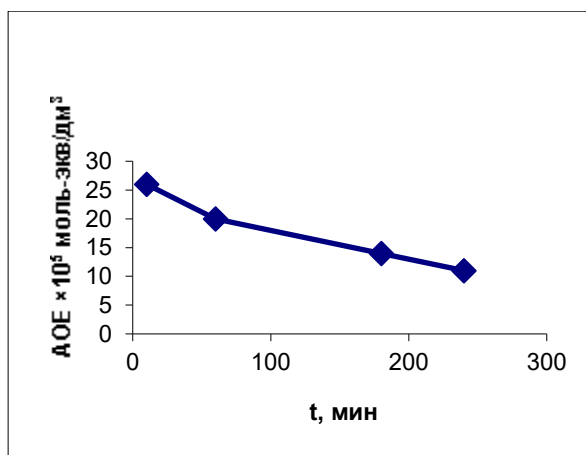
Изменение АОЕ фракций крови



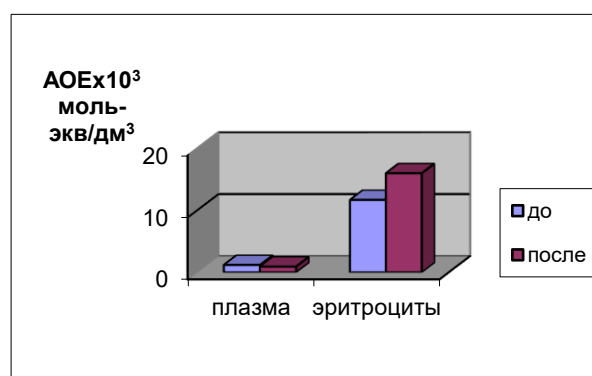
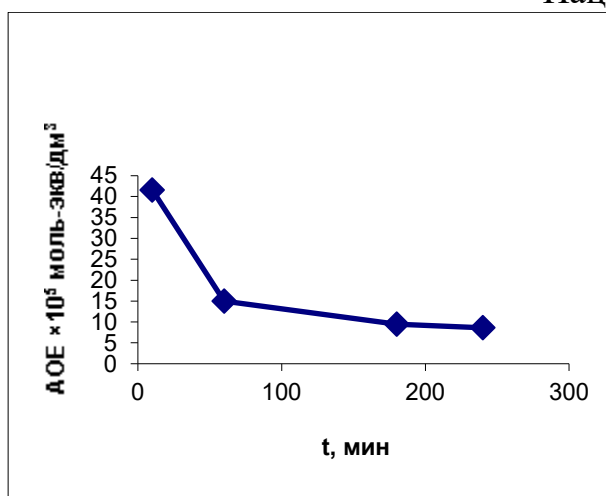
Пациент №1



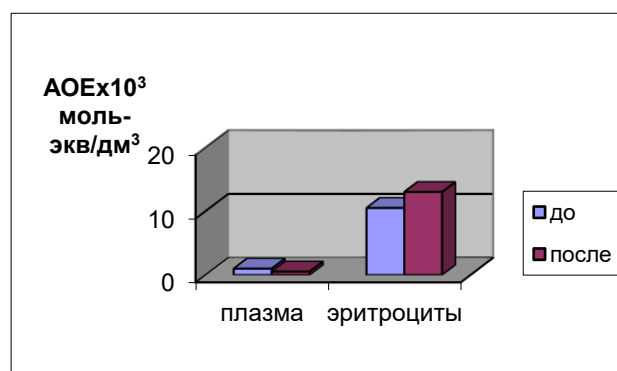
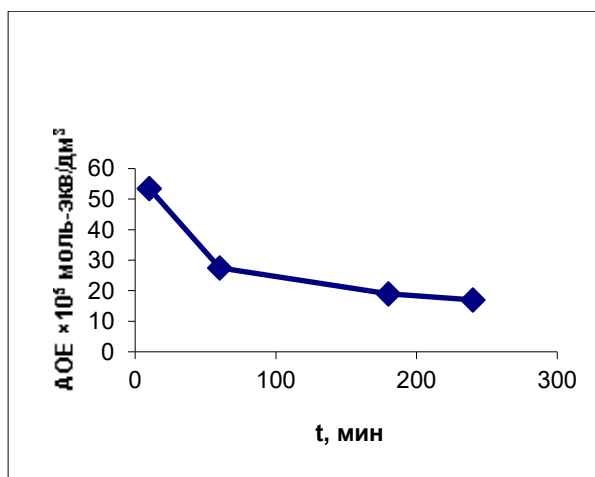
Пациент №2



Пациент №3



Пациент №4



Пациент №5

Рисунок 5.19 - Изменение АОЕ диализной жидкости и фракций крови при проведении процедуры гемодиализа

Полученные данные демонстрируют высокую важность мониторинга АОЕ биологических объектов для пациентов, находящихся на процедуре

гемодиализа. Данная информация может помочь в корректировке терапии пациентов с помощью препаратов с антиоксидантным действием.

5.5 Определение АОЕ и АРЕ витаминных препаратов

В настоящее время антиоксидантные лекарственные препараты широко применяются в качестве основных средств терапии или как дополнительные средства коррекции при лечении широкого круга заболеваний. Следует отметить, что в современной классификации лекарственных средств существует раздел: «Антигипоксанты и антиоксиданты» [392].

Применяемые в фармации природные антиоксиданты легко и органично вступают в метаболические процессы в организме и практически не дают побочных эффектов, присущих синтетическим препаратам [393]. Однако их состав невозможно регулировать, поэтому в современной терапии также широкое применение нашли различные витаминные препараты для профилактики и терапии многих системных заболеваний [394]. В связи с этим исследование лекарственных препаратов с антиоксидантными свойствами является современной актуальной задачей.

В таблице 5.28 представлены результаты определения суммарного количества моль эквивалентов АО, найденного в витаминных препаратах на основе аскорбиновой кислоты в водной среде и витаминных комплексов на основе А/С/Е - витаминов в водно-этанольной среде [395], рассчитанные на 1 таблетку для таблетированных форм и на 1 мл для растворов ($\sum n_{\text{эксп}}$) в сравнении с содержанием, заявленным производителем ($\sum n_{\text{произ}}$).

Данные таблицы демонстрируют хорошую согласованность экспериментально полученных значений антиоксидантной и антирадикальной емкости со значениями, рассчитанным исходя из заявленного производителем содержания действующих в них веществ. Коэффициент корреляции результатов составил 0,97. Высокая степень корреляции обусловлена тем, что основой препаратов является аскорбиновая кислота, которая вступает

одинаково как в реакции переноса электрона, так и в реакции переноса атома водорода.

Таблица 5.28 - Результаты измерений АОЕ и АРЕ витаминных препаратов и витаминных комплексов (n=10, P=0.95)

№	Наименование	АОЕ		АРЕ		$\sum n_{\text{произ}}, 10^{-4}$ МОЛЬ
		$\sum n_{\text{эксп}}, 10^{-4}$ МОЛЬ	S_r	$\sum n_{\text{эксп}}, 10^{-4}$ МОЛЬ	S_r	
1	АК в драже*	6.30	0.06	6.71	0.07	5.68
2	Мультифорт*	7.99	0.01	6.30	0.02	5.68
3	АК р-р для инъекций**	6.69	0.06	6.63	0.03	2.84
4	АК с глюкозой*	3.78	0.04	3.57	0.02	7.10
5	Веторон**	7.05	0.04	6.90	0.08	5.43
6	Морской кальций*	1.57	0.04	1.20	0.05	1.14
7	АК с декстрозой*	21.15	0.02	21.78	0.03	5.57
8	Перфектил*	3.30	0.04	5.40	0.02	5.68

* - рассчитано на 1 таблетку

** - рассчитано на 1 мл раствора

5.6 Определение АОЕ растворов для офтальмологического применения

Существует большое количество работ, показывающих эффективность применения антиоксидантов для профилактики и лечения различных заболеваний глаз [396-399]. Однако исследования, направленные на изучение

антиоксидантных и противорадикальных свойств самих офтальмологических средств, практически не представлены. Таким образом, исследование офтальмологических средств с антиоксидантными свойствами, является одной из актуальных задач.

В таблице 5.29 приведены значения периодов полупревращения ($\tau_{1/2}$) и АОЕ, полученные потенциометрическим методом, и значения противорадикальной активности, полученные спектрофотометрическим методом на моделиДФПГ для исследуемых лекарственных форм для офтальмологического применения [400]. Период полупревращения обратно пропорционален скорости химической реакции между антиоксидантом и окислителем, следовательно, является одним из показателей реакционной способности.

Также проведены корреляционные исследования полученных значений антиоксидантной активности для лекарственных форм с величинами ССД (средняя суточная доза). Наблюдается тенденция к обратной корреляции (степень корреляции -42%), что может свидетельствовать об обратной связи между величиной АОЕ и количеством действующего вещества на суточный прием, необходимого для достижения терапевтического эффекта.

В таблице 5.30 приведены данные о соотношении средних значений АОЕ и ПРА к содержанию основного действующего вещества в моль/л (С, М). Данные величины АОЕ/С и ПРА/С могут служить показателем эффективности антиоксидантного и противорадикального действия основного вещества, т.к. представлены в отношении к содержанию данного вещества в препарате. Для препарата Офтан Катахром данные значения не рассчитывались, т.к. в его составе присутствует белок, потенциально обладающий АОЕ, для которого отсутствует четко установленное значение молекулярной массы.

Наименьший период полупревращения характерен для препарата Квинакс, наибольшим периодом полупревращения обладает препарат Люксфен. Период полупревращения не зависит от концентрации определяемого вещества, и может являться дополнительной характеристикой

действия препаратов с точки зрения эффективности их воздействия и пролонгированного действия, а также сроков хранения.

Степень корреляции результатов определения АОЕ и ПРА, полученных с использованием различных подходов, составляет 96%. Высокая степень корреляции, возможно, обусловлена тем, что в основе используемых способов лежит перенос электрона с АО на окислитель.

Таблица 5.29 - Значения АОЕ и ПРА лекарственных форм (n=3, P=0.95)

№	Название препарата	$\tau_{1/2}$, мин	АОЕ, 10^{-4} ммоль-экв/дм ³	S_r	ПРА (%)	S_r
1	Эмоксипин (капли для глаз)	7.7±0.4	138±7	0.05	98±3	0.03
2	Офтан Катахром	3.0±0.3	6.0±0.7	0.1	7.2±0.6	0.08
3	Квинакс	0.78±0.07	2.9±0.3	0.09	20±1	0.06
4	Офтан Тимолол	5.9±0.2	5.2±0.2	0.04	4.9±0.2	0.03
5	Офтан Дексаметазон	6.8±0.3	6.5±0.9	0.1	9±1	0.07
6	Люксфен	9.07±0.09	2.90±0.03	0.01	-	-
7	Каталин	4.4±0.1	2.37±0.07	0.03	8.8±0.4	0.04
8	Эмоксибел	2.6±0.2	3.6±0.3	0.08	5.0±0.3	0.06
9	Эмоксипин (раствор для инъекций)	2.5±0.1	3.9±0.2	0.05	5.6±0.3	0.05
10	Визомитин	7.1±0.4	0.01±0.000(6)	0.06	0.04±0.00(3)	0.07
11	Тауфон	-	-	-	-	-

Таблица 5.30 - Значения АОЕ/С и ПРА/С лекарственных форм для офтальмологического применения

№	Название препарата	АОЕ/С	ПРА(%)·10 ⁴ /С
1	Эмоксипин (капли для глаз)	0.29±0.02	0.21±0.02
2	Офтан Катахром	-	-
3	Квинакс	1.0±0.2	6.6±0.3
4	Офтан тимолол	0.032±0.003	0.031±0.002
5	Офтан дексаметазон	0.26±0.04	0.36±0.04
6	Люксфен	0.052±0.003	-
7	Каталин	2.16±0.02	6.5±0.6
8	Эмоксибел	0.008±0.001	0.011±0.001
9	Эмоксипин (раствор для инъекций)	0.008±0.001	0.012±0.001
10	Визомитин	3.5±0.3	14±1
11	Тауфон	-	-

У всех изученных препаратов (за исключением Тауфона) была оценена АОЕ. Также у всех препаратов, за исключением Тауфона и Люксфена была выявлена противорадикальная активность. Наиболее высокие значения АОЕ и ПРА были получены при исследовании капель для глаз Эмоксипин. Различия в полученных результатах АОЕ статистически значимы для всех препаратов за исключением Люксфена и Квинакса, Эмоксибела и Эмоксипина (раствор для инъекций), Офтан Катахрома и Офтан Дексаметазона. Различия в полученных результатах ПРА статистически значимы для всех препаратов за исключением Эмоксибела и Эмоксипина (раствор для инъекций), Офтан Тимолола и Эмоксибела, Офтан Дексаметазона и Каталина. Следует отметить, что раствор для инъекций Эмоксипин и раствор для внутриглазного введения Эмоксибел имеют идентичный состав основного действующего вещества

(гидрохлорид метилэтилпиридинола, 10 мг/мл. Статистически значимые различия между препаратами Эмоксипин, Эмоксипин (раствор для инъекций) и Эмоксibel может быть обусловлено тем, что в составе капель для глаз Эмоксипин в качестве вспомогательного вещества присутствует целлюлоза - углевод, состоящий из остатков β -глюкозы, которая потенциально может проявлять восстановительные свойства. Исследование противорадикальной активности препарата Люксфен невозможно в виду того, что в водно-этанольной среде данный препарат образует малорастворимое соединение.

Максимальные относительные значения АОЕ/С и ПРА/С были выявлены у препаратов Визомитин, Квинакс, Каталин. Различия в АОЕ/С статистически значимы для всех препаратов за исключением Эмоксипина (раствор для инъекций) и Эмоксibела, имеющих, как отмечалось выше, аналогичный состав. Различия в ПРА/С статистически значимы для всех препаратов за исключением Эмоксипина (раствор для инъекций) и Эмоксibела, Квинакса и Каталина.

Полученные значения АОЕ/С и ПРА/С коррелируют с клинической эффективностью изучаемых лекарственных форм, в частности, при сравнительном изучении влияния глазных капель Каталин и Тауфон при терапии возрастной катаракты показано, что антикатарактальный эффект Каталина существенно выше эффекта Тауфона [401]. Аналогичные закономерности были получены при исследовании АОЕ и ПРА этих препаратов. Также Каталин (Пиреноксин) может эффективно применяться в предоперационный период для подавления окислительного стресса как пациентами со старческой и диабетической катарактой [402]. Существуют сравнительные исследования влияния применения препарата Квинакс в лечении осложнённой катаракты [403]. Показано, что применение Квинакс способствует восстановлению хрусталиковой ткани и, как следствие, улучшению и стабилизации зрительных функций.

Таким образом, в данной части работы исследованы АОЕ и ПРА лекарственных форм для офтальмологического применения с

антиоксидантными свойствами методами потенциометрии и спектрофотометрии на различных моделях окислителя (нерадикальной и радикальной природы). Полученные результаты представляют интерес, т.к. клиническая эффективность исследуемых лекарственных форм, в том числе, как показано в представленной работе, может быть связана с величиной АОЕ и ПРА. Кроме того, перечень антиоксидантов для лечения офтальмологических заболеваний, различающихся по спектру и интенсивности своей активности, достаточно широк для оптимального выбора их в лечебных или профилактических целях. Информация об антиоксидантных свойствах офтальмологических лекарственных форм может быть использована для повышения эффективности лечения заболеваний различного генеза.

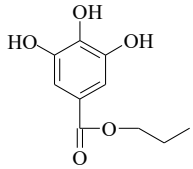
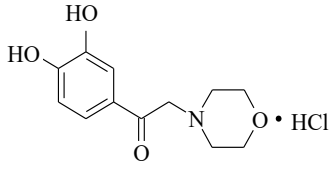
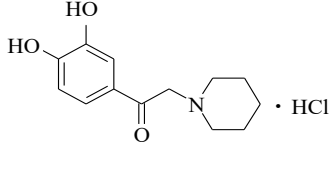
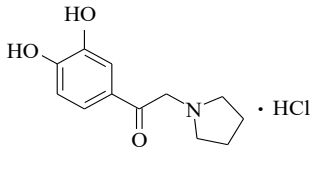
5.7 Определение АОЕ и АРЕ синтезированных соединений

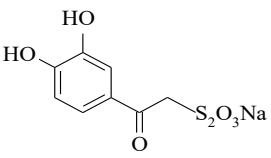
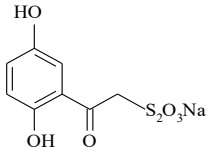
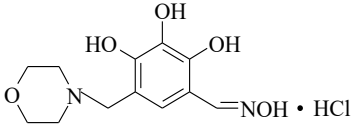
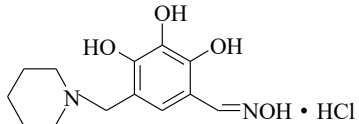
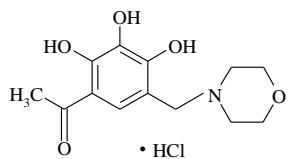
Большой интерес в последнее время вызывают исследования в области направленного синтеза целевых молекул с различными видами биологической активности, в том числе и антиоксидантной.

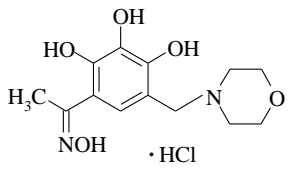
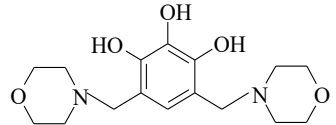
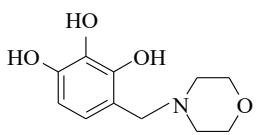
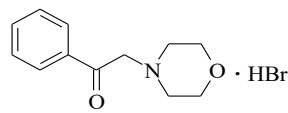
5.7.1 Определение АОЕ производных пирогаллола, пирокатехина и гидрохинона

Ранее в экспериментах на животных и модели *in vitro* с олеиновой кислотой было показано, что вещества ряда синтетических соединений, которые представляют собой производные пирогаллола, пирокатехина и гидрохинона, обладают противолучевыми и антиокислительными свойствам [404]. В таблице 5.31 приведены результаты потенциометрического определения АОЕ 0,01 М водных растворов ряда синтетических соединений этой группы.

Таблица 5.31 - Стехиометрические коэффициенты реакции (3.15) с синтетическими АО ($C=10^{-4}M$)

№	Название соединения/ структурная формула	Экспериментально полученные значения ($n=6, p=0,95$)			Ожидае- мые значения коэф. реакции (3.15), $n:q$
		АОЕ, ммоль- экв/дм ³	S_r	$n:q$	
1	2	3	4	5	6
1	Пропилгаллат 	39.8	0.03	4:1	2:1
2	ω -морфолино-3,4- диоксиацетофенон, гидрохлорид 	36.5	0.04	4:1	2:1
3	ω -пиперидино-3,4- диоксиацетофенон, гидрохлорид 	30.4	0.02	3:1	2:1
4	ω -пирролидино-3,4- диоксиацетофенон, гидрохлорид 	36.5	0.04	4:1	2:1

1	2	3	4	5	6
5	<p>3,4-диокси-ω- тиосульфonatoацетофенон, натриевая соль</p> 	36.9	0.01	4:1	2:1
6	<p>2,5-диокси-ω- тиосульфonatoацетофенон, натриевая соль</p> 	31.4	0.06	3:1	2:1
7	<p>Оксим-5-морфолинометил пирогаллового альдегида гидрохлорид</p> 	50.4	0.04	5:1	2:1
8	<p>Оксим-5-пиперидинометил пирогаллового альдегида гидрохлорид</p> 	50.0	0.01	5:1	2:1
9	<p>2,3,4-триокси-5- морфолинометилацетофенон, гидрохлорид</p> 	22.9	0.09	2:1	2:1

1	2	3	4	5	6
10	5-морфолинометилгаллатацето- фенол, оксим, гидрохлорид 	20.9	0.04	2:1	2:1
11	4,6-бис-морфолинометил пирогаллол 	18.4	0.07	2:1	2:1
12	4-морфолинометил пирогаллол 	25.4	0.04	2:1	2:1
13	ω-морфолиноацетофенон, гидробромид 	8.6	0.05	1:1	—

Известно, что антиоксидантные свойства полифенольных веществ обусловлены наличием и количеством ОН-групп в структуре молекулы. Как показали результаты исследования, введение дополнительных функциональных групп приводят к изменению АОЕ веществ по сравнению с ожидаемой для чистых полифенолов:

1. АОЕ веществ, содержащих карбонильную группу, тиосульфатную и оксимную группы (соединения 1-8), была выше ожидаемой, как и в случае пирогаллола и пирокатехина, что может быть связано с одновременным протеканием конкурирующей реакции комплексообразования (глава 3.5);

2. близкое соседство метильного остатка с оксимной и кетогруппами приводило к уменьшению АОЕ вещества (соединения 9, 10);
3. ди- и моно-морфолинометильные производные пирагаллола также проявляют меньшую АОЕ, согласно ожидаемой (соединения 11,12);
4. гидробромид ω -морфолиноацетофенона (соединение 13) занимает до некоторой степени промежуточное положение: в этом соединении при бензольном кольце нет ОН-групп, которые обеспечивают антиоксидантные свойства вещества, но с другой стороны, здесь есть карбонильная группа, присутствие которой в соседнем положении с бензольным кольцом, как показали приведенные выше результаты приводило к увеличению измеряемой величины АОЕ.

Таким образом, предложенный подход позволяет исследовать АОЕ вновь синтезированных соединений, устанавливать возможную взаимосвязь их антиоксидантных свойств со структурой вещества. Такие исследования могут быть использованы в области направленного синтеза целевых молекул с заданными свойствами.

5.7.2 Определение АОЕ и АРЕ синтезированных аддуктов азолоазинов с фенольными фрагментами

Известно, что при возникновении заболеваний вирусной этиологии в организме наступает состояние окислительного стресса, связанное с избыточной генерацией активных форм кислорода радикальной и нерадикальной природы, которое утяжеляет течение заболевания [1, 405]. Например, поражение легких с развитием легочного дистресс синдрома, отека легких, приводит к устойчивому генерированию синглетного кислорода и пероксинитрита, что становится основным фактором, вызывающим деструктивные процессы, усиливающие поражение легочной ткани [406, 407]. Таким образом, при развитии инфекционных заболеваний очень важно

проводить не только лекарственную (противовирусную) терапию, но и контролировать окислительно-восстановительное состояние организма, корректируя его препаратами антиоксидантного действия [408]. Весьма важным является поиск доступных веществ с антиоксидантными свойствами, способных регулировать окислительно-восстановительное состояние организма. С целью создания препаратов двойного действия (противовирусного/антиоксидантного) на кафедре биоорганической и молекулярной химии УрФУ были синтезированы новые производные азагетероциклов, обладающие противовирусными свойствами, содержащие остатки моно-, двух- и полиатомных фенолов. В таблице 5.32 представлены структурные формулы азолазинов, отвечающих за противовирусную активность и фрагментов фенолов, отвечающих за антиоксидантное действие. Структуры аддуктов азолазинов с полифенолами приведены в таблице 2.5 (глава 2).

