

УДК 543.865/.867

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ОБЪЕКТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО И СИНТЕТИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ФАРМАЦИИ (ОБЗОР)

О.В. Тринеева^{1*}

Резюме. Разработка новых и совершенствование существующих методов определения антиоксидантной активности – актуальная задача фармации, косметической и пищевой промышленности. В настоящей работе проведена систематизация и анализ методов определения антиоксидантной активности, которые нашли наиболее широкое применение и описаны в отечественной литературе. Наиболее широко используются электрохимические и спектрофотометрические методы анализа. Сегодня не существует метода, который дал бы полную информацию о состоянии и взаимодействиях сложных систем, в которых образуются и вступают в реакции антиоксиданты. Нет также единого термина, который бы определял антиоксидантные свойства соединения. Все существующие методы определения антиоксидантной активности страдают теми или иными недостатками. Следует отметить объективную невозможность существования не то что единого метода, но даже возможности сравнения результатов, полученных разными методами. Поэтому каждый исследователь, исходя из своих целей и возможностей, выбирает готовый, создает новый, модифицирует уже известный метод или зачастую прибегает к исследованию антиоксидантной активности изучаемого объекта при помощи комплекса различных методов.

Ключевые слова: антиоксиданты, антиоксидантная активность, антирадикальная активность.

METHODS OF DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PLANT AND SYNTHETIC ORIGINS IN PHARMACY (REVIEW)

O.V. Trineeva^{2*}

Abstract. The development of new and improvement of existing methods for determining antioxidant activity is an urgent task of pharmacy, cosmetic and food industries. In the present work, the systematization and analysis of methods for determining antioxidant activity have been carried out, which have found the widest application and are described in the domestic literature. The most widely used electro-chemical and spectrophotometric methods of analysis. Today there is no method that would give complete information about the state and interactions of complex systems in which antioxidants are formed and enter into the reaction. There is also no single term that would determine the antioxidant properties of the compound. All existing methods for determining antioxidant activity suffer from one or other of the following drawbacks. It should be noted the objective impossibility of existence is not that of a single method, but even the possibility of comparing the results obtained by different methods. Therefore, each researcher, based on his goals and capabilities, chooses the ready, creates a new one, modifies an already known method, or often resorts to the study of the antioxidant activity of the studied object using a set of different methods.

Keywords: antioxidants, antioxidant activity, antiradical activity.

1 – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», 394006, Россия, г. Воронеж, Университетская пл., д. 1

1 – Voronezh State University, 1, Universitetskaya pl., Voronezh, 394006, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: trineevaov@mail.ru

Тел.: 8 (473) 253 07 89

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время не вызывает сомнений важная роль нарушений в регуляции свободно-радикальных процессов, происходящих в организме, что является одной из причин таких тяжелых патологий, как лучевая болезнь, атеросклероз, инфаркт миокарда, диабет, рак и ряд других заболеваний, возникновению и прогрессированию которых способствует действие неблагоприятных экологических факторов, а в ря-

де случаев – генетические аномалии. В живых клетках существует совершенная система антиоксидантной защиты, регулирующая процессы образования свободных радикалов (СР) и ограничивающая накопление в клетках как самих СР, так и токсичных продуктов их деятельности. Кумуляция СР в организме возрастает из-за снижения эффективности естественной антиоксидантной системы, вызванной воздействием радиации, УФ-облучения, курения, алкоголя, постоянных стрессов, некачественного питания. Против токсичных

эффектов свободных радикалов клетки используют различные механизмы защиты организма. Поэтому терапия с включением антиоксидантов (АО) находит все большее применение при лечении данных заболеваний. Одновременно расширяется выпуск фирменных антиоксидантных препаратов, включающих разнообразные компоненты природного или синтетического происхождения [1].

Последнее двадцатилетие ознаменовано повышенным вниманием как медицины, так и химической промышленности к продуктам переработки лекарственного растительного сырья (ЛРС), которое содержит богатый комплекс биологически активных веществ (БАВ), многие из которых проявляют АОА. Поиск, методы выделения и исследование перспективных природных источников веществ, обладающих антирадикальной активностью (АРА) и антиоксидантной активностью (АОА) наряду с разработкой доступных и экспрессных методов определения АОА в настоящее время является одной из актуальных задач современной медицины, фармации, косметологии и пищевой промышленности. Значительный вклад в развитие данного направления сделаны такими отечественными учеными, как Г.К. Будников, И.Ф. Абдулин, Х.З. Брайна, В.Р. Хайруллина, Я.И. Яшин, Н.В. Храпко, Т.Г. Цюпко, В.В. Хасанов, А.А. Лапин, Т.В. Максимова, Н.В. Сизова и другие [2–21].

Целью настоящей работы является обобщение и систематизация методов определения АОА объектов растительного и синтетического происхождения фармацевтического назначения, описанных в отечественной литературе.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ ОБ АНТИОКСИДАНТАХ (АО)

Группа веществ, предотвращающих образование сильных окислителей *in vivo*, разнообразна. К ним относятся SH-содержащая аминокислота цистеин, некоторые пептиды и белки (глутатион, альбумин), убихинон, аскорбиновая и мочевая кислоты, токоферолы, каротиноиды, флавоноиды и др. Определение АОА позволяет судить о возможной физиологической ценности исследуемых объектов. Определение содержания отдельных АО, как правило, недостаточно, поскольку в этом случае не учитываются процессы взаимного окисления/восстановления и влияние матрицы аналита [20].

Значительное количество природных АО фенольного класса, присутствующих в ЛРС, обуславливает их антиоксидантное действие. Содержание флавоноидов наряду с аскорбиновой кислотой и провитамином А является важнейшим показателем биологической ценности ЛРС. Существенным оказывается синергизм действия аскорбиновой кислоты с флавоноидами в регуляции окислительно-восстановительных процессов [22].

Связь структуры и АОА

В основе биологической активности природных АО лежат процессы торможения развивающегося радикального окисления тканевых липидов путём взаимодействия активных радикалов с биоантиоксидантами [23]. Примечательно, что величина АОА флавоноидов существенно снижается по мере уменьшения числа свободных фенольных гидроксильных групп в молекулах: кверцетин > рутин > лютеолин-7-глюкозид > апигенин > нарингенин > 7-гидрокси-флавоноид [24–26]. Так, например, оценка АОА различных природных флавоноидов показала, что наибольшей АОА после теафлавина обладают кверцетин и цианидин. Гликозиды кверцетина имеют более низкую АОА, например рутин; наименьшей АОА среди этой группы веществ характеризуются флавоны и флавоногликозиды. Поэтому по количественному содержанию фенольных веществ в растительном сырье можно судить о его антиоксидантных свойствах [22].

Механизм действия АО

Установлено, что полифенолы, токоферолы, флавоноиды проявляют АОА. В теории радикального окисления различаются механизмы линейного обрыва радикальных цепей на ингибиторе и механизм ингибирования, который реализуется через создание комплексов активных радикалов с системами с сопряженными π-связями. По первому механизму взаимодействуют, например, пространственно экранированные фенолы, токоферолы; для этих ингибиторов характерен четкий период индукции. Второй механизм реализуется для природных смесей чаще, в том числе и для эфирных масел. Из присутствующих в них соединений, возможно, выступают в роли ингибитора второго типа хамазулен и нерил-метил-бутаноаты [7].

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АОА

Оценить общую АОА того или иного объекта можно с помощью **интегральных методов**. В основе методов оценки общей АОА, как правило, лежат реакции взаимодействия с долгоживущими СР, которые служат прототипом СР, образующихся в живой клетке. Обеспечивая получение информации об АОА того или иного образца, такие методы имеют ряд особенностей, которые ограничивают возможности их применения. А именно, анализ проходит в несколько стадий и занимает довольно продолжительное время, аналитический сигнал необходимо регистрировать с помощью дорогостоящих оборудования и реактивов. Кроме того, получаемая информация не является прямой [20].

Методы исследования общей АОА различаются по типу источника окисления, окисляемого соединения и способа измерения окисленного соединения. Эти методы дают широкий набор результатов, которые нельзя использовать по отдельности, – они должны быть интерпретированы с осторожностью. По

способам регистрации проявляемой АОА можно разделить методы на волюмометрические, фотометрические, хемилюминесцентные, флуоресцентные, электрохимические и ряд более специфических. Обычно используется протекающая по радикальному механизму модельная реакция (чаще всего – окисления) какого-либо индивидуального соединения, по влиянию на протекание которой и оценивается АОА индивидуального соединения или смеси. Кинетика контролируется либо по поглощению кислорода способами измерения объема, либо по изменению характеристик реакционной смеси – поглощения электромагнитного излучения, флуоресценции, люминесценции и т.д. В ряде случаев создаются условия для генерирования СР с постоянной скоростью добавлением инициаторов либо с химической генерацией радикалов в результате протекания контролируемого химического процесса (реакция Фентона) [10].

В разных методах определяются либо отдельные антиокислительные компоненты (например, витамин Е, аскорбиновая кислота и т.д.), либо общая АОА, что является более информативным. Общая АОА может быть установлена несколькими методами: по поглощению кислорода при перекисном липидном окислении, окислению кроцина, хемилюминесценции с люминолом, окислению R-фикоэритрина, чувствительности эритроцитов к гемолизу, восстанавливающей железо активности, генерировании липидных перекисей. Некоторые авторы измеряют активность антиокислительных ферментов, таких как аскорбатпероксидаза, глутатионредуктаза, дегидроаскорбатредуктаза и монодегидроаскорбатредуктаза. Все чаще выполняются **сравнительные исследования**, когда измеренная одним из методов АОА сравнивается с влиянием соединения на протекание той или иной патологии. Так, авторы фракционировали компоненты зеленого чая, изучили активность фракций по методу DPPH и оценили их влияние на рост клеток рака желудка [10].