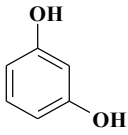
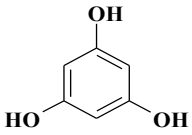
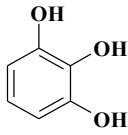
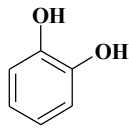
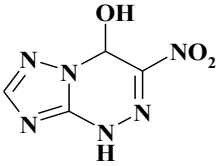
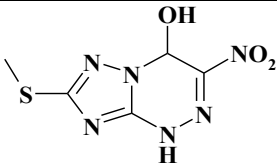
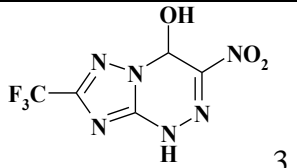
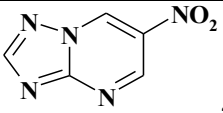
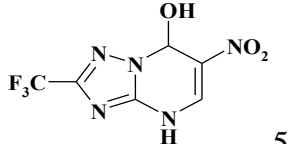
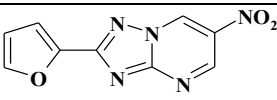
Процесс переноса электрона исследовали с использованием циклической вольтамперометрии и потенциометрического определения АОЕ.

На рисунке 5.19 представлены циклические вольтамперограммы фенолов, используемых для синтеза аддуктов.

По результатам ЦВА видно, что процесс окисления пирокатехина протекает квазиобратимо, а для пирогаллола, флороглюцина и резорцина характерно необратимое окисление. Также можно отметить, что окисление флороглюцина и резорцина происходит в более положительной области, что говорит об уменьшении их восстановительной способности по сравнению с пирогаллолом и пирокатехином. Вероятно, это связано с различным положением ОН-групп – орто-положение групп относительно друг друга в молекулах пирогаллола и пирокатехина и мета-положение в молекулах флороглюцина и резорцина, что согласуется с литературными данными [331]. Данные характеристики говорят о затрудненном переносе электрона от функциональных ОН- групп молекул флороглюцина и резорцина, что приводит к менее выраженному антиоксидантному действию. С этой точки

зрения наиболее перспективными являются соединения пирогаллол и пирокатехин.

Таблица 5.32 - Структурные формулы азолазинов и полифенолов, используемых для синтеза аддуктов и их обозначения

Антиоксидантный фрагмент Противовирусный фрагмент	Резорцин	Флороглюцин	Пирогаллол	Пирокатехин
	 а)	 б)	 в)	 г)
-	а	б	в	г
 1	1а	1б	1в	1г
 2	2а	2б	2в	2г
 3	3а	3б	3в	3г
 4	4а	4б	4в	4г
 5	5а	5б	5в	5г
 6	6а	6б	6в	6г

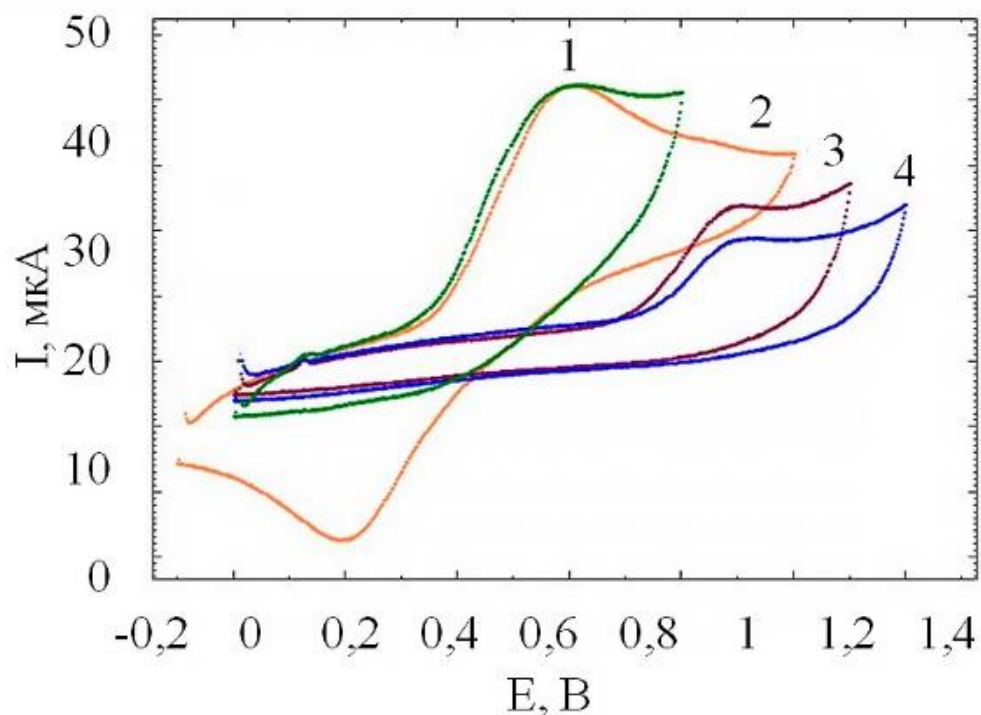


Рисунок 5.20 - Циклические вольтамперограммы полифенолов, зарегистрированные на СУЭ. Фон: 0,1 М NaCl. Скорость сканирования потенциала 0,05 В/с

1 – Пирогаллол, 2 – Пирокатехин, 3 – Флороглюцин, 4 - Резорцин

На рисунках 5.21 и 5.22 приведены циклические вольтамперограммы пирокатехина и пирогаллола и их аддуктов соответственно. Перераспределение электронной плотности сопряженной системы на атомах азота азолазинового фрагмента приводит к затруднению процесса передачи электрона с фенольных ОН-групп аддуктов в процессе окисления, и наблюдается смещение потенциалов окисления в более положительную область относительно исходных фенолов. Кроме того, в случае аддуктов пирогаллола, для соединений 1в, 4в, 5в, 6в наблюдается двухступенчатый процесс окисления. Первая ступень окисления по положению пика близка к окислению индивидуального пирогаллола, вторая ступень располагается в более положительной области потенциалов, т.е. окисление затруднено. Такая тенденция характерна в большей степени для замещенных 6-нитро-триазолопиримидин-7-олов.

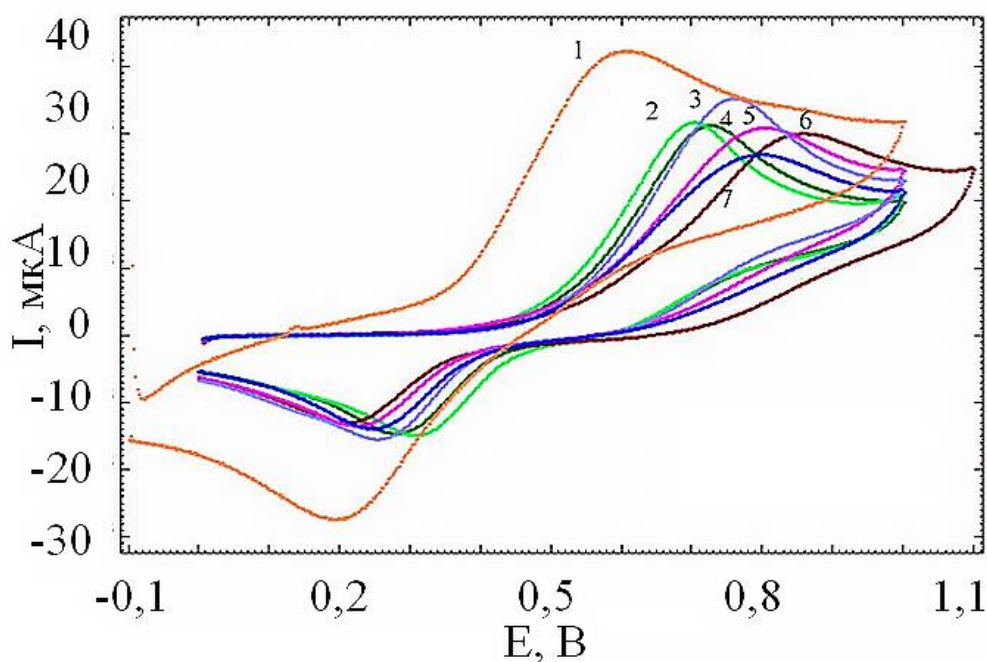


Рисунок 5.21 - Циклические вольтамперограммы пирокатехина и его аддуктов, зарегистрированные на СУЭ. Фон: 0,1 М NaCl. Скорость сканирования потенциала 0,05 В/с. 1 – г, 2 – 2г, 3 – 5г, 4 – 1г, 5 – 4г, 6 – 3г, 7 – 6г

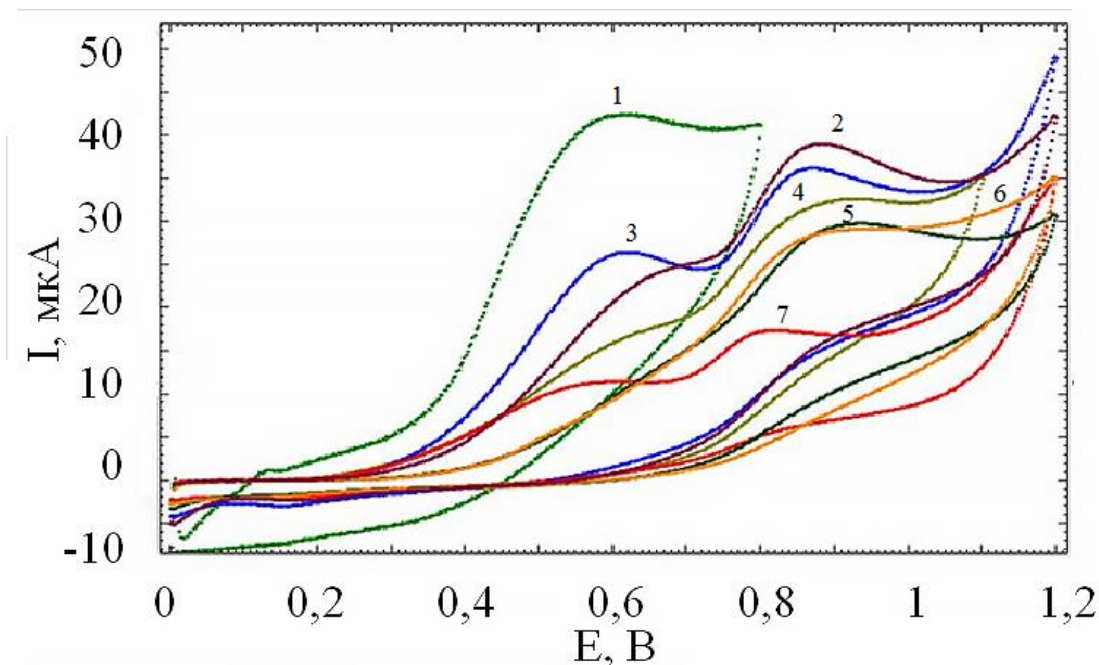


Рисунок 5.22 - Циклические вольтамперограммы пирогаллола и его аддуктов, зарегистрированные на СУЭ. Фон: 0,1 М NaCl. Скорость сканирования потенциала 0,05 В/с. 1 – в, 2 – 1в, 3 – 5в, 4 – 6в, 5 – 3в, 6 – 2в, 7 – 4в

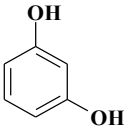
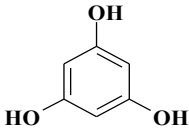
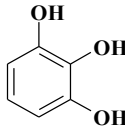
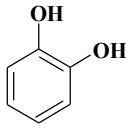
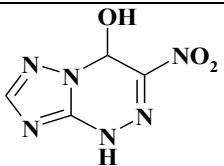
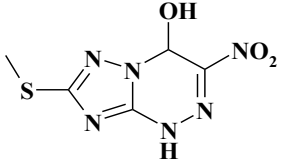
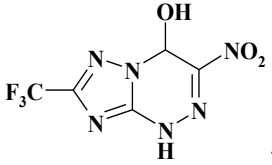
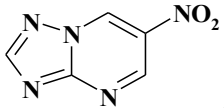
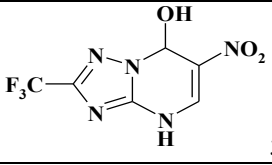
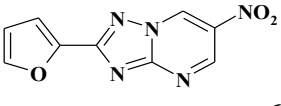
В таблице 5.33 представлены потенциалы окисления фенолов и их аддуктов и значения тока пика окисления.

Таблица 5.33 - Потенциалы и токи пиков окисления фенолов и их аддуктов

Фенол	Аддукт	E_{ox} , В	i_{ox} , 10^{-5} А	$E_{геох}$, В	$i_{геох}$, 10^{-5} А
Пирокатехин		0.584	2.629	0.205	2.318
	1Г	0.710	2.044	0.283	1.158
	2Г	0.701	2.163	0.303	1.216
	3Г	0.842	1.450	0.222	0.894
	4Г	0.784	1.522	0.225	0.970
	5Г	0.747	2.223	0.251	1.202
	6Г	0.776	1.353	0.244	1.067
Пирогаллол		0.554	1.727		
	1В	0.615 0.864	0.387 0.967		
	2В	0.854	0.742		
	3В	0.896	0.831		
	4В	0.527 0.793	0.288 0.360		
	5В	0.579 0.850	0.919 0.829		
	6В	0.584 0.867	0.170 0.618		

В таблице 5.34 представлены результаты исследования АОЕ аддуктов в концентрации 10^{-4} моль/дм³ предложенным потенциометрическим способом.

Таблица 5.34 - АОЕ аддуктов азолазинов с полифенолами (10^{-4} моль/дм³ N=5, P=0,95) [409]

<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Противо-вирусный фрагмент</div> <div style="margin-left: 10px;">Антиоксидантный фрагмент</div> </div>	Резорцин  а)	Флороглюцин  б)	Пирогаллол  в)	Пирокатехин  г)
-	-	2.8±0.2 (0.08)	5.2±0.1 (0.02)	4.9±0.2 (0.04)
 1	-	1.49±0.03 (0.02)	2.93±0.03 (0.01)	3.56±0.07 (0.02)
 2	1.23±0.02 (0.02)	1.37±0.03 (0.02)	4.21±0.09 (0.02)	2.9±0.2 (0.08)
 3	0.97±0.07 (0.07)	1.32±0.05 (0.04)	3.18±0.03 (0.01)	4.31±0.04 (0.01)
 4	-	1.04±0.04 (0.04)	1.53±0.01 (0.01)	2.1±0.2 (0.08)
 5	1.02±0.02 (0.02)	1.22±0.04 (0.03)	3.7±0.1 (0.03)	4.7±0.3 (0.21)
 6	-	1.08±0.08 (0.07)	3.00±0.3 (0.09)	2.34±0.08 (0.03)

Практически все аддукты, за исключением резорцина и некоторых его производных, проявляют антиоксидантные свойства. Снижение АОЕ аддуктов относительно фенолов согласуется с данными, полученными методом циклической вольтамперометрии. Как и предполагалось ранее, соединения с фрагментами пирокатехина, пирогаллола проявляют большую АОЕ относительно аддуктов, содержащих резорциновый и флороглюциновый

фрагмент. На величину АОЕ также влияет тип азолазинового фрагмента. Аддукты, в основе которых лежит 6-нитро-триазолотриазин-7-ол проявляют большую АОЕ, чем соединения на основе 6-нитро-триазоло-пиримидин-7-олов. Это может быть объяснено тем, что появление в азинах дополнительного атома азота N5 (положение 5) приводит к смещению электронной плотности с фенольного фрагмента на азолазиновый фрагмент, что облегчает процесс переноса электрона при окислении.

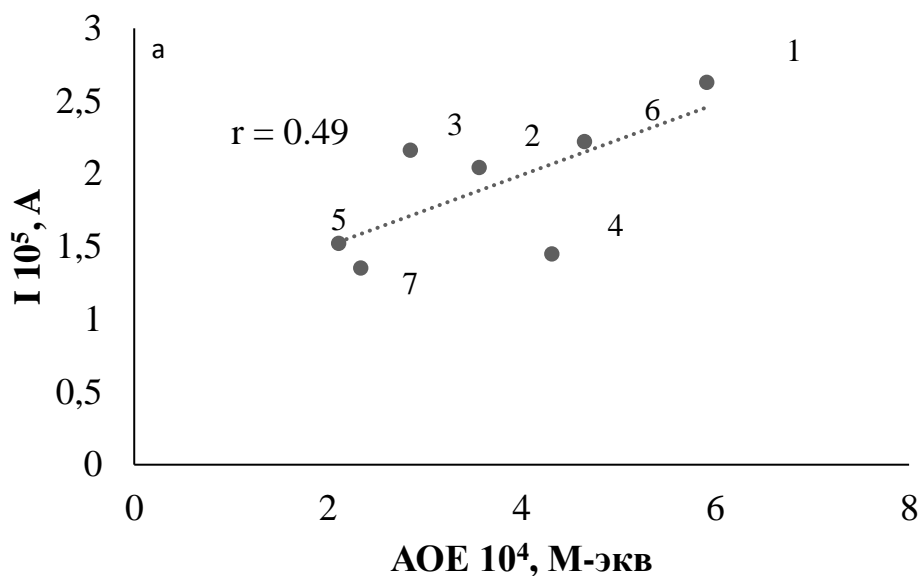
Наблюдается тенденция к корреляции между величиной тока пика окисления исходных фенолов и аддуктов 6-нитро-триазолотриазин-7-олов со значениями АОЕ ($r=0.49$), а также корреляция между величиной тока второго пика окисления аддуктов триазоло-пиримидин-7-олов и АОЕ ($r=0.69$) (рисунок 5.23).

В таблице 5.35 представлены результаты определения АРЕ аддуктов азолазинов с полифенолами. Следует отметить, что исходные азолазины не обладали АОЕ, тогда как АРЕ была определена для некоторых из них. В целом, значения АРЕ аддуктов выше, чем АОЕ, что говорит о том, что для данных структур больше характерны реакции переноса протона.

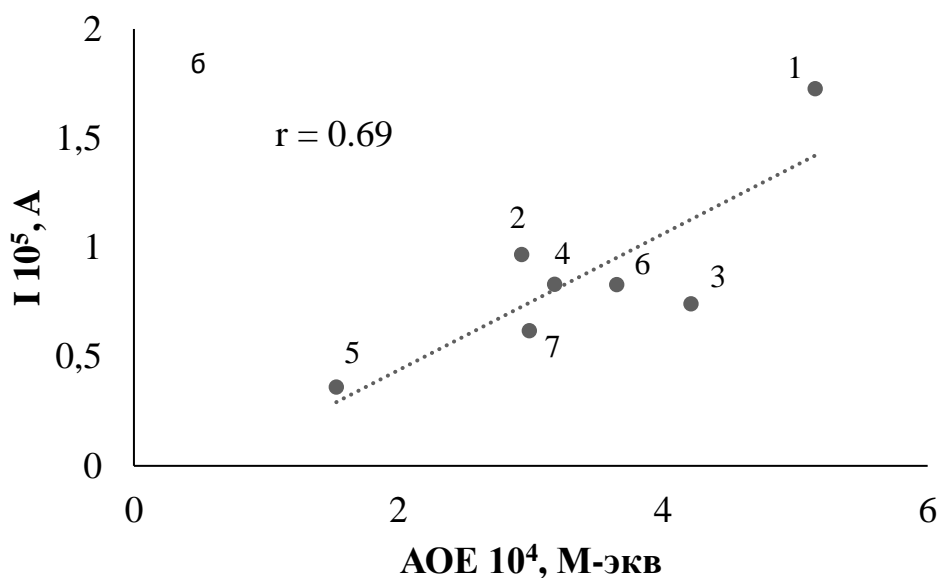
В случае АРЕ наблюдается более сложная взаимосвязь способности переноса атома водорода со значением АРЕ. Наибольшее значение было получено для аддукта фторированного азолазина с пирокатехином.

Поскольку эти объекты являются новыми и данные об их антиоксидантных свойствах отсутствуют, были проведены корреляционные исследования с применением независимых методов. В таблице 5.36 Представлены коэффициенты корреляции для всех применяемых методов (потенциометрических и спектрофотометрических с использованием реактивов Фолина-Чокальтеу иДФПГ). Из представленных данных видно, что результаты, полученные способами, основанными на реакции переноса электрона, коррелировали на 65 - 67 %, тогда как результаты АРЕ показали низкие коэффициенты корреляции со всеми способами. Данный эксперимент подтверждает, что в случае более сложных структур и сопряжения фрагментов

с различными типами активности, способность переноса электрона и атома водорода не коррелируют друг с другом. Для получения более полной и объективной информации о свойствах таких соединений, необходимо применять комплексные подходы, учитывающие различные механизмы реакции.



1 – г, 2 – 1г, 3 – 2г, 4 – 3г, 5 – 4г, 6 – 5г, 7 – 6г



1 – в, 2 – 1в, 3 – 2в, 4 – 3в, 5 – 4в, 6 – 5в, 7 – 6в

Рисунок 5.23 - Корреляционная зависимость токов окисления и антиоксидантной емкости соединений, содержащих остатки: а – пирокатехина, б – пирогаллола

Таблица 5.35 - АРЕ аддуктов азолазинов с полифенолами (10^{-4} моль/дм³, n=5, P=0,95)

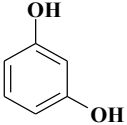
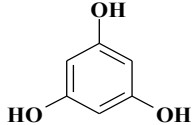
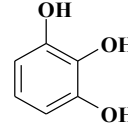
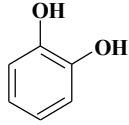
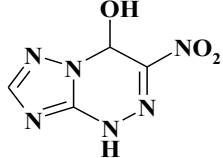
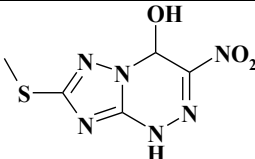
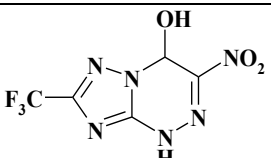
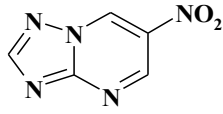
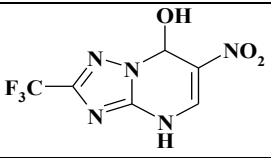
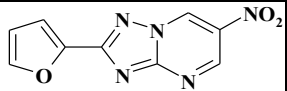
Азолазин		Полифенол			
					
		-	2.26±0.04 (0.02)	2.84±0.03 (0.01)	7.1±0.1 (0.02)
	3.65±0.08 (0.02)	9.0±0.1 (0.01)	3.42±0.07 (0.02)	10.80±0.03 (0.003)	8.1±0.2 (0.03)
	2.82±0.03 (0.01)	6.9±0.1 (0.01)	0.31±0.01 (0.03)	2.83±0.04 (0.01)	8.0±0.1 (0.01)
	3.81±0.03 (0.01)	4.72±0.01 (0.002)	6.37±0.03 (0.004)	10.5±0.3 (0.03)	8.1±0.2 (0.02)
	-	6.07±0.03 (0.005)	5.53±0.06 (0.01)	6.28±0.06 (0.005)	5.86±0.08 (0.01)
	-	9.9±0.4 (0.03)	6.72±0.08 (0.01)	2.4±0.2 (0.10)	14.57±0.09 (0.006)
	-	6.90±0.03 (0.004)	0.71±0.06 (0.008)	11.1±0.1 (0.01)	-

Таблица 5.36 - Коэффициенты корреляции между результатами, полученными 4 способами

	АОЕ	ФЧ	ДФПГ	АРЕ
АОЕ	-	0.65	0.67	0.26
ФЧ	-	-	0.66	0.28
ДФПГ	-	-	-	0.40
АРЕ	-	-	-	-

Таким образом, по результатам исследований, полученных двумя электрохимическими методами, наиболее перспективными соединениями, проявляющими антиоксидантные свойства, являются аддукты, содержащие в своей структуре остатки пирогаллола и пирокатехина и 6-нитротриазолотриазин-7-олы: 1в, 2в, 3в, 1г, 2г, 3г. Предлагаемый комплексный подход с использованием потенциометрического определения АОЕ и АРЕ может быть использован для скрининга новых синтезированных соединений в целях выявления наиболее перспективных кандидатов для создания полифункциональных фармпрепаратов.