Титриметрические методы

Для первичной оценки АОА растительных объектов многие исследователи зачастую используют оригинальную методику, разработанную Т.В. Максимовой с соавторами, основанную на окислении веществ-антиоксидантов перманганатом калия в кислой среде [5]. В литературе опубликованы данные по результатам определения АОА перманганатометрическим методом водных и водно-спиртовых извлечений из таких видов ЛРС, как трава горца почечуйного, листья крапивы двудомной [27], плоды облепихи крушиновидной [28], рябины обыкновенной [29], а также некоторых масляных экстрактов [30] и многих других фармацевтических субстанций растительного происхождения [31]. Недостатком данной методики является то, что данный метод позволяет определить

количественное содержание суммы всех веществ, обладающих АОА, в пересчете чаще всего на рутин, кверцетин, галловую и аскорбиновую кислоты, а также пирокатехин, но не дифференцировать их по группам [5].

Электрохимические (ЭХ) методы

Донорно-акцепторный характер реакции между АО и СР позволяет успешно применять ЭХ-методы для оценки АОА различных объектов. ЭХ-методы характеризуются высокой чувствительностью, быстротой процедуры анализа, относительно невысокой стоимостью оборудования и реактивов, а значит, и анализа в целом [20]. ЭХ-методы оценки АОА могут быть разделены на две группы. В части методов используется только ЭХ-регистрация какого-либо соединения, изменение концентрации которого косвенно связано с протеканием процессов окисления. Другая группа методов основана на непосредственном измерении окислительно-восстановительных потенциалов. Указывается, что эти параметры в целом коррелируют с АОА и могут быть использованы для ее оценки [10].

Амперометрический метод. Методом оценки АОА различных многокомпонентных смесей без их предварительного разделения является амперометрический метод, включающий подготовку проб анализируемого и стандартного веществ, их ЭХ-окисление в ячейке амперометрического детектора, усиление электрических сигналов, их регистрацию и расчёт АОА по предложенной математической зависимости [20]. Пример графического отображения выходного сигнала приведен на рисунке 1. Данный способ позволяет оценить суммарную АОА с высокой точностью и воспроизводимостью, используя простое и доступное оборудование [23, 31–34]. Так, для определения АОА антоциановых красителей, полученных из выжимок ягод черники, черной смородины, клюквы, ежевики и винограда, использован прибор «Цвет-Яуза-01-АА», который позволяет проводить прямые количественные измерения АОА. В качестве стандартного вещества обычно используют рутин, кверцетин, галловую или аскорбиновую кислоты или синтетический краситель кармуазин (Е-122) [35–44]. Измерения могут осуществляться в 3 режимах: при постоянном потенциале, при импульсных потенциалах и при сканировании потенциалов во всём диапазоне. Причём, варьируя полярность и величины приложенных потенциалов, можно определять не только суммарную АОА, но и активность отдельных классов соединений. При определении АОА амперометрический метод имеет ряд преимуществ. Без учёта пробоподготовки время отдельного определения занимает несколько минут; анализ (регистрация и обработка результатов) проходит в реальном времени; правильность и воспроизводимость анализа обеспечиваются точным дозированием веществ шестиходовым краном; ошибка определения не превышает 5%; предел обнаружения полифенолов и флавоноидов на уровне нано- и пикограммов. При таких малых концентрациях в условиях совместного присутствия



Рисунок 1. Выходной сигнал, получаемый от раствора рутина с концентрацией 5 мг/дм³

разных антиоксидантов снижается вероятность их взаимного влияния, в частности проявления синергизма. Идентификацию соединений можно проводить по вольтамперограмме, что иногда более информативно, чем УФ-спектры.

Метод кулонометрии. Для кулонометрического определения АОА экстрактов трав, соков ягод, плодов и овощей, различных чаев, настоев и напитков на основе природного растительного сырья, водных и водно-спиртовых извлечений чаги, бальзамов и настоек в качестве реагента предложен электрогенерированный бром [4, 45, 46]. ЭХ-окисление бромид-ионов на платиновом электроде в кислых средах может привести к образованию Br_3^- , Br_2 , а также короткоживущих радикалов брома (Br_{3n}^{\cdot}), адсорбированных на поверхности платинового электрода. Образующиеся при электроокислении соединения брома и сам бром легко вступают в радикальные и окислительно-восстановительные реакции, а также реакции электрофильного замещения и присоединения по кратным связям. Это позволяет охватить широкий круг БАВ различной структуры, обладающих антиоксидантными свойствами. Поэтому электрогенерированный бром можно предложить в качестве некоторого универсального реагента для оценки АОА индивидуальных

соединений и их смесей [2]. Из флавоноидов изучена реакция брома с рутином (рисунок 2). Рутин количественно реагирует с бромом в соотношении 1:4. Найденные стехиометрические коэффициенты реакции строго воспроизводимы и позволяют количественно определять рутин. Аскорбиновая кислота количественно окисляется электрогенерированным бромом до дегидроаскорбиновой кислоты. Экспериментально установлено, что фолиевая кислота также реагирует с электрогенерированным бромом, однако стехиометрические коэффициенты этой реакции плохо воспроизводимы. Вместе с полифенолами в извлечениях из ЛРС присутствуют разнообразные, способные взаимодействовать с электрогенерированным бромом производные коричной кислоты – п-оксibenзойная, ванилиновая, феруловая, п-кумаровая, кофейная, хлорогеновая. Экспериментально установлено, что растворимые сахара, щавелевая и лимонная кислоты с электрогенерированным бромом не реагируют и вклада в бромную антиоксидантную способность не вносят [2]. Однако в данном случае можно говорить лишь о некоторой эффективной величине АОА растительных настоев, поскольку выделение вклада каждого из составляющих смесь компонентов представляет чрезвычайно сложную задачу.

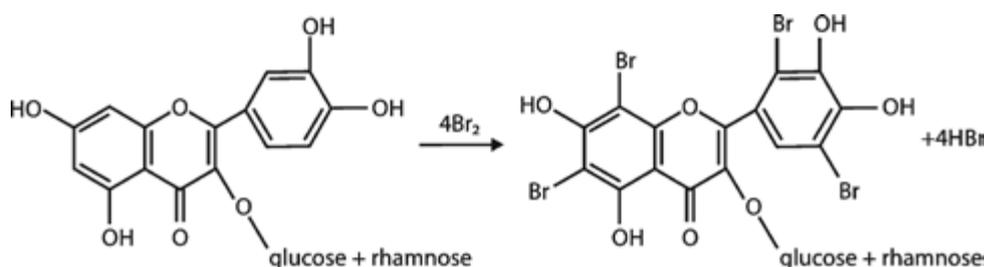


Рисунок 2. Схема взаимодействия рутина с бромом

В Казанском государственном университете также разработан ряд методов оценки АОА, основанных на кулонометрических измерениях с использованием электрогенерированного хлора [20].

Метод вольтамперометрии. В вольтамперометрическом методе в качестве модельной реакции используется процесс электровосстановления кислорода (рисунок 3) на ртутно-пленочном электроде, идущий по механизму, аналогичному восстановлению кислорода во многих объектах искусственного и природного происхождения [35, 47–49].

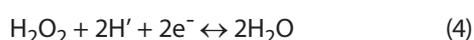
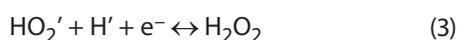


Рисунок 3. Процесс электровосстановления кислорода на электроде

Для определения АОА предложено использовать первую волну электровосстановления кислорода, соответствующую стадиям (1) – (3), когда на поверхности ртутно-пленочного электрода образуются активные кислородные радикалы и перекись водорода как конечный продукт [35, 47–49]. В таблице 1 приведены 4 условно разделенные группы веществ, различающиеся по характеру влияния на процесс электровосстановления кислорода. В качестве критерия АОА исследуемых веществ используется кинетический критерий К, который отражает количество кислорода и активных кислородных радикалов, прореагировавших с АО (или смесью АО) за минуту [35].

Вольтамперометрический метод отличается хорошей чувствительностью и является достаточно простым и дешевым. Однако, как в любом подобном ЭХ-

методе, разброс показаний прибора при идентичных измерениях является достаточно высоким [1, 35]. Авторами установлена четкая корреляция между количественным содержанием флавоноидов в экстрактах побегов багульника и их АОА. Чем больше общее содержание флавоноидов, тем сильнее АОА образца [1]. Схема вольтамперометрического определения АОА фенолкарбоновых кислот растительного происхождения на ДНК-модифицированном углеродном трафаретном электроде основана на известном способе количественного определения нативной двунитевой ДНК с использованием комплекса $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ в качестве ЭХ-маркера. Количество $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$, связанного со слоем ДНК, снижается по мере разрушения последней в результате реакции расщепления [10]. Метод подходит для контроля низкомолекулярных АО в пищевых продуктах. Циклическая вольтамперометрия способна контролировать снижение АОА плазмы и эффективность диализа. Метод относительно простой и надежный для определения АОА плазмы или сыворотки крови [10].

Метод полярографии. Предложен простой ЭХ-способ определения АОА флавоноидов, основанный на измерении потенциала полуволны окисления на проточном колоночном электроде. Сообщается, что ЭХ-активность соединений коррелирует со способностью подавлять перекисное окисление липидов [10]. Ввиду токсичности ртути, используемой в полярографах, применение данного метода резко ограничено в настоящее время. Так, из Государственной фармакопеи РФ XIII издания исключена ОФС «Полярография».

Потенциометрический метод оценки АОА. Определение АОА растворов потенциометрическим методом основано на химическом взаимодействии АО с медиаторной системой, в качестве которой используется смесь $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Добавление растворов, содержащих вещества, проявляющие АОА, в ячейку приводит к изменению окислительно-восста-

Таблица 1.