5.8 Антиоксиданты и механизмы химических превращений.

Комплексное исследование является очень важным в интерпретации антиоксидантных свойств объектов. Несмотря на то, что в ряде случаев антиоксидантная и антирадикальная емкость коррелируют между собой, абсолютные значения этих величин разные, т.к. стехиометрические коэффициенты в реакциях электронного переноса и коэффициенты ингибирования в реакциях электронно-протонного переноса для одних и тех же веществ могут существенно отличаться (таблица 5.37). Кроме того, некоторые АО, такие как каротиноиды, не принимают участия в реакциях электронного переноса, тогда как являются эффективными ингибиторами пероксильных радикалов. И наоборот, некоторые восстановители, такие как сульфит натрия, Sn(IV), не являясь АО, участвуют в реакциях электронного переноса и могут искажать результаты определения АОЕ. Хелатирующие свойства полифенолов также будут вносить вклад в величину АОЕ.

Таблица 5.37 – Сравнение АО по механизмам химических превращений

Соединение	Механизм				
	I		II		III
	Реакция переноса электрона	n (число электронов)	Реакция переноса атома водорода	f (коэффициент ингибирования)	Реакция комплексообразования
Na ₂ SO ₃	+	2	-	-	-
Sn(II)	+	2	-	-	-
β-каротин	-	-	+	1	-
Азолазины	-	-	+	1-3	-
Пробукол	-	-	+	1	-
α-токоферол	+	1	+	2	-
Пирогаллол	+	4	+	3	+
Кверцетин	+	4	+	3	+
Катехин	+	4	+	4	+
Галловая кислота	+	5	+	4	+
Ионол	+	1	+	2	-

5.9 Определение метрологических характеристик потенциометрических способов определения антиоксидантной и антирадикальной емкости

Результаты потенциометрического определения антиоксидантной емкости, основанным на реакции переноса электрона, хорошо согласуются с литературными данными об антиоксидантных свойствах различных индивидуальных веществ, растительных экстрактов, лекарственных препаратов, продуктов питания, биологических объектов. Поскольку

информация об АОЕ различных объектов имеет практическое значение, возникает необходимость установления метрологических характеристик определения этого параметра.

Согласно ГОСТ Р ИСО 5725-2002 для оценки метрологических характеристик аналитических методик рекомендовано использовать следующие основные методы: однофакторных планов экспериментов, стандартных образцов, аттестованных методик с известными характеристиками погрешности, добавок, разбавления, расчётный [410]. Однако, интегральный характер параметра АОЕ, а также многокомпонентность и непостоянность состава объектов анализа, ограничивает выбор метода оценки метрологических параметров потенциометрического определения антиоксидантной емкости. Принимая во внимание, что аттестованные методики оценки АОЕ с известными показателями погрешностей отсутствуют, а многокомпонентность объектов не позволяет использовать метод добавок, для оценки метрологических характеристик методик количественного определения АОЕ продуктов питания и эритроцитарной фракции крови использовали метод разбавления. В случае плазмы и сыворотки крови ограничения были связаны также с низким содержанием АО в этих объектах, поэтому для оценки метрологических характеристик методик количественного определения АОЕ плазмы и сыворотки крови использовался расчетный метод.

Показатели прецизионности (повторяемости и воспроизводимости), правильности и точности методики определения АОЕ продуктов питания и биологических образцов определяли в соответствии с требованиями РГМ 61-2003 [411]. В таблицах 5.38 – 5.41 представлены результаты оценки прецизионности, правильности и точности разработанных методик определения АОЕ ряда продуктов питания, БАД, экстрактов лекарственных трав и биологических объектов ($\sigma_r, \%$ – показатель повторяемости, $\sigma_R, \%$ – показатель воспроизводимости, $\pm \delta_c, \%$ – интервал относительной

систематической погрешности, $\pm\delta, \%$ – интервал относительной погрешности).

Таблица 5.38 - Результаты определения АОЕ методом разбавления некоторых продуктов питания и основные метрологические характеристики потенциометрической методики определения АОЕ (n=30, p=0.95) [412]

№	Название образца	Среднее арифметическое результатов определения АОЕ, 10^{-3} моль-экв/дм ³		Метрологические характеристики			
		Без разбавления	С разбавлением $\eta=2$	$\sigma_r, \%$	$\sigma_R, \%$	$\pm\delta_c, \%$	$\pm\delta, \%$
1	2	3	4	5	6	7	8
1	Нектар «Персик»	1.9	0.9	5	6	6	13
2	Нектар «Овощная смесь»	2.4	1.3	6	8	7	17
3	Сок яблочный	2.6	1.4	6	8	7	17
4	Коньяк	3.0	1.4	4	5	5	11
5	Пиво, экстрактивность суслу 14%	3.6	1.8	8	7	9	18
6	Сок апельсиновый	3.8	1.8	6	8	8	18
7	Апельсины	4.5	2.4	9	8	10	19
8	Дыни	4.6	2.3	7	7	9	17
9	Нектар «Апельсин, банан»	4.6	2.2	5	7	6	15
10	Наливка черносмородиновая	6.1	3.0	5	8	7	18

1	2	3	4	5	6	7	8
11	Красный китайский чай Oolong	6.7	3.4	6	8	7	16
12	Портвейн, вино специальное крепкое розовое	9.6	4.5	3	4	6	10
13	Черный китайский чай	12.4	6.1	5	8	6	15
14	Яблоки	15.9	7.6	4	4	5	10
15	Эликсир «Демидовский»	15.2	8.4	7	7	9	16
16	Драже кислоты аскорбиновой	22.8	11.0	4	4	4	8
17	Зеленый китайский чай	21.7	10.5	5	6	6	13
18	Свекла	24.1	11.1	4	4	7	11
19	Мерло, вино натуральное полусладкое красное	24.2	12.4	8	11	9	23
20	Ундевит	5.0	2.6	4	4	5	9
21	Смородина	26.2	13.1	6	6	7	14
22	Настойка полыни	29.0	14.1	8	7	9	16
23	Аскорутин	30.0	14.6	6	6	7	14
24	Кагор, вино специальное десертное красное	37.1	16.5	4	6	5	13
25	Капилар	6.0	3.0	6	6	6	14
26	Экстракт родиолы	263.2	133.3	3	3	4	8

На основании рассчитанных значений метрологических характеристик, можно выделить следующие поддиапазоны определения АОЕ: от 0.5 до 10.0 ммоль-

экв/дм³ с интервалом относительной погрешности (точности) 23%, от 10.0 до 50.0 ммоль-экв/дм³ - 18%, от 50 ммоль-экв/дм³ и выше с интервалом относительной погрешности 8%. Показатели повторяемости и воспроизводимости составили не более 8% и 10% соответственно, а показатель правильности (интервал относительной систематической погрешности) – не превысил 12%.

Таблица 5.39 - Результаты определения АОЕ методом разбавления образцов эритроцитарной массы и основные метрологические характеристики потенциметрической методики определения АОЕ (n=5, p=0.95)

№	Среднее арифметическое результатов определения АОЕ, 10 ⁻³ моль-экв/дм ³		Метрологические характеристики			
	Без разбавления	С разбавлением $\eta=2$	$\sigma_r, \%$	$\sigma_R, \%$	$\pm\delta_c, \%$	$\pm\delta, \%$
1	16.4	8.2	2	2	3	5
2	14.5	7.4	3	3	3	6
3	18.7	9.5	3	3	3	7
4	15.4	7.7	4	5	3	10
5	18.7	9.3	3	4	3	8

Таблица 5.40 - Результаты потенциметрического определения АОЕ сыворотки крови и основные метрологические характеристики методики, полученные расчетным способом (n=5, p=0.95)

Образец	$\bar{X}, \text{ммоль-экв/дм}^3$	$\sigma_r, \%$	$\pm\delta_c, \%$	$\pm\delta, \%$
№ 1	1.05	3	5	8
№ 2	0.96	2		7
№ 3	1.08	4		9
№ 4	0.99	4		10
№ 5	0.96	1		6
№ 6	1.15	2		7
№ 7	0.97	6		13
№ 8	1.04	2		6
№ 9	1.08	3		8

Таблица 5.41 - Результаты потенциометрического определения АОЕ плазмы крови и основные метрологические характеристики методики, полученные расчетным способом ($n=5$, $p=0.95$)

Образец	\bar{X} , ммоль-экв/дм ³	σ_r , %	$\pm \delta_c$, %	$\pm \delta$, %
№ 1	0.93	2	5	7
№ 2	0.94	3		8
№ 3	1.04	5		12
№ 4	0.91	3		8
№ 5	0.91	3		8

Таким образом, предлагаемый подход для определения АОЕ, основанный на реакции переноса электронов с АО на модельный окислитель может быть с успехом применен для определения АОЕ широкого круга объектов со сложной матрицей переменного состава. Полученные значения метрологических характеристик для количественного интегрального показателя АОЕ различных объектов со сложной матрицей указывают на высокую стабильность измерений этого параметра с использованием разработанных методик.

Показатели точности потенциометрической методики определения антирадикальной емкости сложных многокомпонентных проб, как и в случае интегрального параметра АОЕ, определяли в соответствии с рекомендациями РМГ 61 - 2010 и ГОСТ Р ИСО 5725 – 2003 [410, 411].

Результаты АРЕ исследуемых проб и оцененные показатели точности приведены в таблице 5.42.

На основании данных таблицы 5.42 можно сделать вывод о том, что значения показателя точности не превышают 20%. Показатели повторяемости и воспроизводимости исследованных экстрактов в относительных единицах составили не более 12%.

Таблица 5.42 – АРЕ и оцененные показатели точности измерений антирадикальной емкости экстрактов лекарственных растений и чая (n=10, P=0.95)

Наименование препарата	АРЕ, 10 ⁻² моль-экв/дм ³	σ_r , %	σ_R , %	$\pm\delta$, %
1	2	3	4	5
Календулы настойка (Caléndula)	1.08	4.5	6.0	14.1
Пустырника настойка (Leonúrus)	1.65	0.3	0.3	11.0
Боярышника настойка (Crataégus)	0.23	0.6	0.8	11.1
Женьшеня настойка (Pánax)	0.26	0.8	1.1	11.1
Родиолы настойка (Rhodiola)	13.44	9.1	12.0	20.0
Пиона настойка (Paeónia)	3.33	0.6	0.9	11.1
Элеутерококка настойка (Eleutherococcus)	3.67	1.0	1.3	11.2
Эвкалипта настойка (Eucalýptus)	6.32	2.1	2.8	11.8
Мяты перечной настойка (Méntha piperíta)	2.27	1.4	1.9	11.4
Лимонника семян настойка (Schisándra)	1.72	1.9	2.5	11.7
Полыни настойка (Artemísia)	4.80	2.2	3.0	11.9
Перца стручкового настойка (Cápsicum ánnum)	2.29	3.0	4.0	12.5
Душицы трава (Origaní herba)	5.50	1.4	1.8	11.4
Мяты перечной листья (Menthae piperitae folia)	3.25	1.1	1.4	11.3
Ноготков цветки (Calendulae flores)	0.73	2.3	3.0	11.9
Зверобоя трава (Hyperici herba)	0.95	0.9	1.2	11.2
Березы листья (Betulae folia)	0.29	1.2	1.6	11.3
Полыни горькой трава (Absinthii herba)	0.53	5.1	6.9	14.9
Marcony Чай черный	1.06	2.0	2.7	11.7
Nadin 1002 ночь	0.33	1.7	2.3	11.6
Greenfield. Earl Gray Fantasy	1.38	1.6	2.2	11.5

Наименование препарата	АРЕ, 10^{-2} моль-экв/дм ³	σ_r , %	σ_R , %	$\pm\delta$, %
1	2	3	4	5
Rumuk. Black tea	0.72	1.7	2.3	11.6
Ahmad Breakfast	1.33	2.6	3.5	12.2
Каждый день. Жасмин	3.28	0.3	0.4	11.0
Китайский зеленый чай	3.79	1.3	1.7	11.3
Травяной чай «Витаминный»	0.44	1.3	1.8	11.4
Травяной чай «Отличное зрение»	0.35	2.5	3.4	12.1
Травяной чай «Для похудения»	0.28	2.1	2.8	11.8

σ_r - показатель повторяемости, %;

σ_R - показатель воспроизводимости (внутрилабораторной прецизионности), %;

$\pm\delta$ – показатель точности, %.

Достигнутые показатели точности наряду с экспрессностью и простотой методики позволяют использовать потенциометрическое определение АРЕ для широкого круга объектов со сложной матрицей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования в области электрохимического анализа для изучения антиокислительных/антирадикальных свойств веществ позволили развить теорию и практику потенциометрического метода, создать новые методологические подходы для комплексного количественного определения АОЕ/АРЕ различных объектов, основанных на механизмах химического действия АО в организме. Основой для создания новой методологии являлись обширные исследования как теоретического, так и прикладного характера.

В диссертации рассмотрены проблемы, касающиеся комплексного исследования антиокислительных/антирадикальных свойств веществ.

Совокупность теоретических и практических выводов работы доказывает преимущества потенциометрии при определении интегральных параметров АОЕ и АРЕ, измерение которых основано на процессах электронно-протонного переноса в реакциях АО с модельными окислителями радикальной и нерадикальной природы. Полученные результаты исследования имеют важное значение как для электроаналитической химии, так и для смежных областей медицины, биохимии, биофизики, фармации, пищевой технологии, в которых изучаются процессы свободно-радикального окисления и антиоксидантного действия.

Предложенные новые подходы для потенциометрического определения АОЕ/АРЕ, основанные на реальных механизмах действия АО в организме, вместе с тем удовлетворяют ряду требований, от которых, в конечном итоге зависит распространение аналитических методик, а именно: простота реализации; доступность аппаратного оформления; использование условий проведения анализа, близких к физиологическим; экспрессность измерения. Кроме того, потенциометрические измерения позволяют анализировать образцы со сложной матрицей, а также мутные и окрашенные образцы, что является очень актуальным, поскольку большинство объектов исследования это растительные экстракты и биологические жидкости. При всех своих преимуществах предложенные новые потенциометрические методики определения АОЕ/АРЕ обладают высокими аналитическими и метрологическими характеристиками.

Перспективы дальнейшего развития предложенной методологии могут быть связаны с поиском новых моделей окислителей радикальной и нерадикальной природы для исследования липофильных объектов. Учитывая стратегию развития аналитических методов, направленной на миниатюризацию измерительной техники, связанной как с персонафицированной медициной, так и on-line анализом, а также преимущества электрохимических методов анализа, полученные исследования могут стать основой для создания потенциометрических

портативных и проточных измерительных устройств для эксперсного определения параметров АОЕ/АРЕ широкого круга объектов.

ВЫВОДЫ И РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Сформулированы общие принципы, теоретические и практические подходы к использованию потенциометрии в комплексной интегральной оценке антиоксидантных/антирадикальных свойств веществ, основанной на механизмах действия АО.

2. Сформулированы требования к модельным окислителям в реакциях электронного и электронно-протонного переноса, теоретически и экспериментально обоснован выбор системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ в реакции переноса электрона, 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорида в реакции переноса атома водорода.

3. Изучены закономерности изменения ОВП системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ в процессе протекания реакции электронного переноса с молекулы АО на молекулу модельного окислителя, установлены взаимосвязи структура АО – АОЕ. Показано, что величина стехиометрических коэффициентов реакции АО с модельным окислителем в большинстве случаев коррелирует с количеством гидроксильных групп, присоединенных к бензольному кольцу, флавоновому ядру или ненасыщенному гетероциклу, которые обуславливают антиоксидантные свойства соединений. Константы скорости реакций модельных АО с $K_3[Fe(CN)_6]$ не превысили 0,0045 1/с, что говорит о высокой скорости реакции переноса электрона.

4. Разработана оригинальная потенциометрическая методика определения АОЕ, основанная на реакции переноса электрона, для исследования индивидуальных веществ и многокомпонентных объектов, выбраны рабочие условия для получения аналитического сигнала, разработаны алгоритмы анализа. Определены рабочие соотношения концентраций окисленного и восстановленного компонентов системы и степени разбавления проб при анализе различных объектов. В качестве фонового раствора выбран фосфатный буферный раствор с РН 7.2-7.4 с

суммарным содержанием солей 0,067 М, обеспечивающим высокую ионную силу ($I=0.120$) и буферную емкость ($B=0.031$ М), достаточную для компенсации смещения рН. В качестве рабочего электрода выбран платиновый электрод. Предел обнаружения в водных растворах (на примере аскорбиновой кислоты) согласно 3 σ - критерию составил $3.5 \cdot 10^{-6}$ моль-экв/дм³.

5. Изучено влияние хелатирующей способности полифенолов на величину интегрального параметра АОЕ при помощи метода ЦВА и расчета условных констант устойчивости. Показано, что в случае некоторых полифенолов (пирокатехин, пирогаллол, галловая кислота) регистрируется суммарный эффект, связанный как с реакцией переноса электрона с молекулы полифенола на $K_3[Fe(CN)_6]$, так и с реакцией конкурирующего комплексообразования.

6. Предложен новый подход для оценки кинетических параметров реакции генерирования пероксильных радикалов потенциометрическим методом с использованием в качестве акцептора радикалов восстановленной формы металла в составе комплексного соединения. В качестве акцептора радикалов теоретически обоснован $K_4[Fe(CN)_6]$. Показана эффективность выбранного акцептора путем оценки константы взаимодействия с генерируемыми пероксильными радикалами (k_3), которая составила $(1.9 \pm 0.2) \cdot 10^4$ (М·с)⁻¹. Изучена кинетика реакции распада 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорида, значение скорости и константы скорости генерирования пероксильных радикалов при $C_{AAPH} = (0.05 - 0.3)$ М составили $W_i = (1.05 - 5.39) \cdot 10^{-7}$ М·с⁻¹, $k_{icp} = (1.00 \pm 0.02) \cdot 10^6$ с⁻¹, полученные данные согласуются с литературными.

7. Изучены закономерности изменения ОВП радикал генерирующей системы на модели ААРН в качестве источника пероксильных радикалов в процессах их генерирования и ингибирования, основанного на реакции электронно-протонного переноса с молекулы АО на молекулу радикала, установлена взаимосвязь структура АО – АРЕ. Предложен способ определения периода индукции реакции по максимальной скорости изменения

потенциала системы $(dE/dt)_{\max}$. Показано, что коэффициенты ингибирования АО в реакции с пероксильными радикалами в целом соответствуют количеству гидроксильных групп, присоединенных к бензольному кольцу, флавоновому ядру или ненасыщенному гетероциклу.

8. Разработана оригинальная безреагентная потенциометрическая методика определения АРЕ, основанная на реакции переноса атома водорода с АО на генерируемые пероксильные радикалы, для исследования индивидуальных веществ и многокомпонентных объектов. Выбраны рабочие условия для получения аналитического сигнала, разработаны алгоритмы анализа. В качестве фонового раствора, как и в случае определения АРЕ выбран фосфатный буферный раствор с рН 7.2-7.4, в качестве рабочего электрода выбран платиновый электрод. Предел обнаружения в водных растворах (на примере аскорбиновой кислоты) согласно 3σ - критерию составил $6.20 \cdot 10^{-6}$ моль-экв/дм³.

9. Разработаны методики определения интегральных параметров АОЕ и АРЕ различных объектов (индивидуальных природных и синтезированных АО, лекарственных средств, экстрактов растительного сырья, пищевых продуктов, биологических жидкостей). Выявлена достоверная корреляция значений АОЕ и АРЕ, полученных потенциометрическим методом для лекарственных средств, экстрактов растительного сырья, пищевых продуктов со значениями, полученными спектрофотометрическими методами с использованием реактива Фолина - Чокальтеу и модели стабильного радикалаДФПГ; значений АОЕ биологических образцов со значениями, полученными способом TAS RANDOX. Показано, что при исследовании сложных сопряженных систем значения АОЕ и АРЕ слабо коррелируют, что связано с различной способностью соединений вступать в реакции переноса электрона и переноса атома водорода.

10. Разработанные на основе проведенных исследований методики прошли метрологическую аттестацию: «Методика определения антиоксидантной активности пищевых продуктов, продовольственного сырья,

БАД и витаминов методом потенциометрии с применением анализатора МПА-1» (свидетельство УНИИМ - № 224.04.10.063/2007); «Методика определения антиоксидантной активности проб биологических материалов методом потенциометрии с применением анализатора МПА-1» (свидетельство УНИИМ - № 224.11.10.067/2007).

Автор выражает искреннюю благодарность: сотрудникам ИБХФ РАН им. Н.М. Эммануэля и лично директору д.х.н. **Бурлаковой Е.Б.** за организацию и проведение сравнительных испытаний; руководителю отдела ИХФ РАН им. Н.Н. Семенова д.х.н. Касикиной О.Т.; профессору кафедры аналитической химии КФУ Будникову Г.К.; директору ХТИ УрФУ, чл.-кор. РАН Русинову В.Л.; коллективу медицинского диагностического центра г. Екатеринбурга и лично директору д.м.н. Бейкину Я.Б; Заведующему Центра гемодиализа и трансплантации почки Злоказову В.Б.; ФГУП «УралТест»; г.н.с. лаборатории аналитической химии и методов разделения ИОНХ РАН им. Н.С.Курнакова д.х.н. Шпигун Л.К., сотрудникам УрГЭУ Алешиной Л.В., Шарафутдиновой Е.Н, сотрудникам кафедры аналитической химии ХТИ УрФУ д.х.н. Козициной А.Н., к.х.н. Герасимовой Е.Л, Газизуллиной Е.Р. и заведующему кафедрой д.х.н. Матерну А.И. за содействие в организации и проведении представленных исследований.

Выражаю искреннюю признательность и благодарность научному консультанту, профессору. д.х.н. УрГЭУ, заслуженному Деятелю науки РФ, Брайниной Хъене Залмановне за ценные рекомендации, советы и помощь в проведении работы.

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

АК – аскорбиновая кислота

АО – антиоксидант

АКМ - активированные кислородные метаболиты

АТФ - аденозинтрифосфорная кислота

АЭ - антирадикальная эффективность

АОА – антиоксидантная активность

АОЕ - антиоксидантная емкость

АРА – антирадикальная активность

АРЕ – антирадикальная емкость

АОС – антиоксидантная система

БАД - биологически активные добавки

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ГК – галловая кислота

ГПО – глутатионпероксидаза

ГР - глутатионредуктаза

ГТ - глутатионтрансфераза

ДК - диеновые конъюгаты

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДФПГ - 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил

К - (+)катехин

K_n – константа нестойкости

K_k – константа кислотности

МК – мочевая кислота

НАДФ - никотинамидадениндинуклеотидфосфат

НАДФН – восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата

НВЭ – нормальный водородный электрод

НСТ нитросиний тетразолий

ОВП – окислительно-восстановительный потенциал

- ОС - окислительный стресс
- ОСПФ - общее содержание полифенолов
- ПОЛ – перекисное окисление липидов
- ПР – производство растворимости
- ПРА – противорадикальная активность
- СОД – супероксиддисмутаза
- СРО - свободнорадикальное окисление
- СУЭ – стеклоуглеродный электрод
- ФЧ – Фолин-Чокальтеу
- ХЛ – хемилюминесценция
- ЦВА – циклическая вольтамперометрия
- ЭДТА (EDTA) – этилендиаминтриуксусная кислота
- ЭПР – электронный парамагнитный резонанс
- ААРН - 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорид
- АВТС - 2,2'-азино-бис-(этилбензтиазолино-6-сульфонат)
- В-РЕ - β -фикоэритрин
- СВА - анализ обесцвечивания кроцина (Crocic bleaching assay)
- CRAC – церий-восстанавливающая антиоксидантная способность (Ceric Reducing Antioxidant Capacity)
- CUPRAC - медь-восстанавливающая антиоксидантная способность (Cupric Reducing Antioxidant Capacity)
- DPPH – 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил
- FRAP – железо-восстанавливающая антиоксидантная сила (Ferric reducing antioxidant power assay)
- GSH – восстановленный глутатион
- GSSG – окисленный глутатион
- Gly-Trp - глицил-триптофан
- Hb – гемоглобин
- HPS – способность дезактивировать пероксид водорода (hydrogen peroxide scavenging activity)

HRS - способность дезактивировать гидроксильные радикалы (hydroxyl radical scavenging activity)

InH – ингибитор

In[•] - радикал ингибитора

MCE – эффект хелатирования металла (Metal chelating effect)

Nc - неокупроин (, 2, 9-диметил – 1, 10-фенантролин)

ORAC – способность абсорбировать кислородные радикалы (Oxygen radical absorption capacity)

RH – окисляемый субстрат

R[•] - алкильный радикал

RO[•] - алкоксильный радикал

RO₂[•] - перекисный (пероксидный) радикал

ROOH – органический гидропероксид

RF – рибофлавин

R-PE - R-фикоэритрин

TAS Randox - общий антиоксидантный статус (Total antioxidant status, Randox[®])

TEAC – антиоксидантная емкость в эквивалентах Тролокса (Trolox equivalent antioxidant capacity)

TPTZ - 2,4,6- трипиридил-триазин

TRA – суммарная восстановительная способность (Total reducing activity)

TRAP – общая способность к улавливанию радикалов (Total radical trapping parameter)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зенков, Н.К. Окислительный стресс [Текст] / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова – М.: МАИК «Наука/Интерпериодика». – 2001. – 343 с.
2. Зенков, Н.К. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах [Текст] / Н.К. Зенков, Е.Б. Меньщикова // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113. – № 3. – С. 286-296.
3. Wendel, A. Enzymes acting against reactive oxygen [Текст] / A. Wendel // Enzymes: Tools and Targets. – Basel: Karger. – 1988. – P. 161–167.
4. Esterbauer, H. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL [Текст] / H. Esterbauer, J. Gebicki, H. Puhl, G. Jurgens // Free Radical Biology and Medicine. – 1992. – V. 13. – P. 341–390.
5. Lee, J.-M. Targeted disruption of Nrf2 causes regenerative immune-mediated hemolytic anemia [Текст] / J.-M. Lee, K. Chan, Y.W. Kan, J.A. Johnson // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2004. – V. 101. – № 26. – P. 9751–9756.
6. Кулинский, В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита [Текст] / В.И. Кулинский // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – Т. 1. – № 2. – С. 2-7.
7. Меньщикова, Е.Б. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания [Текст] / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин – Новосибирск: «АРТА». – 2008. – 284 с.
8. Янковский, О.Ю. Токсичность кислорода и биологические системы (эволюционные, экологические и медико-биологические аспекты) [Текст] / О.Ю. Янковский // СПб.: «Игра». – 2000. – 294 с.
9. Ford, E. Kinetics of the reactions of nitrogen dioxide with glutathione, cysteine, and uric acid at physiological pH [Текст] / E. Ford, M.N. Hughes, P. Wardman // Free Radical Biology and Medicine. – 2002. – V. 32. – P. 1314–1323.
10. Thomas, D.D. The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂ [Текст] / D.D. Thomas, X. Liu, S.P. Kantrow,

J.R. Lancaster Jr. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2001. – V. 98. – № 1. – P. 355 –360.

11. Yu, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species [Текст] / B.P. Yu // Physiological Reviews. – 1994. – V. 74. – № 1. – P. 139 –162.

12. Babior, B.M. Biological Defense Mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent [Текст] / B.M. Babior, R. S. Kipnes, J.T. Curnutte // Journal Clinical Investigation. –1973. – V. 52. – № 3. – P. 741 – 744.

13. Биленко, М.В. Ишемические и реперфузионные поражения органов [Текст] / М.В. Биленко – Москва: Медицина. –1989. – 368 с.

14. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы в живых системах [Текст] / Ю.А. Владимиров, О.А. Азизова, А.И. Деев // М.: ВИННИТИ, серия биофизика, 1991. - Т.29. - 252с.

15. Вольский, Н.Н. Влияние супероксидного радикала на пролиферацию лимфоцитов, стимулированную митогеном [Текст] /Н.Н. Вольский, Н.В. Кашлакова, В.А. Козлов // Цитология. – 1988. – № 7. – С. 899-901.

16. Junod, A.F. Effects of Oxygen Intermediates on Cellular Functions [Текст] / A.F. Junod // American Review of Respiratory Disease. –1987. – V. 135. – № 6P2. – P. S32 – S34.

17. Шаронов, Б.П. Антиокислительные свойства и деградация белков сыворотки активными формами кислорода, генерируемыми стимулированными нейтрофилами [Текст] /Б.П. Шаронов, Н.Ю. Говорова, С.Н. Лызлова // Биохимия. – 1988. – Т.53. – № 5. – С. 816 – 825.

18. Verma, A. Carbon monoxide: a putative neural messenger [Текст] /A. Verma, D.J. Hirsch, C.E. Glatt, G.V. Ronnett, S.H. Snyder //Science. – 1993. –V.259. – P. 381-384.

19. Kim, Y.M. The effect of hemoglobin, hemein, and iron on neutrophil inactivation in superoxide generating systems [Текст] / Y.M. Kim, I. Yamazaki, L.H. Piette // Archives Biochemistry Biophysics. – 1994. – V. 309. – № 2. – P. 308 – 314.

20. Осипов, А.Н. Активированные кислородные метаболиты и их роль в организме [Текст] / А.Н. Осипов, О.А. Азизова, Ю.А. Владимиров // Успехи биологической химии. – 1990. – Т. 31. – С. 180-208.
21. Bielski, B.H.J. Mechanism of the disproportionation of superoxide radicals [Текст] / B.H.J. Bielski, A.O. Allen // Journal Physical Chemistry. – 1977. – V.81. – № 11. P. 1048–1050.
22. Byczkowski, J.Z. Biological role of superoxide ion-radical [Текст] / J.M. Byczkowski, T. Gessner // International Journal Biochemistry. – 1988. – V. 20. – № 6. – P. 569 – 580.
23. Torrielli, M.V. Free radical in inflammatory disease [Текст] / M.V. Torrielli, M.U. Dianzani // Free Radicals in Molecular Biology, Aging and Disease. N.Y.: Raven Press. – 1984. – P. 355-379.
24. Simon, R.H. Hydrogen peroxide causes the fatal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals [Текст] / R.H. Simon, C.H. Scoggin, D. Patterson // Journal Biological Chemistry. – 1981. – V. 256. – № 14. – P. 7181 – 7186.
25. Sandstrom, P.A. HIV gene expression enhances T cell susceptibility to hydrogen peroxide-induced apoptosis [Текст] / P.A. Sandstrom, B. Roberts, T.M. Folks, T.M. Buttke // AIDS Research and Human Retroviruses. – 1993. – V. 9. – № 11. – P. 1107 – 1113.
26. Bast, A. Oxidants and antioxidants: state of the art [Текст] / A. Bast, G.R. Haenen, C.J. Doelman // American Journal of Medicine. – 1991. – V. 91. – № 3C. – P. 2S – 13S.
27. Lomax, K.J. The molecular biology of selected phagocyte defects [Текст] / K.J. Lomax, H.L. Malech, J.I. Gallin // Blood Review. – 1989. – V. 3. – P. 94 – 104.
28. Сидорик, Е.П. Биохемилюминесценция клеток при опухолевых процессах [Текст] / Е.П. Сидорик, Е.А. Баглев, М.И. Данко – Киев.: Науков думка. – 1989. – 216 с.
29. Осипов, А.Н. Образование гидроксильных радикалов при взаимодействии гипохлорита с ионами железа [Текст] / А.Н. Осипов, Э.Ш. Якутова, Ю.А. Владимиров // Биофизика. – 1993. – Т. 38. – № 3. – С. 390-396.

30. Roots, R. Estimation of Life Times and Diffusion Distances of Radicals Involved in X-Ray-Induced DNA Strand Breaks or Killing of Mammalian Cells [Текст] / R. Roots, S.Okada // *Radiation Research*. – 1975. – V. 64. – № 2. – P. 306 – 320.
31. Halliwell, B. Biologically significant scavenging of the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by ascorbic acid. Implications for antioxidant protection in the inflamed rheumatoid joint [Текст] / B. Halliwell, M. Wasil, M. Grootveld // *FEBS Letters*. – 1987. – V. 213. – P. 15 – 18.
32. Hevel, J.M. Macrophage nitric oxide synthase: relationship between enzyme-bound tetrahydrobiopterin and synthase activity [Текст] / J.M. Hevel, M.A. Marletta // *Biochemistry*. – 1992. – V. 31. – P. 7160 – 7165.
33. Kolb, H. Nitric oxide: A pathogenic factor in autoimmunity [Текст] / H. Kolb, V. Kolb-Bachofen // *Immunology Today*. – 1992. – V. 13. – P. 157 – 160.
34. Манухина, Е.Б. Оксид азота в сердечно сосудистой системе: роль в адаптационной защите [Текст] / Е.Б. Манухина, И.Ю. Малышев, Ю.В. Архипенко // *Вестник Российской АМН*. - 2000. - № 4. - С. 16 - 21.
35. Козлов, А.В. Роль эндогенного свободного железа в активации перекисного окисления липидов при ишемии [Текст] / А.В. Козлов, Л.И. Шинкаренко, Ю.А. Владимиров // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 1985. – №1. – С.38 – 41.
36. Boveris, A. Low-level chemiluminescence in biological systems [Текст] / A. Boveris, E. Cadenas, B. Chance // *Methods in Enzymology*. – 1984. – V. 105. – P. 211 – 242.
37. Leisman, G. B. Singlet oxygen yields, optical properties, and phototoxicity of reduced derivatives of the photosensitizer cercosporin [Текст] / G.B. Leisman, M.E. Daub // *Photochemistry and Photobiology*. – 2008. – V. 55. – № 3. – P. 373 – 379.
38. Журавлев, А.И. Спонтанная биохемилюминесценция животных тканей [Текст] / А.И. Журавлев // *Биохемилюминесценция*. – М.: Наука. – 1983. – С. 3 – 30.

39. Eisenberg, W.C. Cytogenetic effects of singlet oxygen [Текст] / W.C. Eisenberg, K. Taylor, R.R. Guerrero // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 1992. – V. 16. – № 3-4. – P. 381 – 384.
40. Разумовский, С.Д. Кислород — элементарные формы и свойства [Текст] / С.Д. Разумовский – М.: Химия. – 1979. – 304 с.
41. Esterbauer, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products [Текст] / H. Esterbauer // *American Journal of Clinical Nutrition*. – 1993. – V. 57. – № 5. – P. 779S – 785S.
42. Кузин, А.М. Структурно-метаболическая теория в радиобиологии [Текст] / А.М. Кузин – М.: Наука. – 1986. – 282 с.
43. Jürgens, G. Modification of human low-density lipoprotein by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal [Текст] / G. Jürgens, J. Lang, H. Esterbauer // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1986. – V. 875. – № 1. – P. 103 – 114.
44. Муравьев, Н.А. Пероксидозасомы эозинофильных лейкоцитов [Текст] / Н.А. Муравьев, В.А. Фомина, В.В. Роговин // *Известия Академии Наук. Серия Биологическая* – 1992. – № 6. – С. 835 – 843.
45. Klebanoff, S.J. Myeloperoxidase: role in neutrophil-mediated toxicity [Текст] / S.J. Klebanoff // *Molecular Biology and Infectious Diseases*. – Paris.: Elsevier. – 1988. – P. 283 – 289.
46. Wu, W. Eosinophil peroxidase nitrates protein tyrosyl residues. Implications for oxidative damage by nitrating intermediates in eosinophilic inflammatory disorders [Текст] / W. Wu, Y. Chen, S.L. Hazen // *Journal Biological Chemistry*. – 1999. – V. 274. – № 36. – P. 25933 – 25944.
47. Панасенко, О.М. Изучение способности гипохлорита проникать в липидную фазу липопротеинов крови человека [Текст] / О.М. Панасенко, С.А. Евгина, В.И. Сергиенко // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 1993. – Т. 115. – № 4. – С. 358 - 359.
48. Fliss, H. Hypochlorous acid-induced mobilization of zinc from metalloproteins [Текст] / H. Fliss, M. Ménard // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1991. – V. 287. – № 1. – P. 175 – 179.

49. Weiss, S.J. The interplay of oxidants and proteinases in neutrophil-mediated tissue damage [Текст] / S.J. Weiss // *Journal Cellular Biochemistry*. – 1991. – V. 5. – P. 210.
50. Эмануэль, Н.М. Цепные реакции окисления углеводов в жидкой фазе [Текст] / Н.М. Эмануэль, Е.Т. Денисов, З.К. Майзус – М.: Наука. – 1975. – 375 с.
51. Будников, Г.К. Антиоксиданты как объекты биоаналитической химии [Текст] / Г.К. Будников, Г.К. Зиятдинова // *Журнал аналитической химии*. – 2005. – Т. 60. – № 7. – С. 678-691.
52. Кулинский, В.И. Биологическая роль глутатиона [Текст] / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // *Успехи современной биологии*. – 1990. – Т. 110. – №1. – С.20-33.
53. Bradway, E.M. The Association of Fat-Soluble Vitamins and Antioxidants in Some Plant Tissues [Текст] / E.M. Bradway, H.A. Mattill // *Journal American Chemical Society*. – 1934. – V. 56. – № 11. – P. 2405 – 2408.
54. “antioxidant”. Webster’s Third New International Dictionary. – Unabridged.: Merriam-Webster. – 2002. – <http://unabridged.merriam-webster.com>.
55. [http://cancerweb.ncl.ac.uk/cgi-bin/omd?query\)antioxidants](http://cancerweb.ncl.ac.uk/cgi-bin/omd?query)antioxidants).
56. Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and β -Carotene and Other Carotenoids: Overview, Antioxidant Definition, and Relationship to Chronic Disease. In *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*. - National Academy of Science.: Washington DC. – 2000. - P. 35-57.
57. Halliwell, B. Free radicals in biology and medicine [Текст] / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge – Oxford.: Clarendon Press. – 1989. – 543 p.
58. Меньщикова, Е.Б. Фенольные антиоксиданты в биологии и медицине. Строение, свойства, механизмы действия [Текст] / Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.В. Кандалинцева – Saarbrücken, Deutschland.: LAPLAMBERT Academic Publishing. – 2012. – 488 с.

59. Эмануэль, Н.М. Торможение процессов окисления жиров [Текст] / Н.М. Эмануэль, Ю.Н. Лясковская – М: Пищепромиздат. – 1961. – 359 С.
60. Карпухин, О.Н. Скорость образования свободных радикалов при распаде инициаторов и активность ингибиторов в твердом полистироле [Текст] / О.Н. Карпухин, Т.В. Похолок, В.Я. Шляпинтох // Высокомолекулярные соединения. –1971. – Т.13. – № 1. – С. 22-28.
61. Абрамова, Ж.И. Человек и противоокислительные вещества [Текст] / Ж.И. Абрамова, Г.И. Оксенгендлер – Л: Наука. – 1985. – 229 с.
62. Кения, М.В. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе [Текст] / М.В. Кения, А.И. Лукаш, Е.П. Гуськов // Успехи современной биологии. –1993. – Т.113. – № 4. – С. 456-470.
63. Зайцев, В. Г. Связь между химическим строением и мишенью действия как основа классификации антиоксидантов прямого действия [Текст] / В. Г. Зайцев, О. В. Островский, В. И. Закревский // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2003. – Т.66. – № 4. – С. 66-70.
64. Granot, E. Oxidative stress in childhood – in health and disease states [Текст] / E. Granot, R. Kohen // Clinical Nutrition. – 2004. – V. 23. - № 1. – P. 3.
65. Кокшарова, Т.В. Координационные соединения 3-d металлов с производными барбитуровой кислоты [Текст] / Т.В. Кокшарова // Вестник одесского национального университета. Химия. – 2014. – Т. 19. – № 4. – С. 6 - 15.
66. Çekiç, S.D. Correlation of total antioxidant capacity with reactive oxygen species (ROS) consumption measured by oxidative conversion [Текст] / S.D. Çekiç, A. Çetinkaya, A.N. Avan, R. Apak // Journal Agricultural Food Chemistry. – 2013. – V. 61. – P. 5260 - 5270.
67. Tufan, A.N. Direct measurement of total antioxidant capacity of cereals: QUENCHER-CUPRAC method [Текст] / A.N. Tufan, S.E. Çekiç, M. Özyürek, K. Güçlü, R. Apak // Talanta. – 2013. – V. 108. – P. 136 – 142.

68. Ghiselli, A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability [Текст] / A. Ghiselli, M. Serafini, G. Maiani, E. Azzini, A.Ferro-Luzzi // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1987. – V. 18. – P. 29–36.
69. Huang, D. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays [Текст] / D. Huang, B. Ou, R.L. Prior // *Journal Agricultural Food Chemistry*. – 2005. – V. 53. – P. 1841–1856.
70. Perron, N.R. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding [Текст] / N.R. Perron, J.L. Brumaghim // *Cell Biochemistry and Biophysics*. – 2009. – V. 53. – P. 75–100.
71. Pellegrini, N. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid radical cation decolorization assay [Текст] / N. Pellegrini, R. Re, M. Yang, C. Rice-Evans // *Methods in Enzymology*. – 1998. - V. 299. – P. 379-389.
72. Brand-Williams, W. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity [Текст] / W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset // *LWT - Food Science and Technology*. – 1995. - V. 28. – № 1. – P. 25-30.
73. Bondet, V. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity Using the DPPH Free Radical Method [Текст] / V. Bondet, W. Brand-Williams, C. Berset // *LWT - Food Science and Technology*. – 1997. - V. 30. – P. 609-615.
74. Sanchez-Moreno, C. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols [Текст] / C. Sanchez-Moreno, J.A. Larrauri, F.Saura-Calixto // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 1998. - V. 76. – P. 270-276.
75. Folin, O. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins [Текст] / O. Folin, V. Ciocalteu // *Journal Biological Chemistry*. – 1927. - V. 73. – P. 627.
76. Singleton, V. L. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent [Текст] / V. L. Singleton, R. Orthofer, R. M. Lamuela-Raventos // *Methods Enzymology*. – 1999. - V. 299. – P. 152-178.

77. Benzie, I. F. F. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay [Текст] / I. F. F. Benzie, J. J. Strain // *Analytical Biochemistry*. – 1996. - V. 239. – P. 70-76.
78. Benzie, I. F. F. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay [Текст] / I. F. F. Benzie, Y. T. Szeto // *Journal Agriculture Food Chemistry*. – 1999. - V. 47. – P. 633-636.
79. Apak, R. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method [Текст] / R. Apak, K. Güçlü, M. Özyürek, S. E. Karademir // *Journal Agriculture Food Chemistry*. – 2004. - V. 52. – P. 7970-7981.
80. Ozyurt, D. Determination of total antioxidant capacity by a new spectrophotometric method based on Ce(IV) reducing capacity measurement [Текст] / D. Ozyurt, B. Demirata, R. Apak // *Talanta*. – 2007. - V. 71. – P. 1155-1165.
81. Stevanato, R. Enzymatic method for the determination of total phenolic content in tea and wine [Текст] / R. Stevanato, S. Fabris, F. Momo // *Journal Agriculture Food Chemistry*. – 2004. - V. 52. – P. 6287-6293.
82. Miller, N. J. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates [Текст] / N. J. Miller, C. A. Rice-Evans, M. J. Davies, V. Gopinathan, A. Milner // *Clinical Science*. – 1993. - V. 84. – P. 407-412.
83. Miller, N. J. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS.+ radical cation assay [Текст] / N. J. Miller, C. A. Rice-Evans // *Free Radical Research*. – 1997. - V. 26. – P. 195-199.
84. Strube, M. Pitfalls in a method for assessment of total antioxidant capacity [Текст] / M. Strube, G. R. M. M. Haenen, H. van den Berg, A. Bast // *Free Radical Research*. – 1997. - V. 26. – P. 515-521.
85. Pellegrini, N. R. R. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [Текст] / R. R. N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala,

- M. Yang, C. A. Rice-Evans // *Free Radical Biology Medicine*. – 1999. - V. 26. – P. 1231-1237.
86. Miller, N. J. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls [Текст] / N. J. Miller, J. Sampson, L. P. Candeias, P. M. Bramley, C. A. Rice-Evans // *Federation European Biochemical Societies Letters*. – 1996. - V. 384. – P. 240-242.
87. Benavente-Garcia, O. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves [Текст] / O. Benavente-Garcia, J. Castillo, J. Lorente, A. Ortuno // *Food Chemistry*. – 2000. - V. 68. – P. 457-462.
88. Cantarella, G. Free radical versus electron-transfer routes of oxidation of hydrocarbons by laccase/mediator systems: catalytic or stoichiometric procedures [Текст] / G. Cantarella, C. Galli, P. Gentili // *Journal of Molecular Catalysis B*. – 2003. - V. 22. – P. 135-144.
89. Wolfenden, B. S. Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) [Текст] / B. S. Wolfenden, R. L. Willson // *Journal Chemical Society*. – 1982. - V. 7. – P. 805-812.
90. Arnao, M. B. Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase: a new approach for determining total antioxidant status of foods [Текст] / M. B. Arnao, A. Cano, J. Hernandez-Ruiz, F. Garcia-Canovas, M. Acosta // *Analytical Biochemistry*. – 1996. - V. 236. – P. 255-261.
91. Kadnikova, E. N. Oxidation of ABTS by hydrogen peroxide catalyzed by horseradish peroxidase encapsulated into sol-gel glass.: Effects of glass matrix on reactivity [Текст] / E. N. Kadnikova, N. M. Kostic // *Journal of Molecular Catalysis B*. – 2002. - V. 18. – P. 39-48.
92. Campos, A. M. Kinetics of the reaction between ABTS derived radical cations and phenols [Текст] / A. M. Campos, E. Lissi // *Int. Journal Chemical Kinetics*. – 1997. - V. 29. – P. 219-224.