Группы веществ, различающиеся по характеру влияния на процесс электровосстановления кислорода [35]

№ группы	Названия веществ	Влияние на электровосстановление кислорода	Предполагаемый электродный механизм
1	Каталаза, фталоцианины металлов, гуминовые кислоты	Увеличение тока электровосстановления кислорода, сдвиг потенциала в отрицательную область	Механизм ЕС* с последующей реакцией диспропорционирования перекиси водорода и частичной регенерацией молекулярного кислорода
2	Соединения фенольной природы, витамины А, Е, С, В, флавоноиды, убихинон, глюкоза	Уменьшение электровосстановления кислорода, сдвиг потенциала в положительную область	Механизм ЕС с последующей химической реакцией взаимодействия АО с активными кислородными радикалами
3	N-, S-, Se-содержащие соединения, амины, аминокислоты, активные альдегиды	Уменьшение электровосстановления кислорода, сдвиг потенциала в отрицательную область	Механизм СЕС с предшествующей и последующей химическими реакциями взаимодействия АО с активными кислородными радикалами
4	Супероксиддисмутаза (СОД), порфирины металлов, цитохром С	Уменьшение электровосстановления кислорода, сдвиг потенциала в положительную область	Механизм ЕС с каталитическим восстановлением кислорода через образование промежуточного комплекса

Примечание: *Е – электродная стадия процесса, С – химическая реакция.

новительного потенциала среды в результате взаимодействия АО с окисленным компонентом $K_3[Fe(CN)_6]$ медиаторной системы [20, 50, 51]. Предложенным методом исследованы стехиометрические коэффициенты реакций взаимодействия ряда АО с медиаторной системой. Показана зависимость стехиометрических коэффициентов от структуры молекулы некоторых АО. Данные о стехиометрических коэффициентах реакции приведены в таблице 2.

Таблица 2.

Стехиометрические коэффициенты реакции медиаторной системы с АО [20]

№ п/п	Вещество	m:n
1	Аскорбиновая кислота	1:2
2	Цистеин	1:1
3	Глутатион	1:1
4	Гидрохинон	1:2
5	Катехол	1:2
6	Танин	1:10-12
7	Мочевая кислота	1:2



Применение потенциометрического метода определения АОА позволит проводить экспрессный отбор образцов для их дальнейшей идентификации. Показатель АОА лекарственных препаратов на основе ЛРС может быть применен для оценки качества и соблюдения технологии при производстве и хранении. Потенциометрический метод адаптирован к условиям проточно-инжекционного анализа, что предоставляет дополнительную возможность его использования непосредственно в процессе производства лекарственных растительных препаратов [20].

Хроматографические методы

Тонкослойная хроматография. Разработана ТСХ-методика определения АОА некоторых групп БАВ растений. В предлагаемом варианте методики зоны индивидуальных веществ, обладающих АОА, после разделения непосредственно на пластине обрабатывали подкисленным раствором калия перманганата, выступающим в данном случае в качестве проявителя. Зоны индивидуальных АО обесцвечивали раствор калия перманганата на пластине, проявляясь в виде белых пятен на розовом фоне [52]. В результате ВЭТСХ-2,2-дифенил-1-пикрилгидразил-анализа выявлены компоненты эфирного масла мяты перечной (ментон, изоментон и пулегон), ответственные за проявление АРА [53]. Данные способы позволяют лишь судить о присутствии АО различной природы в ЛРС и не дают представления об их количественном содержании. Кроме того, разделить все БАВ, присутствующие в ЛРС и проявляющие АОА, в одной хроматографической системе не представляется возможным.

Газовая хроматография (ГХ). Методом капиллярной газожидкостной хроматографии исследованы антиоксидантные свойства 14 индивидуальных эфирных масел. Оценка антиоксидантных свойств проведена по реакции окисления алифатического альдегида (транс-2-гексенала) в соответствующую карбоновую кислоту в присутствии эфирного масла и без (в контрольном опыте) под действием света и кислорода воздуха при выдерживании в течение 145 суток при комнатной температуре. Количественное содержание гексенала в пробах определяли методом капиллярной ГХ методом внутреннего стандарта [23]. Степень окисления гексенала и компонентов эфирных масел (отн. %) определяли по отношению к их содержанию в исходных образцах [23,54].

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). В работе [88] описан метод одновременного определения общего полифенольного индекса и общего антоцианового индекса с использованием инъекционно-проточной установки и спектрофотометрическим детектированием на двух длинах волн 280 и 520 нм. Аппаратура для жидкостной хроматографии использована для определения АО с двумя детекторами: со спектрофотометрическим на диодной матрице и хемилюминесцентным. Определение АОА фенольных соединений (оксикислот, флавоноидов, токоферолов) методом ВЭЖХ с кулонометрическим детектором приведены в обзоре [88], авторами показано, что чем меньше потенциал окисления фенольных соединений, тем больше его АОА.

Спектральные методы

Метод спектрофотометрии. Наиболее многочисленные методы и их модификации, упоминаемые в литературе, используют фотометрическую регистрацию, вероятно, как самую удобную и доступную. Возможно и спектрофотометрическое определение суммарного содержания АО без разделения смеси АО, при этом результат рассчитывают с помощью хемометрических алгоритмов. К сожалению, недостаточная изученность природных смесей АО и трудоемкость получения многомерных градуировок препятствуют широкому применению таких методик. На практике вместо суммарного содержания АО обычно определяют суммарную АОА изучаемых смесей. Этот интегральный показатель также называют суммарной антиоксидантной емкостью (**Total Antioxidant Capacity, ТАС**) [11].

Метод ТАС. Колориметрическое определение общей АОА (ТАС) по окислению кроцина, представляющего собой красящее вещество желтых стручков плода китайского растения *Gardenia grandiflora*, впервые было предложено авторами [10]. Метод заключается в том, что кроцин окисляется 2,2'-азобис-(2-амидинопропан)гидрохлоридом (ААРН) в присутствии испытуемого образца и без (контрольный опыт)

при термостатировании при 37 °С в течение 60–75 мин. После инкубирования измеряется оптическая плотность при 450 нм. Последние усовершенствования этого метода позволяют определять АОА плазмы человека. Метод был стандартизован по индивидуальному соединению, в качестве которого был использован тролокс – водорастворимый аналог витамина Е (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота), – **метод ТАЕС**. Исследования показали, что существенный вклад в общую АОА образцов вносят мочевая кислота, билирубин, альбумин, незначительный вклад приходится на долю аскорбиновой кислоты и совсем никакого – на гемоглобин. ТАС не чувствителен к процессам замораживания – размораживания образцов и дает стабильные результаты при хранении образцов при комнатной температуре до 4 ч. Результаты определений занижаются в присутствии лимонной кислоты примерно на 20%. Метод пригоден для оценки АОА в том числе и пищевых продуктов [10].

Методы, основанные на способности ингибировать образование ТБК-активных продуктов (ТВАРР). Метод основан на измерении оптической плотности ТБК-активных продуктов при длине волны 532 ± 2 нм. В работе [26] объектами исследования служили флавицин, диосмин, гесперидин, выделенные из растительного сырья. Антиоксидантное действие исследуемых флавоноидов было изучено *in vitro* на модели Fe^{2+} -индуцированного перекисного окисления липидов (ПОЛ) в липосомальной системе, полученной на основе фосфатидилхолина. Эффективность антиоксидантного действия оценивали по степени ингибирования интенсивности ПОЛ липосом в опытных образцах по отношению к контрольным. Интенсивность ПОЛ липосом измеряли по накоплению тиобарбитуровой кислоты (ТБК) [26].

Способ с окислением дезоксирибозы в системе, генерирующей радикалы, описан авторами [10]. 2-дезоксирибоза окисляется гидроксильными радикалами, образуемыми в реакции Фентона, и распадается до малонового диальдегида (МДА), который, взаимодействуя с ТБК, окрашивает раствор в розовый цвет. Спектрофотометрирование проводится при 532 нм [55].

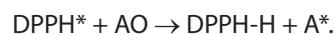
Описан метод аскорбатзависимого ПОЛ, основанного на способности к окислению кислородом воздуха в разбавленных водных растворах остатков олеиновой кислоты в составе твина-80 в присутствии кофакторов окисления – ионов железа (II) и аскорбиновой кислоты. АОА оценивают по степени уменьшения концентрации комплекса МДА (продукта окисления) с ТБК по сравнению с контролем. АОА определена данным методом для экстракта семян *Nelumbo nucifera*, чайных экстрактов и трансдермальной мази на основе лимонника китайского [56–59].

Другой фотометрический способ основан на фотоколориметрии железотиацианатных комплексов.

Для этого к аликвоте исследуемой смеси добавляют раствор линолевой кислоты в 80%-м этаноле, $FeCl_2$ и NH_4CNS . Смесь инкубируют при 40 °С и определяют концентрацию гидропероксидов, измеряя оптическую плотность при 500 нм [10].

АОА кверцетина в лизосомальных фракциях печени мыши изучалась авторами [11] с использованием гидрофильного генератора радикалов ААРН и гидрофобного генератора радикалов 2,2'-азо-бис-(2,4-диметилвалеронитрила) (AMVN). Ингибируемое кверцетином лизосомальное ПОЛ измерялось по методу TBARS с реакционными частицами ТБК [60]. Отмечается, что АОА кверцетина на модели с гидрофильным генерированием радикалов оказалась выше. Синтетический жирорастворимый АО ди-трет-бутил-п-крезол оказался более активен в реакциях окисления липидов, нежели кверцетин, и тем более активен, чем рутин – гликозид кверцетина. Изучение ингибирующего влияния АОА всех рацематов альфа-токоферола, 2,6-ди-трет-бутил-п-крезола (ВНТ) и тролокса на образование реакционных частиц ТБК и короткоцепочечных альдегидов в гомогенатах печени крыс исследовали авторы [10]. Концентрации TBARS измеряли флуориметрически, а альдегиды определялись методом ГХ после дериватизации пробы метилгидразином. Показано, что содержание TBARS и альдегидов в гомогенатах печени в процессе пробоподготовки снижается в присутствии АО. Предполагается, что эти вещества образуются в результате автоокисления гомогенатов в процессе подготовки пробы. Наиболее эффективным ингибитором образования альдегидов оказался токоферол, а накопление TBARS в максимальной степени подавляется тролоксом [10].

Метод DPPH. Одним из способов оценки АОА является колориметрия СР, основанная на реакции DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил), растворенного в метаноле, с образцом АО по схеме [10]:



В результате восстановления DPPH АО снижается пурпурно-синяя окраска DPPH в метаноле, а реакция контролируется по изменению оптической плотности при 514 нм обычными методами спектрофотометрии. Авторы модифицировали способ определения АОА объединением стандартной фотометрической процедуры с методом оптотермического окна (optothermal window, OW) – недорогим, нетрадиционным детектором поглощения. Оптотермическое преобразование позволяет увеличить чувствительность определений на два порядка, повысить линейный диапазон изменений в 16 раз по сравнению с традиционными способами спектрофотометрии. Важным преимуществом оптотермического способа измерения поглощения является также то, что возможна работа с опалесцирующими образцами [10].

Для определения АРА экстрактов ЛРС использовали реакцию со стабильным свободным радикалом DPPH в 96% этиловом спирте [61–70]. Степень обесцвечивания раствора DPPH при добавлении экстрактов определяли спектрофотометрически при 517 нм. Из полученных линейных зависимостей концентрации непрореагировавшего DPPH от объема добавленного экстракта определяли объем настоя, необходимый для 50% деградации DPPH. АРА оценивали по количеству вещества DPPH, вступающего в реакцию с 1 мл экстракта, по формуле [58] или в качестве стандарта использовали α -токоферол, а степень ингибирования DPPH (в %) рассчитывали по формуле [57].

АОА водных экстрактов из корневищ бадана толстолистного изучали также методом DPPH [57]. Однако для количественной оценки АРА извлечений использовали величину скорости реакции радикала DPPH с экстрактом корневищ бадана толстолистного в начальный момент времени (u). Значение u рассчитывали как разность между скоростью реакции DPPH с экстрактом в водной среде (u_0) и скоростью реакции DPPH с водой (u_{H_2O}). Величину скорости для исследуемых реакций определяли как тангенс угла наклона начального прямолинейного участка кинетической кривой [66]. Чем больше скорость реакции радикала DPPH с экстрактами (u), тем выше их АРА.

Липосомальное окисление. Об определении АОА соединений на модели окисления униламеллярных (одномембранных) липосом кислородом воздуха (катализируемое ионами Fe^{2+}) сообщает авторами [10, 61]. Липосома представляет собой простейшую модель биологической клетки и так же, как последняя, имеет мембрану из двойного слоя фосфолипидов и внутреннее пространство. Продуктами окисления липосом, содержащих фосфатидилхолин, в состав которого входят остатки ненасыщенных жирных кислот, являются диены, детектирование которых проводят фотометрически при 232 нм [10].

Метод FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power) позволяет провести прямое определение низкомолекулярных АО по восстановлению ими железа. В методе FRAP вводят в избытке ионы Fe^{3+} и фотометрический реагент – трипиридилтриазин, 1,10-фенантролин, 2,2'-дипиридил и др. Под действием АО (восстановителей) образуется интенсивно окрашенный комплекс железа (II) с реагентом. При низких pH восстановление трипиридилтриазинового комплекса $Fe(III)$ в комплексе $Fe(II)$ сопровождается появлением интенсивной голубой окраски. Измерения основаны на способности АО подавлять окислительный эффект реакционных частиц, генерируемых в реакционной смеси. Окраска развивается медленно, поэтому аналитический сигнал измеряют через t минут после смешивания реагентов, не дожидаясь установления равновесия. АОА находят по градуировочному графику, предварительно построенному по растворам стандартного вещества X_{CT} .

Как правило, АОА выражают в пересчете на X_{CT} , то есть указывают массу или число молей X_{CT} , которые в данных условиях дают такой же аналитический сигнал, что и 1 г изучаемого объекта. В качестве X_{CT} используют распространенные в природе АО – кверцетин, рутин и др. – либо синтетический аналог витамина Е – тролокс. Величина АОА зависит не только от состава пробы, но и от выбора X_{CT} , а также от условий измерения сигнала. Однако при использовании одной и той же методики для совокупности однотипных объектов легко определяемый показатель АОА прямо пропорционален суммарному содержанию АО. Именно поэтому метод FRAP позволяет судить об относительной ценности разных вин, разных сортов чая и других источников поступления АО в организм человека [11].

Созданы аналоги метода FRAP, в которых вместо железа (III) окислителем служат соединения $Cu(II)$, $Ce(IV)$ или $Ru(IV)$. Наиболее известен метод **CUPRAC**, предложенный турецкими аналитиками. В России метод FRAP обычно используют в модификации, выражая АОА объектов в пересчете на аскорбиновую кислоту [11].

Опубликованы уже сотни работ, в которых биологи, медики и специалисты по технологии пищевых продуктов приводят значения АОА, полученные методом FRAP. Преимущества метода FRAP по сравнению с другими вариантами определения АОА – экспрессность и низкая стоимость единичного анализа, простота оборудования, хорошая сходимости результатов. Это один из немногих методов, обеспечивающих возможность прямого (даже автоматизированного) измерения суммарного содержания АО на уровне 10^{-6} – 10^{-3} моль/л. Однако с помощью FRAP трудно определять липофильные АО. Некоторые известные АО (глутатион) не определяются. С другой стороны, не все определяемые этим методом восстановители активны по отношению к свободным радикалам в условиях *in vivo*, что связано с большей кислотностью модельной системы [11]. Химизм, кинетику и механизм процессов, протекающих при определении АОА методом FRAP, изучали лишь немногие авторы (таблица 3), публикаций обзорного типа вообще не было [11].

По литературным данным, АО, определяемые методом FRAP, реагируют с ионами железа (III) с образованием интенсивно окрашенного и координационно насыщенного комплекса железа (II) с фотометрическим реагентом. Более вероятен иной механизм формирования аналитического сигнала, предполагающий первоначальное образование комплекса железа (III) с 2,2'-дипиридилом и его последующее восстановление АО. При одновременном окислении нескольких АО не исключено их взаимодействие, а также окисление первоначально образующихся продуктов избытком железа (III), образование комплексов железа (III) с окисленными формами полифенолов и другие побочные реакции [11, 61].

Таблица 3.

Развитие и применение метода FRAP для определения АОА разных объектов

№ п/п	Реагент	Хст	Объекты анализа	Примечания
1	TPTZ	Fe (II)	Плазма крови	$t=4$ мин. Изучены стехиометрия реакции и аддитивность
2	TPTZ	Fe (II), АК	Чай, вино	Определение АОА, обусловленной полифенолами
3	TPTZ	Fe (II)	Чай	Сопоставлены значения АОА разных сортов чая
4	TPTZ	Fe (II)	Модельные растворы	$t=30$ мин. Выявлено влияние неводного растворителя
5	DPA	АК	Растения	–
6	DIP	АК	Кровь, ткани	Метод ПИА. Проверено влияние посторонних веществ
7	TPTZ	Fe (II)	Модельные растворы	Изучена чувствительность определения разных АО как функция их структуры и редокс-потенциала
8	TPTZ	КТ	Разные вина	Сопоставлены разные методы определения АОА вин
9	DIP, PHEN	АК	Модельные смеси	$t=60$ мин. Применен стоп-раствор. Проверка аддитивности
10	DIP	–	Лекарственные препараты	Тест-метод
11	DIP, PHEN, TPTZ, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$	Fe (II)	Модельные растворы	Сопоставлены 6 вариантов метода. Выявлена неаддитивность аналитического сигнала при работе с $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$
12	PHEN	АК	Красные сухие вина	Корреляция АОА с другими показателями качества вин
13	FZ	Fe (II)	Модельные смеси	Изучена чувствительность определения разных АО
14	DIP, PHEN	АК	Модельные смеси	Выявлена неаддитивность сигнала при недостатке окислителя
15	DIP	Fe (II)	Модельные растворы	Предложены кинетические параметры оценки АОА

Примечания: условные обозначения: ПИА – проточно-инжекционный анализ, TPTZ-трипиридилтриазин, DIP – 2,2'-дипиридил, PHEN – о-фенантролин, DPA-пиридиндикарбоновая кислота, FZ – феррозин, АК – аскорбиновая кислота, КТ – катехол, t – время экспозиции, мин.

Плохо проработаны и метрологические аспекты этого анализа. Неизвестны значения пределов обнаружения индивидуальных АО, не стандартизованы условия измерений. Ввиду отсутствия стандартных образцов с аттестованным содержанием АО большое внимание уделяется сравнению результатов, полученных методом FRAP и методами, основанными на тор-

мождении радикальных реакций, однако выводы разных авторов противоречат друг другу.

Методы, основанные на способности ингибировать аутоокисление адреналина. Об АОА исследуемого растительного сырья судят также по его способности ингибировать аутоокисление адреналина *in vitro* и тем самым предотвращать образование активных форм кислорода. АОА исследуемых препаратов выражают в процентах ингибирования аутоокисления адреналина и вычисляют по известной формуле [27, 28, 36, 67, 71]. Величина АОА более 10% свидетельствует о наличии АОА. В работе [67] использован метод оценки АОА на начальных этапах свободнорадикального окисления по ингибированию супероксидадикала в реакции аутоокисления адреналина в щелочной среде при длине волны 347 нм [36].