93. Erel, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation [Текст] / O. Erel // *Clinical Biochemistry*. – 2004. - V. 37. – P. 277-285.
94. Pellegrini N., R. Re. Application of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation assay to a flow injection system for the evaluation of antioxidant activity of some pure compounds and beverages [Текст] / R. R. N. Pellegrini, B. Colombi, M. Bianchi, F. Brighenti // *Journal Agriculture Food Chemistry*. – 2003. - V. 51. – P. 260-264.
95. Papariello, G. J. Diphenylpicrylhydrazyl as an Organic Analytical Reagent in the Spectrophotometric Analysis of Phenols [Текст] / G. J. Papariello, M. A. M. Janish // *Analytical Chemistry*. – 1966. - V. 38. – P. 211-214.
96. Blois, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical [Текст] / M. S. Blois // *Nature*. – 1958. - V. 181. – P. 1199-1200.
97. Jimenez-Escrig, A. Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl [Текст] / A. Jimenez-Escrig, I. Jimenez-Jimenez, C. Sanchez-Moreno, F. Saura-Calixto // *Journal Science Food Agriculture*. – 2000. - V. 80. – P. 1686-1690.
98. Foti, M. C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions [Текст] / M. C. Foti, C. Daquino, C. Geraci // *Journal Organic Chemistry*. – 2004. - V. 69. – P. 2309-2314.
99. Perkampus, H.-H. UV-Vis Atlas of Organic Compounds, 2nd ed. [Текст] / H.-H. Perkampus – VCH: New York. –1991. – Part II. – J4124. – p 1139.
100. Pulido, R. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing / antioxidant power assay [Текст] / R. Pulido, L.Bravo, F.Saura-Calixto // *Journal Agriculture Food Chemistry*. – 2000. - V. 48. – P. 3396-3402.
101. Ghiselli, A. Total Antioxidant Capacity as a Tool to Assess Redox Status: Critical View and Experimental Data [Текст] / A. Ghiselli, M. Serafini, F. Natella, C. Scaccini // *Free Radical Biology Medicine*. – 2000. - V. 29. – P. 1106–1114.

102. Muller, L. Comparative Antioxidant Activities of Carotenoids Measured by Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), ABTS Bleaching Assay (aTEAC), DPPH Assay and Peroxyl Radical Scavenging Assay [Текст] / L. Muller, K. Frohlich, V. Bohm // *Food Chemistry*. – 2011. - V. 129. – P. 139–148.
103. Berker, K. I. Comparative Evaluation of Fe(III) Reducing Power-Based Antioxidant Capacity Assays in the Presence of Phenanthroline, Batho-Phenanthroline, Tripyridyltriazine (FRAP), and Ferricyanide Reagents [Текст] / K. I. Berker, K. G. Izzet Tor, R. Apak // *Talanta*. – 2007. - V. 72. – P. 1157–1165.
104. Apak, R. Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)-neocuproine as chromogenic oxidant: the CUPRAC method [Текст] / R. Apak, K. Güçlü, M. Özyürek, S. E. Karademir, M. Altun // *Free Radical Research*. – 2005. - V. 39. – P. 949-961.
105. Fenton, H.J.H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron [Текст] / H.J.H. Fenton // *Journal Chemical Society*. – 1894. - V. 65. – P. 899-910.
106. Bektaşoğlu, B. Novel hydroxyl radical scavenging antioxidant activity assay for water-soluble antioxidants using a modified CUPRAC method [Текст] / B. Bektaşoğlu, S. E. Çelik, M. Özyürek, K. Güçlü, R. Apak // *Biochemical Biophysical Research Communications*. – 2006. - V. 345. – P. 1194-2000.
107. Özyürek, M. Hydroxyl radical scavenging assay of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method using catalase for hydrogen peroxide degradation [Текст] / M. Özyürek, B. Bektaşoğlu, K. Güçlü, R. Apak // *Analytica Chimica Acta*. – 2008. - V. 616. – P. 196-206.
108. Özyürek, M. Measurement of xanthine oxidase inhibition activity of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method [Текст] / M. Özyürek, B. Bektaşoğlu, K. Güçlü, R. Apak. *Analytica Chimica Acta*. – 2009. - V. 636. – P. 42-50.
109. Özyürek, M. A novel hydrogen peroxide scavenging assay of phenolics and flavonoids using cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) methodology

[Текст] / M. Özyürek, B. Bektaşoğlu, K. Güçlü, N. Güngör, R. Apak // *Journal Food Composition Analysis*. – 2010. - V. 23. – P. 689-698.

110. Bener, M. Development of a low-cost optical sensor for cupric reducing antioxidant capacity measurement of food extracts [Текст] / M. Bener, M. Özyürek, K. Güçlü, R. Apak // *Analytical Chemistry*. – 2010. - V. 82. – P. 4252-4258.

111. Özyürek, M. The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement [Текст] / M. Özyürek, K. Güçlü, R. Apak // *Trends in Analytical Chemistry*. – 2011. - V. 30. – P. 652-664.

112. Özyürek, M. A comprehensive review of CUPRAC methodology [Текст] / M. Özyürek, K. Güçlü, E. Tütem, K. Sözgen-Başkan, E. Erçağ, S. E. Çelik, S. Baki, L. Yıldız, Ş. Karaman, R. Apak // *Analytical Methods*. – 2011. - V. 3. – P. 2439-2453.

113. Wagner, H. Biologically active compounds from the aqueous extract of *Urtica dioica* [Текст] / H. Wagner, F. Willer, B. Kreher // *Planta Medica*. – 1989. - V. 55. – P. 452–454.

114. Ziyatdinova, G. Electroanalysis of antioxidants in pharmaceutical dosage forms: state-of-the-art and perspectives [Текст] / G. Ziyatdinova, H. Budnikov // *Monatsh Chemistry*. – 2015. – V. 146. – № 5. – P. 741- 753.

115. Hart, J.P. Electroanalysis of biologically important compounds [Текст] / J.P. Hart. – London: Ellis Harwood, 1990. – 256 p.

116. Wang, J. Analytical electrochemistry [Текст] / J. Wang. – New Jersey: Wiley-VCH Pub, 2006. – 272 p.

117. Fundamentals of electrochemistry [Текст] / Ed. V.S. Bagotsky. – New Jersey: Wiley Interscience, JohnWiley & Sons Pub., 2006. – 722 p.

118. Bard, A.J. Electrochemical methods, fundamentals and applications. 2nd ed. [Текст] / A.J. Bard, L.R. Faulkner. – New York: John Wiley & Sons Inc., 2001. – 850 p.

119. Будников, Г.К. Основы современного электрохимического анализа [Текст] / Г.К. Будников, В.Н. Майстренко, М.Р. Вяселев. – М.: Бином, Лаборатория знаний, 2003. – 592 с.

120. Brainina, Kh.Z. Electroanalysis: From laboratory to field versions (Review) [Текст] / Kh.Z. Brainina // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2001. - V. 56. – P. 303-312.
121. Kurbanoglu, S. Recent developments on electrochemical flow injection in pharmaceuticals and biologically important compounds (Review) [Текст] / S. Kurbanoglu, M.A. Unal, S.A. Ozkan // *Electrochimica Acta*. – 2018. - V. 287. – P. 135-148.
122. Sochor, J. Electrochemistry as a tool for studying antioxidant properties(Review) [Текст] / J. Sochor, J. Dobes, O. Krystofova, B. Ruttkay-Nedecky, P. Babula, M. Pohanka, T. Jurikova, O. Zitka, V. Adam, B. Klejdus, R. Kizek // *International Journal of Electrochemical Science*. – 2013. - V. 8. – № 6. – P. 8464-8489.
123. Ferreira, R. D. Q. Electrochemical Determination of the Antioxidant Capacity: The Ceric Reducing/Antioxidant Capacity (CRAC) Assay [Текст] / R. D. Q. Ferreira, L. A. Avaca // *Electroanalysis*. – 2008. - V. 20. – P. 1323–1329.
124. Wilkolazka, A.J. Use of laccase-modified electrode for amperometric detection of plant flavonoids [Текст] / A.J. Wilkolazka, T. Ruzgas, L. Gorton // *Enzyme Microb. Technol.* – 2004. – V. 35. – № 2-3. – P. 238.
125. Amatongchai, M. Simple flow injection for screening of total antioxidant capacity by amperometric detection of DPPH radical on carbon nanotube modified-glassy carbon electrode [Текст] / M. Amatongchai, S. Laosing, O. Chailapakul, D. Nacapricha // *Talanta*. – 2012. - V. 97. – P. 267–272.
126. Tyurin, V.Y. The electrochemical approach to antioxidant activity assay of metal complexes with dipicolylamine ligand, containing 2,6-di-tert-butylphenol groups, based on electrochemical DPPH-test [Текст] / V.Y. Tyurin, A.A. Moiseeva, D.B. Shpakovsky, E.R. Milaeva // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2015. - V. 756. – P. 212-221.
127. Vasilescu, I. Determination of the antiradical properties of olive oils using an electrochemical method based on DPPH radical [Текст] / I. Vasilescu, S.A.V.

- Eremia, C. Albu, A. Radoi, S.-C. Litescu, G.-L. Radu // *Food Chem.* – 2015. – V. 166. – P. 324.
128. Milardović S. A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical [Текст] / S. Milardović, D. Iveković, B.S. Grabarić // *Bioelectrochem.* – 2006. – V. 68. – № 9. – P. 175.
129. Milardovic S. Use of DPPH•/DPPH redox couple for biamperometric determination of antioxidant activity [Текст] / S. Milardovic, D. Iveković, V. Rumenjak, B.S. Grabarić // *Electroanalysis.* – 2005. – V. 20. – № 20. – P. 1847.
130. Pisoschi A.M. Total antioxidant capacity of some commercial fruit juices: electrochemical and spectrophotometrical approaches [Текст] / A.M. Pisoschi, M.C. Cheregi, A.F. Danet // *Molecules.* – 2009. – V. 14. – № 1. – P. 480.
131. Зиятдинова, Г.К. Кулонометрия в анализе антиоксидантов [Текст] / Г.К. Зиятдинова, Г.К. Будников // *Украинский химический журнал.* – 2005. – Т.71. – № 9-10. – С. 45.
132. Зиятдинова, Г.К. Электрохимическое определение липоевой кислоты [Текст] / Г.К. Зиятдинова, Г.К. Будников, В.И. Погорельцев // *Журн. аналит. химии.* – 2004. – Т. 59. – № 3. – С. 324.
133. Зиятдинова, Г.К. Прямое определение гипоксена и его аналогов методом гальваностатической кулонометрии [Текст] / Г.К. Зиятдинова, Г.К. Будников, А.А. Лапин // *Журн. аналит. химии.* – 2007. – Т. 62. – № 3. – С. 292.
134. Ziyatdinova, G.K. Direct determination of captopril using electrogenerated halogens for pharmaceuticals quality control [Текст] / G.K. Ziyatdinova, H.C. Budnikov // *Eurasian J. Anal. Chem.* – 2007. – V. 2. – № 2. – P. 84.
135. Зиятдинова, Г.К. Определение некоторых катехоламинов методами кулонометрического титрования и циклической вольтамперометрии [Текст] / Г.К. Зиятдинова, Г.К. Будников // *Журн. аналит. химии.* – 2005. – Т. 60. – № 7. – С. 753.
136. Зиятдинова, Г.К. Кулонометрическое определение серосодержащих аминокислот с применением галогенов как титрантов-окислителей [Текст] /

- Г.К. Зиятдинова, Л.В. Григорьева, Г.К. Будников // Журн. аналит. химии. – 2007. – Т. 62. – № 12. – С. 1304.
137. Будников, Г.К. Электрохимическое определение глутатиона [Текст] / Г.К. Будников, Г.К. Зиятдинова, Я.Р. Валитова / Журн. аналит. химии. – 2004. – Т. 59. – № 6. – С. 645.
138. Зиятдинова, Г.К. Определение сывороточного альбумина в крови методом гальваностатической кулонометрии с применением электрогенерированных окислителей [Текст] / Г.К. Зиятдинова, Г.К. Будников, В.И. Погорельцев // Журн. аналит. химии. – 2004. – Т. 59. – № 7. – С. 742.
139. Зиятдинова, Г.К. Реакции фенольных антиоксидантов с электрогенерированными гексацианоферрат(III)-ионами и их применение в анализе растительных масел [Текст] / Г.К. Зиятдинова, А.А. Хузина, Г.К. Будников // Журн. аналит. химии. – 2013. – Т. 68. – № 1. – С. 84.
140. Huang, D. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays [Текст] / D. Huang, B. Ou, R. L. Prior // Journal Agriculture Food Chemistry. – 2005. – V. 53. – P. 1841-1856.
141. Prior, R. L. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements [Текст] / R. L. Prior, X. Wu, K. Schaich // Journal Agriculture Food Chemistry. – 2005. – V. 53. – P. 4290-4302.
142. Glazer, A. N. Phycoerythrin fluorescence based assay for reactive oxygen species [Текст] / A. N. Glazer // Methods Enzymology. – 1990. – V. 186. – P. 161–168.
143. Ghiselli, A. New approaches for measuring plasma or serum antioxidant capacity: a methodological note [Текст] / A. Ghiselli, M. Serafini, A. Ferro-Luzzi // Free Radical Biology Medicine. – 1994. – V. 16. – P. 135–137.
144. Cao, G. H. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants [Текст] / G. H. Cao, H. M. Alessio, R. G. Cutler. Free Radical Biology Medicine. – 1993. – V. 14. – P. 303–311.

145. Glazer, A.N. Fluorescence-base assay for reactive oxygen species: A protective role for creatinine [Текст] / A. N. Glazer // Federation of American Societies for Experimental Biology – FASEB Journal. – 1988. – V. 2. – P. 2487-2492.
146. Cao, G. H. Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the COBAS FARA II [Текст] / G. H. Cao, C. P. Verdon, A. H. B. Wu, H. Wang, R. L. Prior // Clinical Chemistry. – 1995. – V. 41. – P. 1738-1744.
147. Cao, G. H. Antioxidant capacity of tea and common vegetables [Текст] / G. Cao, E. Sofic, R. L. Prior // Journal Agriculture Food Chemistry. – 1996. – V. 44. – P. 3426-3431.
148. Handelman, G. J. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 1. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation and oxygen radical absorbance capacity [Текст] / G. J. Handelman, G. Cao, M. F. Walter, Z. D. Nightingale, G. L. Paul, R. L. Prior, J. B. Blumberg // Journal Agricultural Food Chemistry. – 1999. – V. 47. – P. 4888-4893.
149. Ou, B. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study [Текст] / B. Ou, D. Huang, M. Hampsch-Woodill, J. A. Flanagan, E. K. Deemer // Journal Agricultural Food Chemistry. – 2002. – V. 50. – P. 3122-3128.
150. Ou, B. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe [Текст] / B. Ou, M. Hampsch-Woodill, R. L. Prior // Journal Agricultural Food Chemistry. – 2001. – V. 49. – P. 4619-4626.
151. Huang, D. Development and Validation of Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay for Lipophilic Antioxidants Using Randomly Methylated β -Cyclodextrin as the Solubility Enhancer [Текст] / D. Huang, B. Ou, M. Hampsch-Woodill, J. A. Flanagan, E. K. Deemer // Journal Agricultural Food Chemistry. – 2002. – V. 50. – P. 1815-1821.
152. Ou, B. Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe [Текст] / B. Ou, M. Hampsch-Woodill, J. A. Flanagan, E. K.

Deemer, R. L. Prior, D. Huang // *Journal Agricultural Food Chemistry*. – 2002. – V. 50. – P. 2772-2777.

153. Huang, D. High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format [Текст] / D. Huang, B. Ou, M. Hampsch-Woodill, J. A. Flanagan, R. L. Prior // *Journal Agricultural Food Chemistry*. – 2002. – V. 50. – P. 4437 - 4444.

154. Prior, R. L. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL) of plasma and other biological and food samples [Текст] / R. L. Prior, A. Hoang, L. Gu, X. Wu, M. Bacchiocca, L. Howard, M. Hampsch-Woodill, D. Huang, B. Ou, R. Jacob // *Journal Agricultural Food Chemistry*. – 2003. – V. 51. – P. 3273-3279.

155. Zheng, W. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries [Текст] / W. Zheng, S. Y. Wang // *Journal Agricultural Food Chemistry*. – 2003. – V. 51. – P. 502-509.

156. Sanchez-Moreno, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems [Текст] / C. Sanchez-Moreno // *Food Science and Technology International*. – 2002. – V. 8. – P. 121-137.

157. Wayner, D.D. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins [Текст] / D.D. Wayner, G.W. Burton, K.U. Ingold, S. Locke // *FEBS letters*. – 1985. – V. 187. – № 1. – p. 33-37.

158. Wayner, D.D. The Relative Contributions of Vitamin E, Urate, Ascorbate and Proteins to the Peroxy Radical-Trapping Antioxidant Activity of Human Blood Plasma [Текст] / D. D. Wayner, G. W. Burton, K. U. Ingold, L. R. C. Barclay, S. J. Locke // *Biochimica Biophysica Acta*. – 1987. – V. 924. – P. 408-419.

159. Wayner, D. D. Radical-trapping antioxidants in vitro and vivo [Текст] / D. D. M. Wayner // *Bioelectrochemistry Bioenergetics*. – 1987. – V. 18. – № 1-3. – P. 219-229.

160. Whitehead, T.P. Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids [Текст] / T. P. Whitehead, G. H. G. Thorpe, S. R. J. Maxwell // *Analytica Chimica Acta*. – 1992. – V. 266. – № 2. – P. 265-277.
161. Bastos, E.L. Evaluation of Antiradical Capacity by H₂O₂-Hemin-Induced Luminol Chemiluminescence [Текст] / E.L. Bastos, P. Romoff, C.R. Eckert, W.J. Baader // *Journal Agricultural Food Chemistry*. – 2003. – V. 57. – P. 7481-7488.
162. Kojima, H. Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production [Текст] / H. Kojima, Y. Urano, K. Kikuchi, T. Higuchi, Y. Hirata, T. Nagano // *Angewandte Chemie International Edition*. – 1999. – V. 38. – P. 3209-3212.
163. Tanaka, K. Rational design of fluorescein-based fluorescent probes. Mechanism-based design of a maximum fluorescence probe for singlet oxygen [Текст] / K. Tanaka, T. Miura, N. Umezawa, Y. Urano, K. Kikuchi, T. Higuchi, T. Nagano // *Journal of the American Chemical Society*. – 2001. – V. 123. – P. 2530-2536.
164. Valkonen, M. Spectrophotometric assay for total peroxy radical-trapping antioxidant potential in human serum [Текст] / M.Valkonen, T. Kuusi // *Journal of Lipid Research*. – 1997. – V. 38. – P. 823-833.
165. Lange, R. J. Phycoerythrin fluorescence-base assay for peroxy radicals: A screen for biologically relevant protective agents [Текст] / R. J. Delange, R. N. Glazer // *Analytical Biochemistry*. – 1989. – V. 177. – P. 300-308.
166. Ghiselli, A. A fluorescence- based method for measuring total plasma antioxidant capability [Текст] / A. Ghiselli, M. Serafini, G. Maiani, E. Azzini, A. Ferro-Luzzi // *Free Radicals Biology Medicine*. – 1995. – V. 18. – P. 29–36.
167. Bartosz, G. Simple determination of peroxide radical-trapping capacity [Текст] / G. Bartosz, A. Janaszewska, D. Ertel, M. Bartosz // *Biochemistry Molecular Biology International*– 1998. – Vol. 46. – P. 519–528.
168. Turaro, F. Analysis of plasma antioxidants capacity by competition kinetics [Текст] / F. Turaro, A. Ghiselli, P. Rapuzzi, M. Maiorino, F. Ursini // *Free Radicals Biology Medicine*. – 1998. – V. 24. – P.1228-1234.

169. Howard, J. J. Inhibited autoxidation of styrene. IV. Solvent effects [Текст] / J. J. Howard, P. J. A. Taylor, K. U. Ingold // Canadian Journal Chemistry. – 1964. – V. 42. – P.1044-1056.
170. Valkonen, M. Spectrophotometric assay for total peroxy radical-trapping antioxidant potential in human serum [Текст] / M. Valkonen, T. Kuusi // Journal Lipid Research. – 1997. – V. 38. – № 4. – P. 823-833.
171. Wright, J.S. Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants [Текст] / J.S. Wright, E.R. Johnson, G.A. DiLabio // Journal American Chemical Society. – 2001. – V. 123. – P. 1173-1183.
172. Aruoma, O.I Evaluation of the antioxidant and proantioxidant actions of gallic acid and its derivatives [Текст] / O.I. Aruoma, A. Murcia, J. Butler, B. Halliwell // Journal Agricultural Food Chemistry. – 1993. – V. 41. – P. 1880–1885.
173. Quick, K.L. Rapid microplate assay for superoxide scavenging efficiency [Текст] / K.L. Quick, J.I. Hardt, L.L. Dugan // Journal of Neuroscience Methods. – 2000. – V. 97. – P.138–144.
174. MacDonald-Wicks, L.K. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review [Текст] / L.K. MacDonald-Wicks, L.G. Wood, M.L. Garg // Journal Science Food Agriculture. – 2006. – V. 86. – P. 2046–2056.
175. Vonkruedener, S. Gas chromatographic differentiation between myeloperoxidase activity and fenton-type oxidants [Текст] / S. Vonkruedener, H. Schempp, E.F. Elstner // Free Radical Biology and Medicine. – 1995. – V. 19. – P. 141–146.
176. Lavelli, V. Evaluation of radical scavenging activity of fresh and air-dried tomatoes by three model reactions [Текст] / V. Lavelli, S. Hippeli, C. Peri, E.F. Elstner // Journal Agricultural Food Chemistry. – 1999. – V. 47. – P. 3826–3831.
177. Rimbach, G. Phytic acid inhibits free radical formation in vitro but does not affect liver oxidant or antioxidant status in growing rats [Текст] / G. Rimbach, J. Pallauf // Journal Nutrition. – 1998. – V. 128. – P. 1950–1955.

178. Calliste, C.A. Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants [Текст] / C.A. Calliste, P. Trouillas, D.P. Allais, A. Simon, J.L. Duroux // *Journal Agricultural Food Chemistry*. – 2001. – V. 49. – P. 3321–3327.
179. Parejo, I. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants [Текст] / I. Parejo, F. Viladomat, J. Bastida, A. Rosas-Romero, N. Flerlage, J. Burillo, C. Codina // *Journal Agricultural Food Chemistry*. – 2002. – V. 50. – P.6882–6890.
180. Свистунова, О.И. Гликозилированные белки сыворотки крови: тест фруктозамин [Текст] / О.И. Свистунова, В.Н. Титов // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 1992. – №11-12. – С. 22-30.
181. Tarpey, M. M. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite [Текст] / M.M.Tarpey, I. Fridovich // *Circulation Research*. – 2001. – V. 89. – P. 224–236.
182. Ruch, R.J. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea [Текст] / R.J. Ruch, S.J. Cheng, J.E. Klaunig // *Carcinogenesis*. – 1989. – V. 10. – P.1003–1008.
183. Santocono, M. Influence of astaxanthin, zeaxanthin and lutein on DNA damage and repair in UVA-irradiated cells [Текст] / M. Santocono, M. Zurria, M. Berrettini, D. Fedeli, G. Falcioni // *Journal Photochemistry Photobiology*. – 2006. – V. 85. – P.205–215.
184. Berges, A. Timedependent expression pattern of nitric oxide and superoxide after myocardial infarction in rats [Текст] / A. Berges, L. Van Nassauw, J.P. Timmermans, C. Vrints // *Pharmacological Research*. – 2007. – V. 55. – P.72–79.
185. Magalhaes, L.M. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties [Текст] / L.M. Magalhaes, M.A. Segundo, S. Reis, J.L.Lima // *Analytica Chimica Acta*. – 2008. – V. 613. – P.1–19.