Однако следует отметить, что наряду с положительными моментами данный метод имеет и недостатки. Результаты, полученные в разное время экспозиции, сильно разнятся между собой и не могут отвечать критерию оценки качества растительного сырья. Поэтому авторы предлагают ввести новый временной параметр – период индукции, который имеется на всех кривых аутоокисления адреналина в присутствии растительных экстрактов и увеличивается с ростом процента БАВ в экстрактах. Скорее всего, именно в это время БАВ и проявляют свое антиоксидантное действие.

Показано, что наиболее специфичным к фенольным соединениям растительных экстрактов являются спектрофотометрический и потенциометрический методы. Определена АОА растительных экстрактов двумя альтернативными методами: по ингибированию супероксидадикала в реакции аутоокисления адреналина и амперометрическим способом. Обе методики дают объективные результаты. Однако в технике исполнения и экспрессности спектрофотометрический метод уступает амперометрическому [67].

Методы с использованием ферментных систем (ABTS / H_2O_2 / пероксидаза). При инкубировании ABTS [2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолино-6-сульфоновая кислота)] с пероксидазой и перекисью водорода образуется относительно стабильный катион-радикал ABTS^+ , с максимумом поглощения 414 нм в спектре электромагнитного излучения. В присутствии АО обнаруживается период индукции перед появлением окраски. Низкомолекулярные АО задерживают образование окраски пропорционально своему количеству. Общая АОА китайских трав оценивалась авторами с использованием системы ABTS / H_2O_2 / пероксидаза хрена на планшетном сканере [10]. Исключительно высокой АОА обладают тропическая Almond Terminalia и горный Radicis Cortex. Рабочий раствор, содержащий 2,0 мМ ABTS и 0,86 нМ пероксидазы хрена в 50 мМ фосфатном буфере (pH=7,0), загружается в количестве 240 мкл в ячейки 96-луночной планшеты. Туда же добавляется 10 мкл образца и 25 мкл 1 мМ раство-

ра перекиси водорода в 50 мМ фосфатном буфере. Отсчет времени до начала образования зеленой окраски радикала ABTS⁺ начинался немедленно. Система калибровалась по аскорбиновой кислоте, выстраиванием зависимостей времени индукции (до появления зеленой окраски) от концентрации аскорбиновой кислоты. АОА образцов выражали в количестве 1 мг аскорбиновой кислоты на 1 г исследованного растения. Метод быстрый, но самый дорогой из всех выше рассмотренных [10, 59, 62].

Спектрофотометрический метод с использованием реактива Фолина – Чикольте. В последнее время наиболее широкое применение находит спектрофотометрическое определение соединений фенольного ряда [72]. Метод основан на окислительно-восстановительной реакции, в ходе которой восстанавливается фосфорно-молибденовая кислота (ФМК). Интенсивность появляющейся синей окраски зависит от концентрации восстановителя. На практике чаще всего используют смесь ФМК и фосфорновольфрамовой кислот, называемую реактивом Фолина – Чикольте. Известно, что с реактивом Фолина – Чикольте кроме компонентов таннино-катехиновой смеси, могут реагировать присутствующие в экстракте восстанавливающие сахара, аскорбиновая кислота, белки и аминокислоты (цистеин и тирозин). Однако в большинстве случаев для этого требуются дополнительные условия или реагенты (так, аскорбиновая кислота и восстанавливающие сахара способны реагировать с ФМК только при нагревании). Кроме того, содержание фенольных соединений в настое значительно больше, чем других компонентов, способных в указанных условиях реагировать с реактивом Фолина. Поэтому данный метод позволяет получать более достоверные результаты [58]. Исследованы АРА и АОА экстрактов различных сортов чая, ЛРС с использованием реактива. Выявлена корреляционная связь между содержанием полифенолов и АОА экстрактов. В качестве стандарта в методе используют водный раствор галловой кислоты [58, 61, 65].

Ферро-/феррицианидный спектрофотометрический метод. Были измерены спектры поглощения ферро- и феррицианида калия. $K_3[Fe(CN)_6]$ имеет максимум в видимой области спектра при 420 нм, в то время как $K_4[Fe(CN)_6]$ при этой длине волны не поглощает. В результате взаимодействия окислителя (восстановителя) с ферро- или феррицианидом калия изменяется соотношение $[Fe(CN)_6]^{4-}/[Fe(CN)_6]^{3-}$ и соответственно оптическая плотность раствора, содержащего медиаторную пару. Уменьшение оптической плотности при добавлении к системе исследуемого АО свидетельствует о том, что анализируемый раствор обладает восстановительными свойствами, увеличение – окислительными. Изменение оптической плотности при 420 нм обусловлено изменением концентрации $K_3[Fe(CN)_6]$ и соответствует концентрации окислителя (восстановителя), выраженной в моль-экв/л. Зависимость оптической плотности растворов,

содержащих медиаторную пару, от концентрации восстановителя носит линейный характер [51].

Метод конкурирующих реакций. В работе [73] проводилось сравнение реакционной способности кверцетина (Q) и дигидрокверцетина (DHQ) по отношению к пероксирадикалам методом конкурирующих реакций. Реакция проводилась в термостатируемом реакторе. Начальная концентрация Q составляла $(3,30-4,05) \cdot 10^{-4}$ М, AIBN – $2,0 \cdot 10^{-3}$ М. Пероксильные радикалы генерировали при термическом распаде азодиизобутиронитрила (AIBN) в условиях естественной аэрации. Кинетика процесса отслеживалась спектрофотометрическим методом путем прямого наблюдения за расходом Q по изменению интенсивности полосы поглощения, обусловленной сопряжением двойной связи в кольце «С» с кетогруппой ($\lambda_{max}=376$ нм). Как показали результаты исследования, введение в систему Q – AIBN дигидрокверцетина в различных соотношениях не влияло на скорость расходования Q, что свидетельствует о значительном превышении константы скорости взаимодействия Q с пероксильными радикалами по сравнению с DHQ. DHQ не является конкурирующим реагентом (ингибитором) для Q в реакции с пероксильными радикалами. Таким образом, высокая реакционная способность кверцетина по отношению к пероксильным радикалам обусловлена наличием не только о-дигидроксигрупп в кольце В, как в DHQ, но и двойной связи с оксо- и гидроксильной группой в кольце С [73].

Флуориметрические методы

Метод Oxygen Radical Absorption Capacity, ORAC. Метод определения адсорбционной емкости по отношению к кислородным радикалам [10] является одним из наиболее применяемых в настоящее время. Он был первоначально разработан доктором Го-хуа Као в Национальном институте старения (США) в 1992 г. Автоматизированный метод, созданный в 1996 г. Као с доктором Рональдом Прайером, интенсивно применялся при исследованиях АО и окислительного стресса. Метод основан на измерении интенсивности флуоресценции определенного соединения и ее изменении от времени протекания реакции. В присутствии соединений, связывающих кислородные радикалы, увеличивается время флуоресценции вследствие защитного действия АО. Количественное определение АО осуществляется по площади между двумя кривыми – свободной реакции и с добавлением АО (рисунок 4) [10]. Первоначально в качестве флуоресцирующего вещества применялся белок В-фикоэритрин. Однако оказалось, что он вступает в реакцию с фенольными соединениями, являющимися главными АО растительного происхождения, что приводило к систематически заниженным результатам определения АОА. Поэтому на фирме Brunswick Laboratories впервые применили другое, более стабильное, флуоресцирующее соеди-

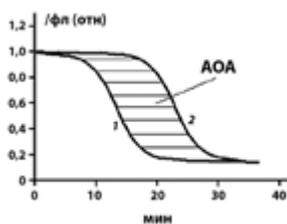


Рисунок 4. Принцип определения АОА по изменению продолжительности флуоресценции. Кривая 1 – кинетика флуоресценции в отсутствии АО, кривая 2 – то же, в присутствии АО

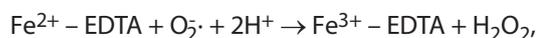
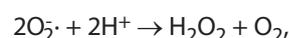
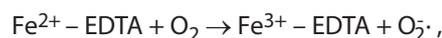
нение – флуоресцеин. Метод относительно простой и чувствительный, но длительный по времени (около 95 мин на определение) и требует наличия флуоресцентного детектора. В этой системе 2,2'-азо-бис-(2-амидинопропан)дигидрохлорид (ААРН) используется в качестве источника перекисных радикалов [10]. Определение продуктов взаимодействия диацилпроизводных флуоресцеина (АЦФ) с гидроксильными радикалами проводят флуориметрически [74]. Интенсивность флуоресценции определяют при длине волны $\lambda_{\text{возб.}}=490$ нм и $\lambda_{\text{исп.}}=530$ нм на флуориметре.

Зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации образующегося во времени гидроксильного радикала в инкубационной среде (при отсутствии и в присутствии тестируемого соединения) носят нелинейный характер, но в фиксированном временном интервале (2000 с) могут быть с достаточно хорошим приближением ($r=0,99$) аппроксимированы линейными зависимостями вида $y=ax+b$. Такие зависимости позволяют оценить концентрации флуоресцирующих продуктов, образовавшихся под действием гидроксильных радикалов.

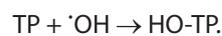
Утверждается, что существует шесть наиболее вредных кислородных реакционноспособных частиц: пероксидные ($\text{ROO}\cdot$) и гидроксильный ($\text{HO}\cdot$) радикалы, супероксид-ион (O_2^-), синглетный кислород ($^1\text{O}_2$), перекись водорода H_2O_2 и пероксинитрит ($\text{OONO}\cdot$). Метод ORAC измеряет только АОА против пероксидного и гидроксильного радикалов, но в дальнейшем планируется распространить его и на другие вредные реакционноспособные частицы. Указанным методом может быть определена АОА как водорастворимых, так и жирорастворимых объектов, таких как пищевые продукты, напитки, химикаты, добавки, плазма и сыворотка крови, моча и т.д. При этом не требуется практически никакой предварительной пробоподготовки, за исключением того, что биологические образцы перед определением должны соответствующим образом храниться (в сухом льду). Тем не менее анализ одного образца занимает более 1,5 ч. В качестве стандартных соединений применяются тролокс (определение пероксидов) и галловая кислота (гидроксил-радикалы). Соответственно, единицей измерения в методе ORAC

является мкмоль стандарта на единицу массы или объема [10].

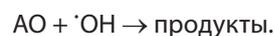
Метод Гуо и Янга основан на определении АОА соединений по их способности связывать гидроксил-радикалы $\text{HO}\cdot$ которые, как полагают, являются наиболее реакционноспособными в физиологических условиях и ответственными за множество нежелательных в организме последствий, таких как онкогенез, атеросклероз и мутации ДНК [10]. В модельной системе, предложенной авторами, генерация гидроксил-ионов протекает из кислорода при участии комплексов железа с этилендиаминтетрауксусной кислотой (EDTA) по следующей схеме:



Добавления перекиси водорода в этом случае не требуется. Образованные радикалы $\text{HO}\cdot$ взаимодействуют с терефталевой кислотой (ТР) с образованием флуоресцирующей (длина волны возбуждения составляла 326 нм, а испускания – 432 нм) 2-гидрокситерефталевой кислоты (НО-ТР):



С этой реакцией может конкурировать реакция связывания гидроксил-радикалов АО:



Хемилюминесцентные методы

Хемилюминесцентное детектирование пероксидных радикалов и сравнение АОА фенольных соединений описано в [10]. В методе, являющемся одной из множества модификаций методов хемилюминесцентного определения АОА, используется способность люминола давать свечение после взаимодействия со СР [41, 68, 75–82]. СР в системе генерируются постоянно в результате инициируемого теплом распада ААРН. Авторы исследовали кинетику хемилюминесценции свободного и ингибированного бутилированным гидрокситололом (ВНТ, 2,6-ди-трет-бутил-п-крезол) и тролоксом распада ААРН. Кинетика изменения интенсивности люминесценции (в относительных единицах – RLU) показана на рисунке 5 [10].

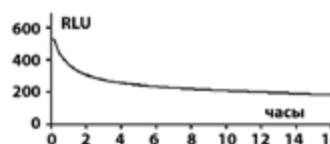


Рисунок 5. Кинетика изменения интенсивности люминесценции люминола (в относительных единицах – RLU) при отсутствии АО. Индикатор – ААРН

При добавлении образца АО наблюдается подавление люминесценции. При этом в случае соединения тролокс отчетливо заметен период индукции – время, по истечении которого люминесценция возрастает, достигая практически первоначального уровня. Период индукции $T_{ин}$ прямо пропорционален количеству добавленного тролокса (рисунок 6) [10]. Несколько иначе ведет себя ВНТ. При его добавлении не наблюдается полного ингибирования люминесценции, сопровождаемого периодом индукции, но заметно частичное подавление люминесценции (рисунок 7) [10]. Авторы сделали предположение о том, что разное влияние на хемилюминесценцию соединений одного класса (фенолы) вызвано, по-видимому, различной степенью ионизации молекул тролокса и ВНТ вследствие различной кислотности их ОН-групп [10].

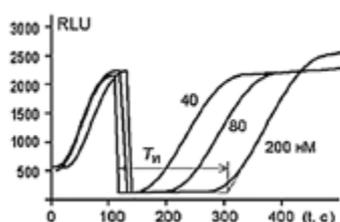


Рисунок 6. Изменение интенсивности люминесценции при добавлении в систему 40, 80 и 200 нМ тролокса

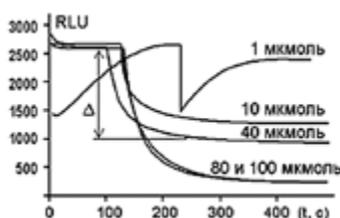
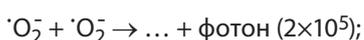
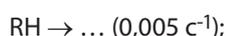
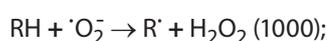
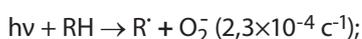


Рисунок 7. Изменение интенсивности люминесценции при добавлении в систему 1, 10, 40, 80 и 100 мкМ ВНТ

Метод фотохемилюминесценции (ФХЛ). Математическое моделирование кинетики ФХЛ с участием рибофлавина в присутствии АО – супероксиддисмутазы и аскорбиновой кислоты провели авторы [10]. Была использована специально разработанная компьютерная программа Kinetic Analyzer. Интенсивность ФХЛ принимали пропорциональной концентрации супероксида, поскольку в системе присутствовал люцигенин. Показано, что экспериментальные кривые ФХЛ описываются достаточно точно для следующей совокупности реакций (в скобках – константы скоростей, $M^{-1} \times c^{-1}$):



Здесь RH – рибофлавин, $\cdot O_2^-$ – супероксидный радикал; R' – радикал рибофлавина; SOD – супероксиддисмутаза; ASC – аскорбат.

С использованием двух экспериментальных моделей, фагоцитарной и липосомной, исследовались антиоксидантные эффекты эфирных масел в зависимости от их концентрации. Первая модель представляла собой активированные фагоциты крови человека, вырабатывающие в ответ на стимуляцию большое количество АФК, количество и кинетику продукции которых регистрируют с помощью биохемилюминометра. АОА эфирных масел определяют по степени тушения активированной хемилюминесценции. В липосомной модели окислительное разрушение биомембран, сопровождающееся образованием АФК, моделируют добавлением к суспензии фосфолипидов яичного желтка минеральной кислоты [23].

Метод железоиндуцированной хемилюминесценции (ХЛ). Для оценки способности к переокислению и интенсивности образования СР в жидких продуктах термообработки сапропелей использовали метод железоиндуцированной ХЛ. Для измерения параметров ХЛ в кювету вводили 0,2 мл фракции жидких продуктов и 20 мл фосфатного буфера (рН=8,0). Кювету помещали в светоизолированную термостатируемую камеру хемилюминомера ХЛ-003 ($t_{камеры}=37^\circ C$). Свечение индуцировали добавлением 1 мл 50 мМ раствора сульфата железа (II). Измеряли следующие параметры хемилюминесценции: светосумму, спонтанное свечение, амплитуды быстрой и медленной вспышек, тангенс угла наклона кривой хемилюминесценции в период нарастания медленной вспышки [80].

Биологические методы

Методы, использующие биологические маркеры. Описан анализ восстанавливающей способности и количественная оценка АОА *in vitro* гидрида кремния и 7 коммерчески доступных водорастворимых АО. Эксперимент включал определение окислительно-восстановительных потенциалов, рН и клеточную фотосенсибилизацию методом спектрофотометрии, что позволило объективно оценить антиоксидантную эффективность соединений [10]. Для оценки абсолютной восстановительной способности АО было использовано модифицированное Кларком (1923) уравнение Нернста, связывающее парциальное давление водорода и восстановительный потенциал в единицах rH:

$$E_h = 1,23 - RT(pH/F + \ln [1/P_0]/4F).$$

где E_h – измеренный окислительно-восстановительный потенциал; F – константа Фарадея; R – универсальная газовая постоянная; T – абсолютная температура. Число 1,23 – разность измеренного потенциала при

парциальном давлении кислорода в одну атмосферу и в растворе при том же значении рН. rH определяется как

$$rH = -\log P_{O_2}$$

где P_{O_2} – парциальное давление кислорода.

Величина rH характеризует абсолютный восстановительный потенциал соединения, исключая влияние рН на величину измеренного окислительно-восстановительного потенциала. Сравнивая величины rH до и после обработки АО, можно получить представление о восстановительной активности соединения, а заодно и сравнить их [10]. Однако измерение восстановительного потенциала хорошо только *in vitro*, проблема моделирования *in vivo* при этом сохраняется. Так, если сделать предположение о том, что наилучшими АО являются энергичные восстановители, то можно прийти до абсурдного вывода об эффективности таких соединений, как борогидрид натрия $NaBH_4$ или алюмогидрид лития $LiAlH_4$, которые в физиологических условиях окажутся, скорее всего, сильнейшими цитотоксикантами. Поэтому наряду с величиной абсолютного восстановительного потенциала авторы рекомендуют оценивать эффективность АО на живой модели [10]. В качестве таковой подходят яйцеклетки китайского хомяка, а в качестве удобных для контроля реакционноспособных кислородных частиц – поглощающие излучение радикалы красителя малахитового зеленого [10].

Достоинства и слабые места использования окисления протеинов в качестве маркера окислительного стресса *in vivo* обсуждаются авторами [8]. Утверждается, что протеины имеют преимущество по сравнению с такими маркерами, как продукты перекисного окисления или ДНК, потому что всякая модификация протеинов весьма сильно отражается на их биологических свойствах. К тому же продукты модификации (окисления) протеинов относительно стабильны и легко детектируемы. Вид их модификации позволяет более точно определить повреждающие механизмы и факторы [10].

Окислительное повреждение ДНК радикалами, образующимися в реакции Фентона, с последующим анализом продуктов окисления использовано авторами [10] для оценки хемопротекторной и АОА соединений. 250 мкг ДНК инкубируется в присутствии или без АО в растворе диметилсульфоксида в трис-буфере при 37 °С в течение 15 мин. Затем добавляются реагенты Фентона, продуцирующие гидроксил-радикалы, и смесь инкубируется еще 45 мин при той же температуре. После инкубации ДНК осаждается этанолом с хлористым натрием. ДНК, содержащая образованные 8-оксопроизводные гуанозина, анализируется после маркирования радиоактивным ^{32}P по описанному методу [10].