186. Corbett, J.T. The scopoletin assay for hydrogen peroxide. A review and a better method [Текст] / J.T. Corbett // *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. – 1989. – V. 18. – P. 297–307.
187. Zhu, B. Z. Evidence for production of hydroxyl radicals by pentachlorophenol metabolites and hydrogen peroxide: A metal-independent organic Fenton reaction [Текст] / B.Z. Zhu, N. Kitrosky, M. Chevion // *Biochemical Biophysical Research Communications*. – 2000. – V. 270. – № 3. – P. 942-946.
188. Halliwell, B. Antioxidant characterization, methodology and mechanism [Текст] / B. Halliwell // *Biochemical Pharmacology*. – 1995. – V. 49. – P.1341.
189. Hou, Y.C. Current trends in the development of nitric oxide donors [Текст] / Y.C. Hou, A. Janczuk, P.G. Wang // *Current Pharmaceutical Design*. – 1999. – V. 5. – P. 417–441.
190. Pacher, P. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease [Текст] / P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet // *Physiological Reviews*. – 2007. – V. 87. – P. 315–424.
191. Vriesman, M.F. A method for measuring nitric oxide radical scavenging activity. Scavenging properties of sulfur-containing compounds [Текст] / M.F. Vriesman, G.R.M.M. Haenen, G.J. Westerveld, J.B.G .Paquay, H.P. Voss, A. Bast // *Pharmacy World & Science*. – 1997. – V. 19. – P. 283–286.
192. Nishibayashi, S. Scavenging effects of dopamine agonists on nitric oxide radicals [Текст] / S. Nishibayashi, M. Asanuma, R. Kohno, M. GomezVargas, N. Ogawa // *Journal Neurochemistry*. – 1996. – V. 67. – P. 2208–2211.
193. Asanuma, M. Neuroprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs by direct scavenging of nitric oxide radicals [Текст] / M. Asanuma, S. Nishibayashi-Asanuma, I. Miyazaki, M. Kohno, N. Ogawa // *Journal Neurochemistry*. – 2001. – V. 76. – P. 1895–1904.
194. Krol, W. Inhibition of nitric oxide (NO.) production in murine macrophages by flavones [Текст] / W. Krol, Z.P. Czuba, M.D. Threadgill, B.D.M. Cunningham, G. Pietsz // *Biochemical Pharmacology*. – 1995. – V. 50. – P. 1031–1035.

195. Hevel, J.M. Nitric-oxide synthase assays [Текст] / J.M. Hevel, M.A. Marletta // *Methods Enzymology*. – 1994. – V. 233. – P. 250–253.
196. Grisham, M.B. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids [Текст] / M.B. Grisham, G.G. Johnson, J.R. Lancaster // *Methods Enzymology*. – 1996. – V. 268. – P. 237–246.
197. Magalhaes, L.M. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties [Текст] / L.M. Magalhaes, M.A. Segundo, S. Reis, J.L.F.C. Lima // *Analytica Chimica Acta*. – 2008. – V. 613. – P. 1–19.
198. Nagata, N. Inhibitory effects of catecholamines and anti-oxidants on the fluorescence Reaction of 4,5-diaminofluorescein, DAF-2, a novel indicator of nitric oxide [Текст] / N. Nagata, K. Momose, Y. Ishida // *Journal Biochemistry*. – 1999. – V. 125. – P.658–661.
199. Zhang, X. Interfering with nitric oxide measurements. 4, 5-diaminofluorescein reacts with dehydroascorbic acid and ascorbic acid [Текст] / X. Zhang, W.S. Kim, N. Hatcher, K. Potgieter, L.L. Moroz, R. Gillette, J.V.Sweedler // *Journal Biological Chemistry*. – 2002. – V. 277. – P.48472–48478.
200. Moncada, S. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to NO [Текст] / S. Moncada, E.A. Higgs // *Federation American Societies Experimental Biology Journal*. – 1995. – V. 9. – P. 1319.
201. Pannala, A. Inhibition of peroxynitrite dependent tyrosine nitration by hydroxycinnamates: Nitration or electron donation? [Текст] / A. Pannala, R. Razaq, B. Halliwell, S.Singh, C.A. Rice-Evans // *Free Radical Biology Medicine*. – 1998. – V. 24. – P. 594-606.
202. Kooy, N. W. R. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123 [Текст] / N. W. R. Kooy, H. Ischiropoulos, J. S. Beckman // *Free Radical Biology Medicine*. – 1994. – V. 20. – P.149-156.
203. Paquay, J. B. G. Protection against nitric oxide toxicity by tea [Текст] / J. B. G. Paquay, G.R.M.M. Haenen, G. Stender, S. A. Wiseman, L. Tijburg, A. Bast // *Journal Agricultural Food Chemistry*. – 2000. – V. 48. – P. 5768-5772.

204. Chung, H. Y. Y. T. Peroxynitrite-scavenging activity of green tea tannin [Текст] / H. Y. Y. T. Chung, D. Y. Soung, I. S. Kye, J. K. No, B. S. J. Baek // *Journal Agricultural Food Chemistry*. – 1998. – V. 46. – P. 4484-4486.
205. Короткова, Е. И. Вольтамперометрический способ определения активности антиоксидантов [Текст] / Е. И. Короткова // *Журнал физической химии*. – 2000. – Т. 74. – № 9. – С. 1704-1706.
206. Korotkova, E. I. Study of antioxidant properties by voltammetry [Текст] / E. I. Korotkova, Yu. A. Karbainov, A. V. Shevchuk // *Journal Electroanalytical Chemistry*. – 2002. – V. 508. – № 1. – P.56-60.
207. Korotkova, E. I. Investigation of antioxidant and catalytic properties of some biologically active substances by voltammetry [Текст] / E.I. Korotkova, Yu.A. Karbainov, O.A. Avramchik // *Analytical Bioanalytical Chemistry*. – 2003. – V. 375. – № 1-3. – P.465-468.
208. Короткова, Е. И. Вольтамперометрическое определение антиоксидантной активности растительного сырья и некоторых продуктов питания [Текст] / Е. И. Короткова, Ю. А. Карбаинов, О. А. Аврамчик // *Известия вузов. Химия и химическая технология*. – 2002. – Т. 45. – № 3. – С. 110-112.
209. Короткова, Е. И. Определение антиоксидантной активности экстрактов растительного сырья методом катодной вольтамперометрии [Текст] / Е.И. Короткова, О.А. Аврамчик, М.С. Юсубов, М.В. Белоусов, Т.И. Андреева // *Химико – фармацевтический журнал*. – 2003. – Т. 37. – № 9. – С. 55-57.
210. Aruoma, O.I. Evaluation of the antioxidant and proantioxidant actions of gallic acid and its Derivatives [Текст] / O.I. Aruoma, A. Murcia, J. Butler, B. Halliwell // *Journal Agricultural Food Chemistry*. – 1993. – V. 41. – P. 1880–1885
211. Короткова, Е. И. Вольтамперометрический метод определения суммарной активности антиоксидантов в объектах искусственного и природного происхождения [Текст] / Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора химических наук.

212. Ziyatdinova, G.K. Electrochemical determination of total antioxidant capacity of human plasma [Текст] / G.K. Ziyatdinova, H.C. Budnikov, V.I. Pogorel'tzev // Analytical Bioanalytical Chemistry. – 2005. – V. 381. – № 8. – P. 1546.
213. Imabayashi, S. Amperometric biosensor for polyphenol based on horseradish peroxidase immobilized on gold electrodes [Текст] / S. Imabayashi, Y. Kong, M. Watanabe // Electroanalysis. – 2001. – V. 13. – № 5. – P. 408 - 412.
214. Kong, Y.T. Peroxidase-based amperometric sensor for the determination of total phenols using two-stage peroxidase reactions [Текст] / Y.T. Kong, S. Imabayashi, K. Kano, T. Ikeda, T. Kakiuchi // American Journal Enology Viticulture. – 2001. – V. 52. – № 4. – P. 381-385.
215. Mello, L.D. Peroxidase-based biosensor as a tool for a fast evaluation of antioxidant capacity of tea [Текст] / L.D. Mello, A.A. Alves, D.V. Macedo, L.T. Kubota // Food Chemistry. – 2005. – V. 92. – № 3. – P. 515 - 519.
216. Karyakina, E. E. Kinetic approach for evaluation of total antioxidant activity [Текст] / E. E. Karyakina, D. V. Vokhmyanina, N. V. Sizova, A. N. Sabitov, A. V. Borisova, T. G. Sazontova, Y. V. Arkhipenko, V. A. Tkachuk, Y. A. Zolotov, A. A. Karyakin // Talanta. – 2009. – V. 80. – P. 749–753.
217. Karyakin, A.A. Prussian blue and its analogues: electrochemistry and analytical applications [Текст] / A.A. Karyakin // Electroanalysis. – 2001. – V. 13. – P. 813–819.
218. Gorjanović, S.Z. Polarographic assay based on hydrogen peroxide scavenging in determination of antioxidant activity of strong alcohol beverages [Текст] / S.Z. Gorjanović, M.M. Novaković, P.V. Vukosavljević, F.T. Pastor, V.V. Tesević, D.Z. Suznjević // Journal Agricultural Food Chemistry. – 2010. – V. 58. – № 14. – P. 8400-8406.
219. Gorjanovic, S. Antioxidant activity of wines determined by a polarographic assay based on hydrogen peroxide scavenge [Текст] / S. Gorjanovic, M. Novakovic, N. Potkonjak, D. Suznjevic // Journal Agricultural Food Chemistry. – 2010. – V. 58. – P. 4626–4631.

220. Gorjanovic, S. Application of a novel antioxidative assay in beer analysis and brewing process monitoring [Текст] / S. Gorjanovic, M. Novakovic, N. Potkonjak, I. Leskosek-Cukalovic, D. Suznjevic // *Journal Agricultural Food Chemistry*. – 2010. – V. 58. – P. 744–751.
221. Oliveira, R. Electrogenated HO radical reactions: the role of competing reactions on the degradation kinetics of hydroxy-containing aromatic compounds [Текст] / R. Oliveira, D. Geraldo, F. Bento // *Electrochimica Acta*. – 2014. – V. 135. – P. 19–26.
222. Oliveira, R. Radical scavenging activity of antioxidants evaluated by means of electrogenerated HO radical [Текст] / R. Oliveira, D. Geraldo, F. Bento // *Talanta*. – 2014. – V. 129. – P. 320–327.
223. Oliveira, R. Aromatic hydroxylation reactions by electrogenerated HO radicals: A kinetic study [Текст] / R. Oliveira, F. Bento, D. Geraldo // *Journal Electroanalytical Chemistry*. – 2012. – V. 682. – P. 7–13.
224. Comninellis, C. Electrocatalysis in the electrochemical conversion/combustion of organic pollutants for waste water treatment [Текст] / C. Comninellis // *Electrochimica Acta*. – 1994. – V. 39. – P. 1857–1862.
225. Hippeli, S. Transition metal ion-catalyzed oxygen activation during pathogenic processes [Текст] / S. Hippeli, E.F. Elstner // *Federation European Biochemical Societies Letters*. – 1999. – V. 443. – P. 1–7.
226. Kehrer, J.P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity [Текст] / J.P. Kehrer // *Toxicology*. – 2000. – V. 149. – P. 43–50.
227. Haber, F. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts [Текст] / F. Haber, J. Weiss // *Proceedings Royal Society London Series A*. – 1934. – V. 147. – P. 332–351.
228. Merz, J.H. The mechanism of oxidation of alcohols by Fenton's reagent [Текст] / J.H. Merz, W.A. Waters // *Discuss Faraday Society*. – 1947. – V. 2. – P. 179–188.
229. Goldstein, S. The Fenton reagents [Текст] / S. Goldstein, D. Meyerstein, G. Czapski // *Free Radical Biology Medicine*. – 1993. – V. 15. – P. 435–445.

230. Halliwell, B. How to characterize a biological antioxidant [Текст] / B. Halliwell // Free Radical Research Communications. – 1990. – V. 9. – P. 1–32.
231. Elhabiri, M. Complexation of iron(III) by catecholate-type polyphenols [Текст] / M. Elhabiri, C. Carrer, F. Marmolle, H. Traboulsi // Inorganica Chimica Acta. – 2007. – V. 360. – P. 353–359.
232. Martell, A. E. Critical stability constants [Текст] / A. E. Martell, R. M. Smith // New York: Plenum Press. – 1977. – V. 3. – P. 200–201.
233. Avdeef, A. Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. 9. Stability constants for catechol models of enterobactin [Текст] / A. Avdeef, S. R. Sofen, T. L. Bregante, K. N. Raymond // Journal American Chemical Society. – 1978. – V. 100. – P. 5362–5370.
234. Kennedy, J. A. Aluminium(III) and iron(III) 1, 2-diphenolato complexes: A potentiometric study [Текст] / J. A. Kennedy, H. K. J. Powell // Australian Journal Chemistry. – 1985. – V. 38. – P. 659–667.
235. Harris, W. R. Ferric ion sequestering agents. 3. The spectrophotometric and potentiometric evaluation of two new enterobactin analogues: 1, 5, 9-N, N', N''-Tris(2, 3-dihydroxybenzoyl)-cyclootriazatridecane and 1, 3, 5-N, N', N''- tris(2, 3-dihydroxybenzoyl)triaminomethylbenzene [Текст] / W. R. Harris, K. N. Raymond // Journal American Chemical Society. – 1979. – V. 101. – P. 6534–6541.
236. Raymond, K. N. Macrocyclic catechol-containing ligands [Текст] / K. N. Raymond, T. J. McMurry, T. M. Garrett // Pure and Applied Chemistry. – 1988. – V. 60. – P. 545–548.
237. Kipton, H. Interactions of iron(II) and iron(III) with gallic acid and its homologues: A potentiometric and spectrophotometric study [Текст] / H. Kipton, J. Powell, M. C. Taylor // Australian Journal Chemistry. – 1982. – V. 35. – P. 739–756.
238. Maqsood, Z. A. T. Formation of iron gallic acid complexes at different pH and determination of their stability constants [Текст] / Z. A. T. Maqsood, S. A. Kazmi // Pakistan Journal Scientific Industrial Research. – 1993. – V. 6. – P. 511–516.

239. Maqsood, Z. A. T. Determination and comparison of stability constants, enthalpy and entropy of formation of iron(III) complexes of gallic acid and methyl ester of gallic acid [Текст] / Z. A. T. Maqsood, S. A. Kazmi // Pakistan Journal Scientific Industrial Research. – 1993. – V. 15. – P. 30–35.
240. Erdogan, G. Potentiometric and spectrophotometric determination of the stability constants of quercetin (3, 3'4', 5, 7-pentahydroxyflavone) complexes with aluminium(III) and iron(II) [Текст] / G. Erdogan, R. Karadag, E. Dolen // Reviews Analytical Chemistry. – 2005. – V. 24. – P. 247–261.
241. Escandar, G. M. Complexing behavior of rutin and quercetin [Текст] / G. M. Escandar, L. F. Sala // Canadian Journal Chemistry. – 1991. – V. 69. – P. 1994–2001.
242. Berg, D. Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease [Текст] / D. Berg, M. Gerlach, M.B.H. Youdim, K.L. Double, L. Zecca, P. Riederer, G. Becker // Journal Neurochemistry. – 2001. – V. 79. – P. 225–236.
243. Siah, C.W. Iron overload [Текст] / C.W. Siah, D. Trinder, J.K. Olynyk // Clinica Chimica Acta. – 2005. – V. 358. – P. 24–36.
244. Ullen, H. Supplementary iron intake and risk of cancer: reversed causality? [Текст] / H. Ullen, K. Augustsson, C. Gustavsson, G. Steineck // Cancer Letters. – 1997. – V. 114. – P. 215–216.
245. Valko, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer [Текст] / M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncola, M. Izakovic, M. Mazura // Chemico-Biological Interactions. – 1997. – V. 160. – P. 1–10.
246. Keyer, K. Superoxide and the production of oxidative DNA damage [Текст] / K. Keyer, A.S. Gort, J. A. Imlay // Journal of Bacteriology. – 1995. – V. 177. – P. 6782–6790.
247. Ponka, P. Cellular iron metabolism [Текст] / P. Ponka // Kidney international. – 1999. – V. 55. – P. S2–S11.
248. Wood, R.J. Modern nutrition in health and disease [Текст] / R.J. Wood, A.G. Ronnenberg // В книге под редакцией Shils M.E. и др. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. 10th edn. – 2006. – P. 248.

249. Halliwell, B. Oxygen toxicology, oxygen radicals, transition metals and disease [Текст] / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge // *Biochemistry Journal*. – 1984. –V. 219. – P. 1–4.
250. Gulcin, I. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.) [Текст] / I. Gulcin, E.G. Sat, S. Beydemir, M. Elmastas, O. I. Kufrevioglu // *Food Chemistry*. – 2004. –V. 87. – P. 393–400.
251. Arosio, P. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more [Текст] / P. Arosio, R. Ingrassia, P. Cavadini // *Biochimica Biophysica Acta*. – 2009. –V. 1790. – P. 589–599.
252. King, D.W. Spectrophotometric determination of iron (II) in seawater at nanomolar concentrations [Текст] / D.W. King, J. Lin, D.R. Kester // *Analytica Chimica Acta*. – 1991. –V. 247. – P. 125–132.
253. Ak, T. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin [Текст] / T. Ak, I. Gulcin // *Chemico-Biological Interactions*. – 2008. –V. 174. – P. 27–37.
254. Gulcin, I. Antioxidant properties of resveratrol: a structureactivity insight [Текст] / I. Gulcin // *Innovative Food Science Emerging Technologies*. – 2010. –V. 11. – P. 210–218.
255. Kazazica, S.P. Gas-phase ligation of Fe²⁺ and Cu⁺ ions with some flavonoids [Текст] / S.P. Kazazica, V. Butkovic, D. Srazica, L. Klasinc // *Journal Agricultural Food Chemistry*. – 2006. – V. 54. – P. 8391–8396.
256. Yuan, Y.V. Antioxidant activity of dulse (*Palmaria palmata*) extract evaluated in vitro [Текст] / Y.V. Yuan, D.E. Bone, M.F. Carrington // *Food Chemistry*. – 2005. – V. 91. – P. 485–494.
257. Gulcin, I. Antioxidant and antiradical activities of L-Carnitine [Текст] / I. Gulcin // *Life Science Journal*. – 2006. – V. 78. – P. 803–811.
258. Fiorucci, S.B. DFT study of quercetin activated forms involved in antiradical, antioxidant, and prooxidant biological processes [Текст] / S.B. Fiorucci, J. Golebiowski, D. Cabrol-Bass, S. Antonczak // *Journal Agricultural Food Chemistry*. – 2007. – V. 55. – P. 903–911.

259. Lopes, G. K. B. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions [Текст] / G.K.B. Lopes, H.M. Schulman, M. Hermes-Lima // *Biochimica Biophysica Acta*. – 1999. – V. 1472. – P. 142–152.
260. Hermes-Lima, M. Deoxyribose degradation catalyzed by Fe(III)EDTA: Kinetic aspects and potential usefulness for submicromolar iron measurements [Текст] / M. Hermes-Lima, E.M. Wang, H.M. Schulman, K.B. Storrey, P.Ponka // *Molecular Cellular Biochemistry*. – 1994. – V. 137. – P. 65–73.
261. Winterbourn, C. C. The ability of scavengers to distinguish •OH production in the iron-catalyzed Haber–Weiss reaction: Comparison of four assays for •OH [Текст] / C.C. Winterbourn // *Free Radical Biology Medicine*. – 1987. – V. 3. – P. 33–39.
262. Romanova, D. Study of antioxidant effect of apigenin, luteolin, and quercetin by DNA protective method [Текст] / D.Romanova, A.Vachalkova, L.Cipak, Z. Ovesna, P. Rauko // *Neoplasma*. – 2001. – V. 48. – P. 104–107.
263. Zhao, C. “In vitro” protection of DNA from Fenton reaction by plant polyphenol verbascoside [Текст] / C.Zhao, G. Dodin, C. Yuan, H.Chen, R.Zheng, Z. Jia et al.// *Biochimica Biophysica Acta*. – 2005. – V. 1723. – P. 114–123.
264. Perron, N. R. Predicting how polyphenol antioxidants prevent DNA damage by binding to iron [Текст] / N.R. Perron, J.N. Hodges, M. Jenkins, J. L. Brumaghim // *Inorganic Chemistry*. – 2008. – V. 47. – P. 6153–6161.
265. Inoue, M. B. Potentiometric and ¹H NMR studies of complexation of Al³⁺ with (-)-epigallocatechin gallate, a major active constituent of green tea [Текст] / M.B. Inoue, M. Inoue, Q. Fernando, S. Valcic, B.N. Timmermann // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 2002. – V. 88. – P. 7–13.
266. Kumamoto, M. Effects of pH and metal ions on antioxidative activities of catechins [Текст] / M. Kumamoto, T. Sonda, K. Nagayama, M. Tabata // *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. – 2001. – V. 65. – P. 126–132.

267. Muzolf, M. pH-dependent radical scavenging capacity of green tea catechins [Текст] / M. Muzolf, H. Szymusiak, A.G. Swiglo, I.M.C.M. Rietjens, B. Tyrakowska // *Journal Agricultural Food Chemistry*. – 2008. – V. 56. – P. 816–823.
268. Jovanovic, S.V. Antioxidant potential of gallocatechins. A pulse radiolysis and laser photolysis study [Текст] / S.V. Jovanovic, Y. Hara, S. Steenken, M. G. Simic // *Journal American Chemical Society*. – 1995. – V. 117. – P. 9881–9888.
269. Binbuga, N. Metal chelation studies relevant to wood preservation. 1. Complexation of propyl gallate with Fe²⁺ [Текст] / N. Binbuga, K. Chambers, W. P. Henry, T. P. Schultz // *Holzforschung*. – 2005. – V. 59. – P. 205–209.
270. Beltran, J. L. Spectrophotometric, potentiometric and chromatographic pK_a values of polyphenolic acids in water and acetonitrile-water media [Текст] / J. L. Beltran, N. Sanli, G. Fonrodona, D. Barron, G. Ozkan, J. Barbosa // *Analytica Chimica Acta*. – 2003. – V. 484. – P. 253–264.
271. IUPAC. IUPAC stability constants of metal–ion complexes, part B, organic ligands [Текст] // Oxford, UK: – Pergamon Press. – 1979.
272. Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V8.14 for Solaris.
273. Kennedy, J. A. The protonation reactions of catechin, epicatechin and related compounds [Текст] / J. A. Kennedy, M.H.G. Munro, H.K.J. Powell, L.J. Porter, L.Y. Foo // *Australian Journal of Chemistry*. – 1984. – V. 37. – P. 885–892.
274. Herrero-Martinez, J. M. Determination of dissociation constants of flavonoids by capillary electrophoresis [Текст] / J. M. Herrero-Martinez, M. Sanmartin, M. Roses, E. Bosch, C. Rafols // *Electrophoresis*. – 2005. – V. 26. – P. 1886–1895.
275. Ragnar, M. pK_a values of guaiacyl and syringyl phenols related to lignin [Текст] / M. Ragnar, C.T. Lindgren, N.O. Nilvebrant // *Journal Wood Chemistry Technology*. – 2000. – V. 20. – P. 277–305.
276. Nordstrom, C.-G. Thermodynamic ionization constants of phenolic carboxylic acids related to guaiacol [Текст] / C.-G. Nordstrom, J.J. Lindberg, L.J. Karumaa // *Soumen Kem B*. – 1963. – V. 36B. – P. 105–109.