Определение АОА на модели тест-системы *Paramecium caudatum*.

В последнее время первичной оценке фармакологического эффекта, в том числе и антиоксидантного действия, различных препаратов с использованием теста *in vivo* в литературе уделяется большое внимание. Культура клеток *Paramecium caudatum* была использована авторами в качестве биологической модели для определения антиоксидантного (регулирующего ПОЛ) типа действия водных извлечений из ЛРС (на примере листьев крапивы двудомной и плодов облепихи крушиновидной). Инициатором ПОЛ мембран клеток являлся 3% раствор водорода пероксида. Оценку АОА исследуемых объектов проводили в соответствии со значениями индекса биологической активности. Установлено, что настой листьев крапивы двудомной проявляет АОА в концентрациях от $1 \cdot 10^{-1}$ – $1 \cdot 10^{-4}$, в остальных случаях жизнеспособность клеток снижается. Отвары плодов облепихи крушиновидной как свежих, так и высушенных обладают АОА в наивысших концентрациях $1 \cdot 10^{-1}$ и $1 \cdot 10^{-2}$, при увеличении степени разведения данной активностью не обладают, а в большинстве случаев снижают жизнеспособность клеток (рисунок 8). В среднем все исследуемые объекты в высоких концентрациях проявляют антиоксидантные свойства, повышая устойчивость клеток к воздействию процессов свободнорадикального окисления примерно на 20–30% [83].

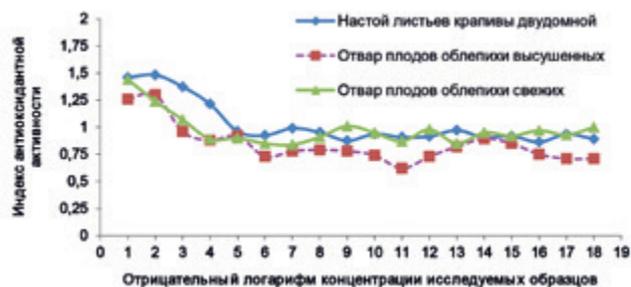


Рисунок 8. Зависимость индекса АОА исследуемых объектов от их концентрации в растворе

Определение АОА на модели гемолиза эритроцитов.

В работе [62] установлена АОА комплексного растительного средства «Литофит» *in vitro* в форме экстракта сухого в условиях перекисного повреждения эритроцитов. Перекисный гемолиз вызывали реактивом Фентона, компоненты которого были использованы в минимальных концентрациях, вызывающих 100% лизис эритроцитов: $Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,01 мг/мл (в пересчете на 100% раствор перекиси водорода). Рассчитывали концентрацию исследуемого растительного средства, ингибирующую перекисный гемолиз на 50% (IC_{50}).

Определение АОА на лабораторных животных.

В работе [84] установлена АОА водного экстракта кипрея узколистного на основании его положительного влияния на физическую работоспособность белых беспородных мышей.

Другие методы

Кинетические методы. Для оценки АОА Н.В. Сизовой с соавторами предложен метод микрокалориметрии. Метод основан на регистрации теплового эффекта радикальных реакций окисления или полимеризации и позволяет по периоду индукции рассчитать эффективное содержание ингибиторов в сложных природных смесях. По приросту тепловыделения в течение периода индукции можно рассчитать константу скорости взаимодействия пероксидного радикала и ингибитора [6, 7]. Предложенный метод микрокалориметрии очень удобен в качественной оценке АОА сложных природных смесей, так как регистрируемая кривая даёт точное и быстрое представление о наличии и силе природных ингибиторов радикальных процессов [23].

В работе [6] на модельной реакции радикально-иницированного окисления кумола оценивают антиоксидантные свойства 100%-го эфирного масла полыни горькой и пихтовых экстрактов полыни горькой, тысячелистника и крапивы, березовых почек, березовых листьев, календулы. На рисунке 9 приведены экспериментальные кривые окисления кумола в присутствии ингибиторов – эфирных масел и витамина Е [6].

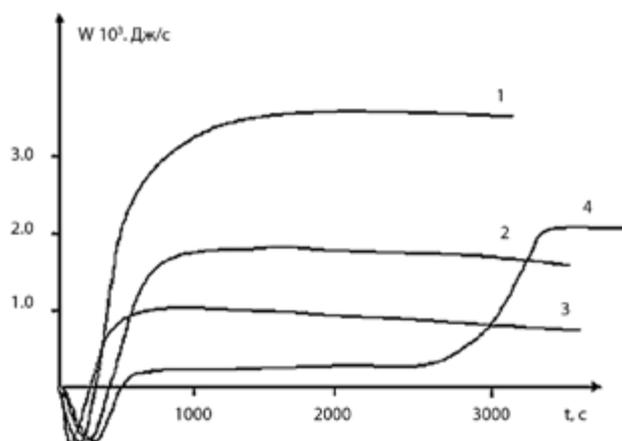


Рисунок 9. Кривые тепловыделения модельной реакции окисления кумола в присутствии ингибиторов различного типа: 1 – без ингибитора; 2 – пихтовый экстракт полыни $C=2,12$ г/л; 3 – эфирное масло полыни $C=0,63$ г/л; 4 – витамин Е масляный раствор $C=6,24$ г/л

В качестве модельной реакции при изучении антиокислительной эффективности экстрактивных веществ образцов разных видов растений сем. Geraniaceae (герань лесная, герань кровяно-красная, герань луговая, журавельник цикutowый), сем. Rosaceae (лапчатка, малина лесная, ежевика лесная) выбран процесс радикально-цепного инициированного окисления изопропилового спирта (75 °С, инициатор – AIBN). Эффективность ингибирующего действия экстрактов оценивали по степени снижения скорости поглощения кислорода воздуха при окислении модель-

ного субстрата в присутствии добавок экстрактивных веществ образцов. Скорость поглощения кислорода определяли с помощью высокочувствительной манометрической установки [9].

Методом микрокалориметрии на модельной реакции окисления кумола проведено сравнение АОА пихтового масла и CO_2 -экстракта пихты, подсолнечного масла и CO_2 -экстракта семян подсолнечника. Как правило, в липофильных фракциях самыми мощными АО являются токоферолы, они предохраняют натуральные растительные масла от окисления. Для жирных масел метод микрокалориметрии позволяет определять основной липидный АО – токоферол, который является ингибитором модельной реакции окисления кумола, что позволяет определять его количественно. Для эфирных масел, как слабых АО, оценить АОА можно по степени понижения скорости окисления модельной реакции [7].

Газоволюметрический метод. Для определения АОА гуминовых кислот изучали инициированное AIBN жидкофазное окисление кумола в среде диметилсульфоксида (ДМСО) [63]. За кинетикой процесса окисления следили газоволюметрически, измеряя количество поглощенного кислорода при постоянной температуре 75 °С и постоянном парциальном давлении кислорода 760 мм рт. ст. на установке, описанной в [63]. Газоволюметрический метод использован также для определения АОА соединений, в основе которого лежит инициированное ионами железа окисление молекулярным кислородом липопротеинов яичного желтка. Параметром, характеризующим АОА фенольных АО, выбрана концентрация АО, вызывающая снижение в два раза объема поглощенного кислорода [85].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возросшее потребление медикаментов, наблюдаемое в последнее время во многих странах, а также увеличение номенклатуры фармацевтических препаратов ещё не означает победу человечества в борьбе со многими распространёнными заболеваниями, в том числе вызванными различными сердечно-сосудистыми нарушениями. Для профилактики таких заболеваний широко используются вещества, обладающие АОА [86, 88]. Вопросы кислородного метаболизма в организме человека являются объектами постоянного внимания медиков, химиков и биохимиков. При нарушении баланса между биохимическими механизмами оксигеназной утилизации кислорода, механизмами защиты от вредных воздействий его высокорекреационных метаболитов возникает окислительный стресс. Фармакологическая коррекция окислительного стресса осуществляется с помощью БАВ, в частности АО. Они прерывают быстрорастущие процессы окисления, образуя малоактивные радикалы, легко выводимые из организма. Одной из самых перспективных групп БАВ, обладающей АОА, являются расти-

тельные фенольные соединения, среди которых ведущее место занимают полифенолы. Поэтому одним из важных показателей качества растительного сырья является их АОА [36, 67]. Однако необходимо контролировать потребление АО, поскольку при большом содержании они становятся проантиоксидантами. Рекомендуемые уровни потребления АО приняты в РФ в 2004 году – 350–1300 мг/сутки, а в других странах – 800–1000 мг/сутки. Практическое использование АО растительного происхождения для регуляции свободнорадикальных процессов в организме человека выдвигает на первый план проблему количественной оценки АОА комплексных препаратов на основе ЛРС.

Тем не менее до сих пор не существует метода, который дал бы полную информацию о состоянии и взаимодействиях сложных систем, в которых образуются и вступают в реакции АО. Нет также единого термина, который бы определял антиоксидантные свойства соединения или комплекса соединений. Предлагают различать антиоксидантную емкость, АОА, понимая под первым «количество молей ловушек радикалов в исследуемом образце». Под АОА понимают константу скорости действия АО против СР. Используют также термины антиоксидантной силы, антиоксидантной способности. Таким образом, наблюдается смешение термодинамических и кинетических понятий. В общем случае термин «активность» используют как термодинамический и его не следует применять как кинетический. Все существующие методы определения АОА страдают теми или иными недостатками.