277. Ermakova, M. I. OH-acidity of phenols related to lignin in dimethyl sulfoxide, dioxane and their mixtures with water [Текст] / M. I. Ermakova, M. F. Kiryushina, M. Y. Zarubin // *Koksnes Kimija*. – 1985. – V. 6. – P. 61–64.
278. Практикум по электрохимии под ред. Б.Б. Дамаскина. – М.: Высшая школа. 1991. – С. 287.
279. Кравцов В.И. Равновесие и кинетика электродных реакций комплексов металлов. – Ленинград: «Химия». 1985. – С. 207.
280. Varga, L.P. Computer Analysis of Potentiometric and Thenoyltrifluoroacetone (TTA) Solvent Extraction Studies on the Fluoride Complexes of Hafnium [Текст] / L.P. Varga, D.N. Hume // *Inorganic Chemistry*. – 1963. – V. 2. – №1. – P. 201-206.
281. Garrett, E.R. Metal complexes of thiouracils I: Stability constants by potentiometric titration studies and structures of complexes [Текст] / E.R. Garrett, D.J. Weber // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 1970. – V. 59. – №10. – P. 1383-1398.
282. Davis, D.G. Electrochemical Studies of Some Iron-Protoporphyrin Complexes [Текст] / D.G. Davis, R.F. Martin // *Journal American Chemical Society*. – 1966. – V. 88. – №7. – P. 1365-1371.
283. Lau, A.L.Y. Study of the kinetics of electrochemical reactions by thin-layer voltammetry. III. Electroreduction of the chloride complexes of platinum(II) and (IV) [Текст] / A.L.Y. Lau, A.T. Hubbard // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 1970. – V. 24. – №2-3. – P. 237-249.
284. Dance, I.G. A Voltammetric Study of the Coordinative Reactions of Pyridine with is(maleonitriledithiolate)cobalt Complexes [Текст] / I.G.Dance // *Inorganic Chemistry*. – 1973. – V. 12. – №10. – P. 2381-2388.
285. Bunaciu, A.A. Recent Applications for in Vitro Antioxidant Activity Assay(Review) [Текст] / A.A. Bunaciu, A.F. Danet, Ş. Fleschin, H.Y. Aboul-Enein // *Critical Reviews Analytical Chemistry*. – 2016. – V. 46. – №5. – P. 389-399.

286. Antolovich, M. Methods for testing antioxidant activity [Текст] / M. Antolovich, P. D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, K. Robards // *Analyst*. – 2002. – V. 127. – P. 183–198.
287. Apak, R. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report) [Текст] / R. Apak, S. Gorinstein, V. Bohm, K. M. Schaich, M. Ozyurek, K. Guclu // © 2013 IUPAC: *Pure Application Chemistry*. – 2013. – V. 85. – №5. – P. 957–998.
288. Lewis, G.N. Six lectures on the thermodynamic potential and its application to problems of chemical and physical equilibrium, introduced by two lectures on concentrated solutions and osmotic pressure / G.N. Lewis // *Journal American Chemical Society*. – 1907. – V. 29. – №11. – P. 1638-1639.
289. Краснов, К.С. Физическая химия. В 2 кн. Кн. 1. Строение вещества. Термодинамика: Учеб. для вузов. – 2-е изд., перераб. и доп. [Текст] / К.С. Краснов, Н.К. Воробьев, И.Н. Годнев – М.: Высш. шк. – 1995. – 512 с.
290. Северин, Е.С. Биохимия: учебник под ред. Е.С.Северина, – М.: ГЭОТАР – 2009. – 768 с.
291. The antioxidant activity of gossypol and cottonseed meal // *Nutrition Reviews*. – 1945. – V. 3. – №6. – P. 167-169.
292. Tamura, S. Studies on the Inhibition of the Autoxidation of Oils and Fats. Part 8. On the Antioxidant Activity of Some ω , ω -Bis-(3, 4-dihydroxyphenyl) Alkanes [Текст] / S. Tamura, K. Ōkuma // *Nippon Nōgeikagaku Kaishi*. – 1954. – V. 28. – №1. – P. 1-4.
293. Tamura, S. Studies on the Inhibition of the Autoxidation of Oils and Fats. Part. 10. On the Antioxidant Activity of Some Catechol Derivatives for Vitamin A in Fish Liver Oil [Текст] / S. Tamura, K. Ōkuma, H. Okubo // *Nippon Nōgeikagaku Kaishi*. – 1954. – V. 28. – №1. – P. 21-28.
294. Tamura, S. Studies on the Inhibition of the Autoxidation of Oils and Fats. Part 13. Syntheses of Some ω , ω' -bis-(2,3,4-trihydroxyphenyl) Alkanes and their Antioxidant Activity [Текст] / S. Tamura, K. Ōkuma, H. Okubo // *Nippon Nōgeikagaku Kaishi*. – 1954. – V. 28. – №9. – P. 679-682.

295. Schlesier, K. Assessment of Antioxidant Activity by Using Different in Vitro Methods [Текст] / K. Schlesier, M. Harwat, V. Bohm, R. Bitsch // Free Radical Research. – 2002. – V. 36. – №2. – P. 177–187.
296. Hengst, C. Determination of the antioxidant capacity: influence of the sample concentration on the measured values [Текст] / C. Hengst, S. Werner, L. Müller, K. Fröhlich, V. Böhm // European Food Research Technology. – 2009. – V. 230. – №2. – P. 249–254.
297. Zhao, L. Antioxidant Activities And Major Bioactive Components Of Consecutive Extracts From Blue Honeysuckle (*Lonicera Caerulea* L.) Cultivated In China [Текст] / L. Zhao, S. Li, L. Zhao, Y. Zhu, T. Hao // Journal Food Biochemistry. – 2015. – V. 39. – P. 653–662.
298. Gorinstein, S. A comparative study of phenolic compounds and antioxidant and antiproliferative activities in frequently consumed raw vegetables [Текст] / S. Gorinstein, Y.S.Park, B.G. Heo, J. Namiesnik, H. Leontowica, M. Leontowica, K.S. Ham, J.Y. Cho, S.G. Kang // European Food Research Technology. – 2009. – V. 228. – P. 903-911.
299. Gorinstein, S. Supplementation of garlic lowers lipids and increases antioxidant capacity in plasma of rats [Текст] / S. Gorinstein, M. Leontowicz, H. Leontowicz, K. Najman, J. Namiesnik, Y.S. Park, S.T. Jung, S.G. Kang, S. Trakhtenberg // Nutrition Research. – 2006. – V. 26. – P. 362– 368.
300. Kusznierevics, B. Partial Characterization of White Cabbages (*Brassica oleracea* var. capitata f. alba) from Different Regions by Glucosinolates, Bioactive Compounds, Total Antioxidant Activities and Proteins [Текст] / B. Kusznierevics, A. Bartoszek, L. Wolska, J. Drzewiwcki, S. Gorinstein, J. Namiesnik // LWT-Food Science Technology. – 2008. – V. 41. – №1. – P. 1-9.
301. Cao, G. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum [Текст] / G.Cao, R.L. Prior // Clinical Chemistry. – 1998. – V. 44. – №6. – P. 1309–1315.
302. Lucarini, M. Bond dissociation energies of the N-H bond and rate constants for the reaction with alkyl, alkoxy, and peroxy radicals of phenothiazines and

- related compounds [Текст] / M. Lucarini, P. Pedrielli, G. F. Pedulli, L. Valginigli, D. Gigmes, P. Tordo // Journal American Chemical Society. – 1999. – V. 121. – P. 11546-11553.
303. Патент РФ RU 2235998, МПК G01N 27/60. Способ определения оксидантной/антиоксидантной активности растворов / Х. З. Брайнина, А.В. Иванова // – 10.09.2004. – бюллетень №25. – 6 с.
304. Патент. 2532406 РФ. МПК G01N 27/26. Способ потенциометрического определения антиоксидантной/оксидантной активности с использованием комплексов металлов / А.В. Иванова, Е.Л. Герасимова, И.А. Кравец, А.И. Матерн; заявл. 22.03.2013; опубл. 10.11.2014, бюл. № 31.
305. Лозовская, Е.Л. Сравнительная эффективность некоторых медицинских препаратов как акцепторов супероксид-радикала [Текст] / Е.Л. Лозовская, И.И. Сапежинский // Биофизика. 1993. – Т.38. – С. 31–36.
306. ГОСТ 19885-74 Чай. Методы определения содержания танина и кофеина [Текст] // М.: Издательство стандартов. – 1990. – 7 с.
307. Государственная Фармакопея XIII ОФС.1.4.1.0018.15. Настои и отвары. М.: Минздрав. РФ, 2015. Т. 2. С. 1004.
308. Арутюнян, А.В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы [Текст] / А.В. Арутюнян, Е.Е. Дубинина, Н.Н. Зыбина // СПб.: «Фолиант». – 2000. – 104 с.
309. Сернов, Л.Н. Элементы экспериментальной фармакологии [Текст] / Л.Н. Сернов, В.В. Гацура // М.: 2000. – 352 с.
310. Randox. Total Antioxidant Status. Cat No. 2332.
311. Тодоров, И. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. 3-е издание [Текст] / И. Тодоров // София: – 1961. – 263 с.
312. Белая, Н.И. Антирадикальная активность фруктовых соков в реакции с дифенилпикрилгидразилом [Текст] / Н.И. Белая, А.Н. Николаевский, Т.Н. Ивлева, О. Г. Шептура // Химико-фармацевтический журнал. – 2009. – Т.43. – №.6. – С. 32-34.

313. ISO 14502-1:2005. Determination of substances characteristic of green and black tea – Part: Content of total polyphenols in tea – Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent.
314. Экспериандова, Л. П. Еще раз о пределах обнаружения и определения [Текст] / Л. П. Экспериандова, К. Н. Беликов, С. В. Химченко, Т. А. Бланк // Журнал аналитической химии. – 2010. – Т. 65. – № 3. – С. 229.
315. Ivanova, A. V. Potentiometric Study of Antioxidant Activity: Development and Prospects [Текст] / A. V. Ivanova, E. L. Gerasimova, Kh. Z. Brainina // Critical Reviews Analytical Chemistry. – 2015. – V.45. – №.4. – P. 311-322.
316. Bard, A. J. Standard Potentials in Aqueous Solution [Текст] / A. J. Bard, R. Parsons, J. Jordan // M. Dekker.: New York. – 1985. – 848 p.
317. Лурье, Ю.Ю. Справочник по аналитической химии [Текст] / Ю.Ю. Лурье // М.: Химия.: – 1989. – 448 с.
318. Milardovic, S. Use of DPPH·/DPPH Redox Couple for Biamperometric Determination of Antioxidant Activity [Текст] / S. Milardovic, D. Ivekovic, V. Rumenjak, B. S.Grabaric // Electroanalysis. – 2005. – V.17. – P. 1847–1853.
319. Brainina, Kh. Z. Potentiometry as a method of antioxidant activity investigation [Текст] / Kh. Z. Brainina, A. V. Ivanova, E. N. Sharafutdinova, E. L. Lozovskaya, E. I. Shkarina // Talanta. – 2007. – V.71. – P. 13-18.
320. Brainina, K.Z. Screen-printed enzyme-free electrochemical sensors for clinical and food analysis (Review) [Текст] / K.Z. Brainina, A.N. Kositzina, A.V. Ivanova // Comprehensive Analytical Chemistry ch. coll: Electrochemical sensor analysis. – 2007. – V. 49. – P. 643 – 666.
321. Крешков, А. П. Основы аналитической химии. Теоретические основы. Количественный анализ [Текст]/ А.П. Крешков // М.: Химия.: – 1971. – 456 с.
322. Никольский, Б.П. Справочник химика. Химическое равновесие и кинетика. Свойства растворов. Электродные процессы [Текст] / Б.П. Никольский // М.: Химия.: – 1965. – Т.3. – 1008 с.
323. Яцимирский, К.Б. Химическая связь [Текст] / К.Б. Яцимирский, В.К. Яцимирский // Киев: Высшая школа.: – 1975. – 304 с.

324. Иванова, А. В. Исследование кинетики термического распада 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин)дигидрохлорида потенциометрическим методом с использованием комплексов металлов [Текст] / А.В. Иванова, Е. Л. Герасимова, Е. Р. Газизуллина, А. Н. Козицина, А. И. Матерн // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2016. – № 2. – С.419-424.
325. Будников Г.К. Основы современного электрохимического анализа [Текст] / Г.К. Будников, В.Н. Майстренко, М.Р. Вяселев // М.: Мир. – 2003. – 592с.
326. Тарасевич М.Р. Электрохимия углеродных материалов [Текст] / М.Р. Тарасевич // М.: Наука. – 1984. – С. 18-94.
327. Allen, R.N. A theoretical study of the structure and properties of uric acid: A potent antioxidant [Текст] / R.N. Allen, M.K. Shukla, J. Leszczynski // Int. Journal Quantum Chemistry. – 2004. – V. 100. – № 5. – P. 801-809.
328. Даниельс, Ф. Физическая химия [Текст] / Ф. Даниельс, Р. Альберти // М.: Высшая школа. – 1967. – 784 с.
329. Киреев, В. А. Краткий курс физической химии [Текст] / В.А. Киреев. М.: Химия. – 1969. – 615 с.
330. Gonzalez, M. Gas chromatographic flow method for the preconcentration and simultaneous determination of antioxidant and preservative additives in fatty foods [Text] / M.Gonzalez, M.Gallego, M.Valcarcel // Journal Chromatography A. – 1999. – V.848. – P. 529-536.
331. Ruperes, F.J. Determination of α -tocopheryl acetate in diets of experimental animals. Study of stability in diets [Text] / F.J. Ruperes, C. Barbaras, M. Castro, E. Herrera // Journal of Chromatography A. – 1999. – V. 839. – P. 93-99.
332. Соломатин В.Т. Ферроцен в анализе сталей и сплавов [Текст] / В.Т. Соломатин // М.: Металлургия. – 1980. – 160 с.
333. Krasovska, A. Chemiluminescence detection of peroxy radicals and comparison of antioxidant activity of phenolic compounds [Текст] / A. Krasovska, D. Rosiak, K. Czkapiak, M. Lukaszewicz // Current topics in Biophysics. – 2000. – Vol. 24. – P. 89-95.

334. Betigeri, S. Use of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride as a reagent tool for evaluation of oxidative stability of drugs [Текст] / S. Betigeri, A. Thakur, K. Raghavan // *Pharm. Res.* – 2005. – Vol. 22. – № 2. – P. 310.
335. Rusina, I. F. Chemiluminescent methods for studying inhibited oxidation [Текст] / I. F. Rusina, O. N. Karpukhin, O. T. Kasaikina // *Russian Journal Physical Chemistry B.* – 2013. – Vol. 7. – № 4. – P. 463.
336. Spasojević, I. Free radicals and antioxidants at a glance using EPR spectroscopy [Текст] / I. Spasojević // *Critical Reviews Clinical Laboratory Sciences.* – 2011. – Vol. 48. – № 3. – P. 114.
337. Перевозкина, М.Г. Тестирование антиоксидантной активности полифункциональных соединений кинетическими методами [Текст] / М. Г. Перевозкина // Новосибирск: Изд. СибАК, 2014. — 240 с.
338. Шишкина, Л.Н. Определение антиокислительной активности индивидуальных веществ и липидов на метилолеатной окислительной модели [Текст] / Л.Н. Шишкина // Исследование синтетических и природных антиоксидантов *in vitro* и *in vivo*. –1992. — С. 26.
339. Yoshida, Y. Application of water-soluble radical initiator, 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propane] dihydrochloride, to a study of oxidative stress [Текст] / Y. Yoshida, N. Itoh, Y. Saito, M. Hayakawa, E. Niki // *Free Radical Research.* – 2004. – Vol. 38. – № 4. – P. 375.
340. Werber, J. Analysis of 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride degradation and hydrolysis in aqueous solutions [Текст] / J. Werber, Y. J. Wang, M. Milligan, X. Li, J. A. Ji // *J. Pharmaceutical Sciences.* – 2011. – V. 100. – № 8. – P. 3307.
341. Krainev, A.G. Comparison of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH) and 2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile) (AMVN) as free radical initiators: a spin-trapping study [Текст] / A.G. Krainev, D.J. Bigelow // *Journal Chemical Society* – 1996. – V. 2. – P. 747.

342. Пат. 2612132 РФ. МПК G01N 27/00, G01N 27/26, G01N 27/30, G01N 31/00. Способ потенциометрического определения скорости генерирования пероксильных радикалов / А.В. Иванова, Е.Л. Герасимова, Е.Р. Газизуллина, А.И. Матерн; заявл. 16.07.2015; опубл. 02.03.2017, бюл. № 7.
343. Иванова, А. В. Потенциометрический метод определения кинетических характеристик радикальных реакций в водных средах /А. В. Иванова, Е. Л. Герасимова, Е. Р. Газизуллина, А. Г. Давлетчурина, А. Н. Козицина, О.Т. Касаикина // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2017. – № 8. – С. 1428 – 1432.
344. Roginsky, V. A. Chain-breaking antioxidant activity of natural polyphenols as determined during the chain oxidation of methyl linoleate in Triton X-100 micelles [Текст] / V. A. Roginsky // Archives Biochemistry and Biophysics. – 2003. – V. 414. – № 2. – P. 261.
345. Brainina, Kh.Z. Antioxidant Activity Evaluation Assay Based on Peroxide Radicals Generation and Potentiometric Measurement / Kh.Z. Brainina, E.L. Gerasimova, O.T. Kasaikina, A.V. Ivanova // Analytical Letters. – 2011. – V. 44. – № 8. – P. 1405 – 1415.
346. Тюрин, В. Ю. Использование электрохимического метода для определения антиоксидантной активности на примере ферроценовых производных [Текст] / В.Ю. Тюрин, Н.Н. Мелешонкова, А.В. Долганов, А.П. Глухова, Е.Р. Милаева // Известия АН. Серия химическая. – 2011. – № 4. – С. 633.
347. Karaçelik, A. A. Antioxidant components of Viburnum opulus L. determined by on-line HPLC-UV-ABTS radical scavenging and LC-UV-ESI-MS methods [Текст] / А.А. Караçelik, М. Küçük, Z. İskefiyeli, S. Aydemir, S. De Smet, B. Miserez, P. Sandra // Food Chemistry. – 2015. – V. 175. – P. 106.
348. Иванова, А.В. Потенциометрическое определение водорастворимых антиоксидантов с использованием комплексов металлов / А. В. Иванова, Е. Л.

- Герасимова, И. А. Кравец, А. И. Матерн // Журн. аналитической химии. – 2015. – Т. 70. – № 2. – С. 156 – 160.
349. Zinatullina, K. M. Reaction of polymethine dyes with hydroperoxides and free radicals [Текст] / K. M. Zinatullina, V. A. Kuzmin, N. P. Khrameeva, B. I. Shapiro, O. T. Kasaikina // Russian Chemical Bulletin. – 2016. – Т. 65. – № 12. – С. 2825.
350. Kancheva, V. D. Lipid oxidation in homogeneous and micro-heterogeneous media in presence of prooxidants, antioxidants and surfactants [Текст] / V. D. Kancheva, O. T. Kasaikina // Lipid Peroxidation. – In Tech Open Access Publ., 2012. – P. 31 – 62.
351. Патент РФ № 2618426 Способ определения антиоксидантной активности с использованием радикальных инициаторов / А. В. Иванова, Е. Л. Герасимова, Е. Р. Газизуллина, А. И. Матерн. Дата приоритета 31.12.2015.
352. Ivanova, A.V. New antiradical capacity assay with the use potentiometric method [Текст] / A.V. Ivanova, E. L. Gerasimova, E. R. Gazizullina // Analytica Chimica Acta. – 2019. – V. 1046. – P. 69-76.
353. Mueller, L. Antioxidant activity of β -carotene compounds in different in vitro assays [Текст] / L. Mueller, V. Boehm // Molecules. – 2011. – Vol. 16. – P. 1055.
354. Shpigun, L. K. Flow injection potentiometric determination of total antioxidant activity of plant extracts [Текст] / L. K. Shpigun, M. A. Arharova, Kh. Z. Brainina, A. V. Ivanova // Analytica Chimica Acta. – 2006. – Vol. 573–574. – P. 419.
355. Drech, M. T. K. Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential [Текст] / M. T. K. Drech, S. Rossato, V. D. Kappel, R. Biegelmeiera, M. L. M. Hoff, P. Mayorga, J. A. S. Zuanazzi, A. T. Henriques, J. C. F. Moreira // Analytical Biochemistry. – 2009. – Vol. 385. – P. 107.
356. Метелица, Д.И. Антиоксидантная активность оксипроизводных кумарина [Текст] / Д.И. Метелица, М.В. Потапович, О.И. Шадыро // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Т. 48. – № 3. – С. 282-288.

357. Amić, D. SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids [Текст] / D. Amić, D. Davidović-Amić, D. Beslo, V. Rastija, B. Lucić, N. Trinajstić // *Current Medicinal Chemistry*. – 2007. – V.14. – P. 827-845.
358. Prior, R.L. In vivo total antioxidant capacity comparison of different analytical methods [Текст] / R.L. Prior, G. Cao // *Free Radical Biology & Medicine*. – 1999. – V. 27. – P. 1173-1181.
359. Брайнина, Х.З. Исследование антиоксидантной активности жидкостей методом потенциометрии с использованием медиаторной системы / Х.З. Брайнина, А.В. Иванова, Е.Н. Шарафутдинова // Статья в Сборнике ИБХФ им. Эмануэля. Методы оценки антиоксидантной активности биологически активных веществ лечебного и профилактического назначения. М.:РУДН. – 2005. – С.173-181.
360. Campanella, L. Biosensor for determination of total and natural antioxidant capacity of red and white wines: comparison with other spectrophotometric and fluorimetric methods [Текст] / L. Campanella, A. Bonani, E. Finotti, M. Tomassetti // *Biosensor & Bioelectronics*. – 2004. – V.19. – P. 969-975.
361. Correia, R.T.P. Phenolic antioxidant Enrichment of soy flour-supplemented guava waste by *Rhizopus oligosporus*-mediated solid-state bioprocessing [Текст] / R.T.P. Correia, P. McCue, M.M.A. Magalhaes, G.R. Macedo, K. Shetty // *J. of Food Biochemistry*. – 2004. – V. 28. – P. 404-418.
362. Robards, K. Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids [Текст] / K. Robards, V. Antolovich // *Analist*. – 1997. – V.122. – P. 11R-34R.
363. Costin, J.W. Monitoring the total phenolic/antioxidant levels in wine using flow injection analysis with acidic potassium permanganate chemiluminescence detection [Текст] / J.W. Costin, N.W. Barnet, S.W. Lewis, D.J. McGillivray // *Analytica Chimica Acta*. – 2003. – V. 499. – P. 47-56.
364. Справочник по товароведению продовольственных товаров [Текст] / под ред. Родиной Т.Г. // М.: «КолосС». – 2001. – 608 с.
365. Campanella, L. Biosensor for determination of total and natural antioxidant capacity of red and white wines: comparison with other spectrophotometric and

- fluorimetric methods [Текст] / Campanella L., Voanni A., Finotti E., Tomassetti M. // *Biosensor and Bioelectronics*. – 2004. – V. 19. – P. 641-651.
366. Minussi, R.C. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines [Текст] / R.C. Minussi, M. Rossi, L. Bologna, L. Cordi, D. Rotilio, G. M. Pastore, N. Durán // *Food Chemistry*. – 2003. – V. 82. – № 3. – P. 409-416.
367. Шарафутдинова, Е.Н. Качество пищевых продуктов и антиоксидантная активность [Текст] / Е.Н. Шарафутдинова, А.В. Иванова, А.И. Матерн, Х.З. Брайнина // *Аналитика и контроль*. – 2011. – Т. 15. – № 3. – С. 281-286.
368. Справочник по товароведению продовольственных товаров / под ред. Т.Г. Родиной, М.: «КолосС». – 2001. – 608 с.
369. Sobiech, R.M. Automated Voltammetric Determination of Reducing Compounds in Beer [Текст] / R.M. Sobiech, R. Neuman, D. Wabuer // *Electoanalysis*. – 1998. – V.10, No14. – P. 969-975.
370. Павлов, Б.А. Курс органической химии [Текст] / Б.А.Павлов, А.П.Герентьев // М-Л.: «Химия». – 1965. – 686 с.
371. Tiwari, A.K. Imbalance in antioxidant defense and human diseases: Multiple approach of natural antioxidant therapy [Текст] / A.K. Tiwari // *Current science*. – 2001. – V.81. – № 9. – P. 1179-1187.
372. Triantis, T. Investigation on the antioxidant activity of fruit and vegetable aqueous extracts on superoxid radical anion using chemiluminescence techniques [Текст] / T. Triantis, A. Stelakis, D. Dimoticali, K. Papadopulos // *Analytica Chimica Acta*. – 2005. – V. 536. – P. 101-105.
373. Garcia-Alonso, M. Evaluation of the antioxidant properties of fruits [Текст] / M. Garcia-Alonso, S. de Pascual-Teresa, C. Santos-Buelga, J.C. Rivas-Gonzalo // *Food Chemistry*. – 2004 – V.84. – №1. – P. 13-18.
374. Брайнина, Х.З. Оценка антиоксидантной активности пищевых продуктов методом потенциометрии [Текст] / Х.З. Брайнина, А.В. Иванова, Е.Н.

Шарафутдинова // Ж.Известия высших учебных заведений «Пищевая технология». – 2004. – №4. С.73-75.

375. Dekker, M. Analysing the Antioxidant Activity of Food Products: Processing and Matrix Effects [Текст] / M. Dekker, R. Verkerk, A.A. Van Der Sluis, S. Khokhar, W.M.F. Jongen // Toxicology in vitro. – 1999. – V.13. – P. 797-799.

376. Higdon, J.V. Tea Catechins and Polyphenols: Health Effects, Metabolism, and Antioxidant Functions [Текст] / J.V. Higdon, B. Frey // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2003. – V.43. – №1. – P. 89-143.

377. Иванова, А. В. Исследование антиоксидантной активности и суммарного содержания полифенолов лекарственного растительного сырья / А. В. Иванова, Е. Л. Герасимова, Е. Р. Газизуллина, К. Г. Попова, А. И. Матерн // Журн. аналитической химии. – 2017. – Т. 72. – № 4. – С. 363 – 368

378. Каган, В.Е. Проблема анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов [Текст] / В.Е. Каган, О.Н. Орлов, Л.А. Прилипко // Биофизика. Т.18. (Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР). М., 1986. – 136 с.

379. Шляпинтох, В.Я. Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов [Текст] / В.Я. Шляпинтох, О.Н. Карпунин, Л.М. Постников, И.В. Захаров, А.А. Витучинский // Москва.: «Наука», 1966. – 300 с.

380. Brainina, K.Z. Potentiometric determination of antioxidant activity of food and herbal extracts / K.Z. Brainina, A.V. Ivanova, E.N. Sharafutdinova, S.Yu. Saraeva // Comprehensive Analytical Chemistry ch. coll: Electrochemical sensor analysis. – 2007. – V. 49. –P. e277 – e283

381. Саратиков, А.С. Родиола розовая (золотой корень) [Текст] / А.С. Саратиков, Е.А. Краснов // Томск: Издательство Томского университета. 4-е изд., перераб. и доп. —, 2004. — 292с.

382. Царева, А. А. Антиоксидантная активность фитопрепаратов, содержащих фенилпропаноиды, при токсическом поражении печени [Текст] / диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук: 14.00.25 – Защищена 15.11.2007; Уфа, 2001. – 177 с.

383. Беляков, Н.А. Антиоксидантная активность биологических жидкостей человека: методология и клиническое значение [Текст] / Н.А. Беляков, С.Г. Семесько // Эфферентная терапия. – 2005. – Т. 11. – № 1. – С. 5-21.

384. Zinellu, A. Pre-analytical factors affecting ascorbic and uric acid quantification in human plasma [Текст] / A. Zinellu, S. Sotgia, L. Deiana, C. Carru // Journal of Biochemical and Biophysical Methods. - 2006. – V. 67. – № 2-3. – P. 95-105.

385. Колесниченко, Л.С. Глутатионовая антиоксидантная система у больных сахарным диабетом [Текст] / Л.С. Колесниченко, Т.П. Бардымова, Н.В. Верлан, Е.С. Сергеева, М.П. Сергеева // Сибирский медицинский журнал. - 2009. – № 1. - С. 31-33.

386. Баранова Е.И. Клиническое значение гомоцистеинемии [Текст] / Е.И. Баранова, О.О. Большакова // Артериальная гипертензия. - 2004. – Т.10. – № 1. - С. 12-15.

387. Герасимова, Е.Л. Потенциометрия в исследовании АОА биологических объектов. Электрохимические методы анализа [Текст] / Е.Л. Герасимова, А.В. Иванова, Х.З. Брайнина // Saarbrucken.: LAP LAMBERT Academic Publishing. – 2013. – 144 с. ISBN 978-3-659-35355-0.

388. Усс, А.Л. Криоконсервирование клеток человека [Текст] / А.Л. Усс, П.Б. Мицкевич, И.Л. Завгородняя // Медицинская панорама. - 2003. – Т.27. – № 2. - С. 38-41.

389. Brainina, Kh.Z. New Electrochemical Methods of Determining Anti-Oxidant Activity of Blood and Blood Fractions [Текст] / Kh.Z. Brainina, L.V. Alyoshina, E.L. Gerasimova, Ya.E. Kazakov, Ya.B. Beykin, S.V.Belyaeva, T.I. Usatova, O.V. Inzhevatova, A.V. Ivanova, M.Ya. Khodos // Electroanalysis. – 2009 – V.21. – P. 618-624.

390. Beljakova, N.A. Antioxidant activity of human biological fluids: methodology and clinical value [Текст] / N.A.Beljakova, S.G. Semesko // Efferent therapy. – 2005 – V.11. – P. 5-21.

391. Aejmelaeus, R.T. Age-related change in the peroxy radical scavenging capacity of human plasma [Текст] / R.T. Aejmelaeus, P.Holm, V.Kaukinen // *Free Radical Biology Medicine*. – 1997 – V.23. – P. 69-75.
392. Машковский, М. Д. Лекарственные средства. 16-е изд., перераб., испр. и доп. [Текст] / М. Д. Машковский // М.: Новая волна. – 2012. – 1216 с.
393. Nile, S.H. Antioxidant, anti-inflammatory, and enzyme inhibitory activity of natural plant flavonoids and their synthesized derivatives [Текст] / S.H. Nile, Y.S. Keum, A.S. Nile, S.S. Jalde, R.V. Patel // *Journal Biochemical Molecular Toxicology*. – 2018. – V. 32. – № 1. – e22002.
394. Rembold, C.M. Vitamin and antioxidant supplements do not prevent adverse cardiovascular events [Текст] / C.M. Rembold // *Annals Internal Medicine*. – 2013. – V. 158. – № 12. – JC10.
395. Иванова, А. В. Определение антиоксидантной емкости объектов фармации потенциометрическим методом. Показатели точности измерений / А. В. Иванова, Е. Л. Герасимова, Е. Р. Газизуллина, Д. С. Тимина, Н. Л. Герасимова, А. В. Собина, Ж. В. Шалыгина, М. П. Крашенинина // *Журн. аналитической химии*. – 2019. – Т. 74.
396. Fletcher, A. E. Free radicals, antioxidants and eye diseases: evidence from epidemiological studies on cataract and age-related macular degeneration [Текст] / A. E. Fletcher // *Ophthalmic Research*. – 2010. – V. 44. – № 3. – P. 191–198.
397. Мирзабекова, К.А. Новые возможности в коррекции метаболических нарушений сетчатки у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой и возрастной макулярной дегенерацией [Текст] / К.А. Мирзабекова // *Офтальмология*. – 2014. – Т. 11. – № 4. – С. 41-46.
398. Chiu, C.J. Nutritional antioxidants and age-related cataract and maculopathy [Текст] / C.J. Chiu, A. Taylor // *Experimental Eye Research*. – 2007. – V. 84. – P. 229-245.
399. Новикова, Ю. П. Профилактическое и лечебное действие skq1-содержащих глазных капель визомитин при фотоиндуцируемых повреждениях сетчатки глаза [Текст] / Ю. П. Новикова, О.С. Ганчарова, О.В.

Эйхлер, П.П. Филиппов, Э.Н. Григорян // Биохимия. – 2014. – Т. 10. – С. 1355-1366.

400. Иванова, А. В. Антиоксидантная и противорадикальная активность лекарственных средств, предназначенных для лечения офтальмологических заболеваний / А.В. Иванова, Е.Л. Герасимова, Е.Р. Газизуллина, Я.А. Окулова, А.И. Матерн, В.Л. Русинов // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т. 52. – № 8. – С. 16 – 21

401. Полуниин, Г.С. Изучение терапевтической эффективности КАТАЛИНА® при возрастной катаракте (срок наблюдения 1 год) [Текст] / Г.С. Полуниин, И.А. Макаров, И.А. Бубнова // Клиническая офтальмология. Заболевания глазного дна. – 2012. – Т. 3 – С. 110-114.

402. Ковалевская, М.А. Способ дифференциальной диагностики катаракты, обусловленной возрастными метаболическими нарушениями, и катаракты, обусловленной изменениями хрусталика в ответ на фоновые расстройства метаболизма, и выбор тактики их лечения [Текст] / М.А. Ковалевская, В.И. Новоселов, А.Д. Софин, Н.В. Ведринцева, В.Л. Кокорев, П.А. Шаповалов // Патент РФ № RU 2380706 от 10.04.2009.

403. Кинёнес, А.А. Метод форсированных инстилляций препарата «Квинакс» в лечении осложнённой катаракты в раннем послеоперационном периоде после витреоретинальной хирургии [Текст] / А.А. Кинёнес, Н.М. Самохвалова, Ю.Л. Белькевич, А.Г. Юрковец // Сборник тезисов докладов XI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Федоровские чтения – 2013». М.: Офтальмология. – 2013. – 260 с.

404. Постовский, И.Я. Антиокислительная и противолучевая активность оснований Манниха в ряду пирогаллола и оксигидрохинона [Текст] / И.Я. Постовский, А.П. Новикова, Л.А. Чечулина, Л.Н. Любомудрова // В сб. «Органический синтез и биологическая активность». – Свердловск: 1978. – С. 24-28.

405. Krylova, N.V. Antioxidants as Potential Antiviral Agents for Flavivirus Infections [Текст] / N.V. Krylova, A.M. Popov, G.N. Leonova // *Antibiotics and Chemotherapy*. – 2016. – V. 5. – P. 25-31.
406. Akaike, T. Role of free radicals in viral pathogenesis and mutation [Текст] / T. Akaike // *Reviews Medical Virology*. – 2001. – V. 11. – P. 87–101.
407. Choi, A.M. Oxidant stress responses in influenza virus pneumonia: gene expression and transcription factor activation [Текст] / A.M. Choi, K. Knobil, S.L. Otterbein // *American journal physiology*. – 1996. – V. 271. – P. L383–L391.
408. Uchide, N. Antioxidant therapy as a potential approach to severe influenza-associated complications [Текст] / N. Uchide, H. Toyoda // *Molecules*. – 2011. – V. 16. – P. 2032-2052.
409. Борисова, М. В. Антиоксидантные и противовирусные свойства новых соединений азолазинового ряда, модифицированных остатками фенолов / М. В. Борисова, Е. Р. Газизуллина, Е. Л. Герасимова, Р. А. Дрокин, Е. К. Воинков, Б. Горбунов, А. В. Иванова, Е. Н. Уломский, Я. Л. Есаулкова, В. Л. Русинов // Сборник тезисов докладов Четвёртого Междисциплинарного Симпозиума по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике под редакцией К. В. Кудрявцева и Е. М. Паниной – М. : «Перо». – 2018. – 205 с.
410. ГОСТ Р ИСО 5725-2002 [Текст] / в 6 частях // М.: ИПК Издательство стандартов. – 2002. – 208 с.
411. РГМ 61-2003 Рекомендации по межгосударственной стандартизации. ГСИ. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки [Текст] // М.: ИПК Издательство стандартов. – 2004. – 42 с.
412. Шарафутдинова, Е.Н. Потенциометрический метод определения антиоксидантной активности: оценка основных метрологических характеристик / Е.Н. Шарафутдинова, О.В. Инжеватова, Н.В. Тоболкина, А.В. Иванова, Х.З. Брайнина // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2008. – Т. 24. – № 6. – С. 9 – 14

ПРИЛОЖЕНИЕ 1



1304

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ
Государственный научный метрологический центр
ФГУП «Уральский научно-исследовательский институт метрологии»

СВИДЕТЕЛЬСТВО

об аттестации методики выполнения измерений

№ 224.04.10.063/2007

Методика определения антиоксидантной активности пищевых продуктов,
наименование измеряемой величины,
продовольственного сырья, БАД и витаминов методом потенциометрии с применением
анализатора МПА-1,
объекта и метода измерений
разработанная ООО НПВП «ИВА» (г. Екатеринбург)
наименование организации (предприятия), разработавшей МВИ
и регламентированная стандартом организации
обозначение и наименование документа

аттестована в соответствии с ГОСТ Р 8.563.

Аттестация осуществлена по результатам метрологической экспертизы материалов
по разработке МВИ

вид работ: метрологическая экспертиза материалов по разработке МВИ, теоретическое или экспериментальное исследование МВИ, другие виды работ

В результате аттестации установлено, что МВИ соответствует предъявляемым к ней метрологическим требованиям и обладает следующими основными метрологическими характеристиками, приведенными в приложении.

диапазон измерений, характеристики погрешности измерений (неопределенность измерений) и (или) характеристики составляющих погрешности (при необходимости – нормативы контроля)

Приложение: метрологические характеристики МВИ на 1 листе



Зам.директора по научной работе

С.В. Медведевских

Зав.лабораторией

В.И.Панева

Дата выдачи: 09.06.2007 г.

Срок действия: 09.06.2012 г.

МП:

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

**Приложение к свидетельству № 224.04.10.063 / 2007
об аттестации методики определения антиоксидантной активности
пищевых продуктов, продовольственного сырья, БАД и витаминов
методом потенциометрии с применением анализатора МПА-1**

1 Диапазон измерений, значения показателей повторяемости, воспроизводимости, правильности и точности

Диапазон измерений, ммоль экв/дм ³	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ_r , %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), σ_R , %	Показатель правильности (границы относительной систематической погрешности при вероятности $P=0,95$), $\pm \delta_c$, %	Показатель точности (границы относительной погрешности при вероятности $P=0,95$), $\pm \delta$, %
от 0,5 до 10 вкл.	8	10	12	23
св. 10 до 50 вкл.	6	8	9	18
св. 50 до 400 вкл.	3	5	4	11

2 Диапазон измерений, значения пределов повторяемости и воспроизводимости при вероятности $P=0,95$

Диапазон измерений, ммоль экв/дм ³	Предел повторяемости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами параллельных определений), r , %	Предел воспроизводимости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в разных лабораториях), R , %
от 0,5 до 10 вкл.	22	28
св. 10 до 50 вкл.	17	22
св. 50 до 400 вкл.	8	14

3 При реализации методики в лаборатории обеспечивают:

- оперативный контроль процедуры измерений (на основе оценки погрешности при реализации отдельно взятой контрольной процедуры);
- контроль стабильности результатов измерений (на основе контроля стабильности среднеквадратического отклонения повторяемости, среднеквадратического отклонения внутрилабораторной прецизионности, погрешности)

Алгоритм контроля исполнителем процедуры выполнения измерений приведен в документе на методику выполнения измерений.

Процедуры контроля стабильности результатов выполняемых измерений регламентируют во внутренних документах лаборатории.

Зав. лабораторией 224
ФГУП «УНИИМ»



В.И. Панева

ПРИЛОЖЕНИЕ 2



1325

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ
Государственный научный метрологический центр
ФГУП «Уральский научно-исследовательский институт метрологии»

СВИДЕТЕЛЬСТВО

об аттестации методики выполнения измерений

№ 224.11.10.067/2007

Методика определения антиоксидантной активности проб биологических материалов
наименование измеряемой величины,
методом потенциометрии с применением анализатора МПА-1,
объекта и метода измерений
разработанная ООО НПВП «ИВА» (г. Екатеринбург)
наименование организации (предприятия), разработавшей МВИ
и регламентированная стандартом организации
обозначение и наименование документа
аттестована в соответствии с **ГОСТ Р 8.563.**

Аттестация осуществлена по результатам метрологической экспертизы материалов
по разработке МВИ
вид работ: метрологическая экспертиза материалов по разработке МВИ, теоретическое или экспериментальное исследование МВИ, другие виды работ

В результате аттестации установлено, что МВИ соответствует предъявляемым к ней метрологическим требованиям и обладает следующими основными метрологическими характеристиками, приведенными в приложении.
диапазон измерений, характеристики погрешности измерений (неопределенность измерений) и (или) характеристики составляющих погрешности (при необходимости – нормативы контроля)

Приложение: метрологические характеристики МВИ на 1 листе

Зам.директора по научной работе

С.В. Медведевских

Зав.лабораторией

В.И.Панева

Дата выдачи: 14.06.2007 г.

Срок действия: 14.06.2012 г.



ПРИЛОЖЕНИЕ 2

**Приложение к свидетельству № 224.11.10.067 / 2007
об аттестации методики определения антиоксидантной активности проб биологических
материалов методом потенциометрии с применением анализатора МПА-1**

1. Диапазон измерений, значения показателей точности, правильности, повторяемости и воспроизводимости:

Диапазон измерений, ммоль экв/дм ³	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости) $\sigma_R, \%$	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости) $\sigma_R, \%$	Показатель правильности (границы относительной систематической погрешности, $P=0.95$), $\pm \delta_c, \%$	Показатель точности (границы относительной погрешности методики при доверительной вероятности $P=0.95$), $\pm \delta, \%$
От 0.5 до 30.0 вкл.	5	7	3	15

2. Значения предела повторяемости, предела воспроизводимости при вероятности $P=0.95$:

Диапазон измерений, ммоль экв/дм ³	Предел повторяемости (относительное значение допустимого расхождения между двумя результатами параллельных определений), $r, \%$	Предел воспроизводимости (относительное значение допустимого расхождения между двумя результатами, полученными в разных лабораториях), $R, \%$
От 0.5 до 30.0 вкл.	14	20

3. При реализации методики в лаборатории обеспечивают:

- оперативный контроль процедуры измерений (на основе оценки погрешности при реализации отдельно взятой контрольной процедуры);
- контроль стабильности результатов измерений (на основе контроля стабильности среднеквадратического отклонения повторяемости, погрешности);

Алгоритм контроля исполнителем процедуры выполнения измерений приведен в документе на методику выполнения измерений.

Процедуры контроля стабильности результатов выполняемых измерений регламентируют в Руководстве по качеству лаборатории.

Зав. лабораторией 224
ФГУП «УНИИМ»



В.И.Панева

ПРИЛОЖЕНИЕ 3



Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
 Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
 высшего образования «Уральский федеральный университет имени
 первого Президента России Б.Н. Ельцина» (УрФУ)
 Химико-технологический институт
 ул. Мира, 28, Екатеринбург, Россия, 620002
 тел.: +7 (343) 375-44-20
 e-mail: m.v.varaksin@urfu.ru, www.urfu.ru

№ 94 от 21.05.2019

на № ___ от _____

АКТ

О внедрении диссертационной работы А.В. Ивановой

**«ПОТЕНЦИОМЕТРИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ АНТИОКСИДАНТНЫХ И
 АНТИРАДИКАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ВЕЩЕСТВ»**

Результаты диссертационной работы **Ивановой А.В «Потенциометрия в исследовании антиоксидантных и антирадикальных свойств веществ»**, представленной на соискание ученой степени доктора химических наук, посвященной исследованию антиоксидантных свойств пищевых продуктов, продовольственного сырья, БАД, витаминов, биологических материалов (крови и ее фракций), внедрены в учебный процесс кафедры аналитической химии Химико-технологического института Уральского федерального университета по следующим направлениям подготовки:

1. Бакалавриат по направлению 18.03.01 Химическая технология, ОП «Химическая технология неорганических, органических веществ, природных энергоносителей и лекарственных препаратов», траектория ОП «Инструментальные методы анализа природных и технических объектов». Дисциплины: Электрохимические методы анализа.
2. Магистратура по направлению 18.04.01 Химическая технология, ОП «Химическая технология материалов электроники, сенсорной аналитики и неорганических веществ», траектория «Электрохимические методы и сенсоры для мониторинга окружающей среды и биологических объектов». Дисциплины: Инструментальные методы исследования, Электрохимические методы в исследовании биологических объектов.
3. Магистратура по направлению 04.04.01 Химия, ОП «Медицинская и фармацевтическая химия», траектория «Инструментальные методы исследования в фармацевтике». Дисциплины: Физико-химические методы исследования, Комбинированные методы в исследовании лекарственных веществ.

Подходы, изложенные в диссертационной работе, используются при выполнении научно-исследовательских работ, выпускных квалификационных работ студентами и аспирантами кафедры.

Директор ХТИ



М.В. Вараксин