Сравнительная оценка ряда методов определения АО в различных системах показала, что распространенный метод добавок образцов, содержащих АО, в модельную реакцию окисления относительно легко окисляющегося субстрата является наглядным, но, как правило, требует относительно больших количеств образца и времени для анализа. При определении АОА наиболее широко используются электрохимические (амперометрия и кулонометрия) и спектрофотометрические методы анализа (TBARS, DPPH и хемилюминесцентные методы) (рисунки 10–12). Электрохимические методы характеризуются высокой чувствительностью и экспрессностью. Вольтамперометрическое определение суммарной АОА по относительному изменению тока электровосстановления кислорода на ртутно-пленочном электроде в последнее время не находит широкого распространения, так как его использование запрещено во многих странах [87, 88]. Однако в ходе спектрофотометрического определения АО проявляются все проблемы, которые обычно осложняют анализ неразделенных смесей, а именно: не полностью известный качественный состав, наложение сигналов разных аналитов или дериватов, разная чувствительность их определения, непредсказуемое влияние посторонних веществ, неаддитивность аналитического сигнала [87]. Наиболее быстрым, чувствительным и информативным методом показал себя ХЛ-метод, который

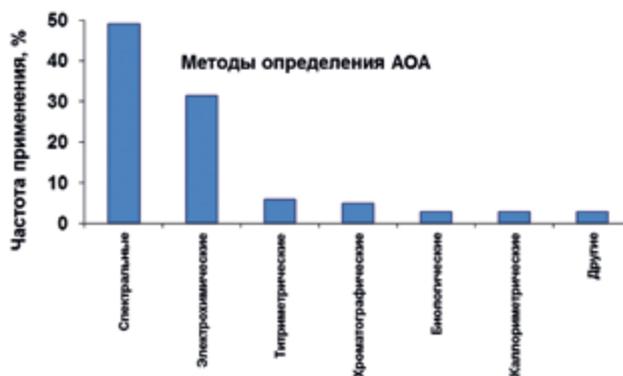


Рисунок 10. Частота применения различных методов определения АОА



Рисунок 11. Частота применения электрохимических методов определения АОА



Рисунок 12. Частота применения спектральных методов определения АОА

можно использовать для экспресс-анализа качества и количества АО в различных материалах и продуктах. Этот метод позволяет анализировать микрограммы образцов. При этом в одном опыте определяется общее содержание АО и качественные показатели: кинетические характеристики АРА наиболее и наименее активного АО, если образец содержит смесь АО. Специальными опытами показано, что ХЛ-методом можно определять как жиро-, так и водорастворимые АО в экстрактах, тканях, плазме крови и т.д. [89].

В заключение хочется отметить объективную невозможность существования не то что единого метода для оценки АОА соединений, но даже возможности сравнения результатов, полученных разными методами. И связано это, очевидно, с многообразием протекающих в природе радикальных процессов. Одно дело, когда определяется АОА соединения (или группы соединений), применяемого для стабилизации химических продуктов и полимеров, и совсем другое – влияние АО на процессы, протекающие в живой клетке. В результате каждый исследователь выбирает готовый, создает новый или модифицирует уже известный метод, исходя из своих целей и возможностей [10], а также зачастую прибегает к исследованию АОА изучаемого объекта при помощи комплекса различных методов.

Из вышеизложенного следует, что изыскания в области определения суммарного содержания АО и АОА объектов фармацевтического назначения актуальны как в практическом, так и в теоретическом плане.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е.И. Короткова, О.А. Аврамчик, М.С. Юсубов и др. Определение антиоксидантной активности экстрактов растительного сырья методом катодной вольтамперометрии // Хим.-фарм. журн. 2003. № 9. С. 55–56.
2. И.Ф. Абдулин, Е.Н. Турова, Г.К. Будников, Г.К. Зиятдинова. Электрогенерированный бром – реагент для определения антиоксидантной способности соков и экстрактов // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2002. Т. 62. № 9. С. 13–15.
3. В.В. Амосов, В.Н. Зеленков, А.А. Лапин, М.В. Марков. Антиоксидантная емкость спиртовых экстрактов из некоторых видов рода лабазник (*Filipendula*) // Сборник научных трудов: «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». – Пятигорск. Вып. 64. 2009. С. 243–244.
4. А.А. Лапин, М.Ф. Борисенков, И.В. Карманов и др. Антиоксидантные свойства продуктов растительного происхождения // Химия растительного сырья. 2007. № 2. С. 79–83.
5. Патент РФ 2170930, МКП G01N33/50, G01N33/52. Способ определения антиокислительной активности / Т.В. Максимова, И.Н. Никулина, В.П. Пахомов и др.; заявитель и патентообладатель: ГОУ ВПО Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова. – № 200011126/14; заявл. 05.05.2000; опубл. 20.07.2001. – БИ 07/2005.
6. Н.В. Сизова. Сравнение антиоксидантной активности пихтового масла и СО₂-экстракта пихты, подсолнечного масла и СО₂-экстракта семян подсолнечника // Химия растительного сырья. 2004. № 3. С. 99–102.
7. Н.В. Сизова, О.Ю. Веретнова, А. Ефремов. Оценка антиокислительной активности эфирных масел методом микрокалориметрии // Химия растительного сырья. 2002. №3. С. 57–60.
8. В.Р. Хайруллина, Л.Р. Якупова, А.Н. Терегулова и др. Антиокислительные свойства бикомпонентных композиций на основе кверцетина и дигидрокверцетина // Тезисы материалов V Всеросс. научной конф. «Химия и технология растительных веществ». – Уфа. 2008. С. 308.
9. В.Р. Хайруллина, Г.Г. Гарифуллина, А.Я. Герчиков. Антиокислительная активность экстрактов растений сем. Geraniaceae, Rosaceae на примере модельной реакции окисления изопропилового спирта // Хим.-фарм. журн. 2005. № 3. С. 28–30.
10. В.В. Хасанов, Г.Л. Рыжова, Е.В. Мальцева. Методы исследования антиоксидантов // Химия растительного сырья. 2004. № 3. С. 63–75.
11. Т.Г. Цюпка, И.С. Петракова, Н.С. Бриленок и др. Определение суммарного содержания антиоксидантов методом FRAP // Аналитика и контроль. 2011. Т. 15. № 3. С. 287–298.
12. И.Ф. Абдулин, Е.Н. Турова, Г.К. Будников. Органические антиоксиданты как объекты анализа // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2001. Т. 67. № 9. С. 3–13.
13. Г.К. Будников, Г.К. Зиятдинова. Антиоксиданты как объекты биоаналитической химии // Журнал аналитической химии. 2005. Т. 60. № 7. С. 678–691.
14. Х.З. Брайнина, А.В. Иванова, Е.Н. Шарафутдинова. Оценка антиоксидантной активности пищевых продуктов методом потенциометрии // Известия вузов. Пищевая технология. 2004. №4. С. 73–75.
15. А.А. Лапин, В.Н. Зеленков, А.С. Муzychук. Антиоксидантная емкость водорастворимых полисахаридов растительного сырья // Тезисы материалов IV Всеросс. научной конф. «Химия и технология растительных веществ». – Сыктывкар. 2006. С. 257.
16. Л.Т. Козаева, С.А. Бекузарова, А.А. Лапин, В.Н. Зеленков. Определение содержания антиоксидантов водных экстрактов лабазника вязолистного методом кулонометрического титрования электрогенерированным бромом // Тезисы материалов IV Всеросс. научной конф. «Химия и технология растительных веществ». – Сыктывкар. 2006. С. 251.
17. В.В. Амосов, А.А. Лапин, М.В. Марков, В.Н. Зеленков. Антиоксидантная емкость спиртовых экстрактов рода лабазник // Тезисы материалов IV Всеросс. научной конф. «Химия и технология растительных веществ». – Сыктывкар. 2006. С. 225.
18. И.Ф. Русина, А.Ф. Карташева, Т.В. Максимова, О.Т. Касайкина. Анализ содержания антиоксидантов в фармпрепаратах, пищевых добавках и биосистемах методом хемилюминесценции // Альманах клинической медицины. 2006. № 12. С. 128.
19. Л.Б. Терешкина, Г.П. Федосеева, А.А. Лапин, В.Н. Зеленков. Содержание антиоксидантов в сортах амаранта Екатеринбургского ботанического сада // Тезисы материалов IV Всеросс. научной конф. «Химия и технология растительных веществ». – Сыктывкар. 2006. С. 286.
20. Е.Н. Шарафутдинова, А.В. Иванова, А.И. Матерн, Х.З. Брайнина. Качество пищевых продуктов и антиоксидантная активность // Аналитика и контроль. 2011. Т. 15. № 3. С. 281–286.
21. А.Я. Яшин, Я.И. Яшин, Н.И. Черноусова и др. Методы определения антиоксидантной активности пищевых продуктов и БАДов // Мир измерений. 2012. № 1. С. 30–35.
22. П.В. Масленников, Г.Н. Чупахина, Л.Н. Скрыпник и др. Содержание низкомолекулярных антиоксидантов в лекарственных растениях Калининградской области // Химия растительного сырья. 2012. № 3. С. 127–133.
23. Е.В. Михайлова, В.С. Савостин, А.П. Васильева. Оценка прооксидантной и антиоксидантной активности эфирных масел // Сборник научных трудов: «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». – Пятигорск. 2012. Вып. 67. С. 354–356.
24. М.Н. Макарова, В.Г. Макаров, И.Г. Зенкевич. Антирадикальная активность флавоноидов и их комбинаций с другими антиоксидантами // Фармация. 2004. № 2. С. 30–32.
25. С.В. Луценко, Н.Б. Фельдман, В.А. Быков. Растительные флаволигнаны. Биологическая активность и терапевтический потенциал. – М. 2006. 236 с.
26. Е.О. Сергеева, Е.Г. Доркина, Л.А. Саджая и др. Изучение антиоксидантного действия гесперидина, диосмина, флавицина и кверцетина *in vitro* // Сборник научных трудов: «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». – Пятигорск. 2012. Вып. 67. С. 372–374.
27. О.В. Тринеева, Е.Ф. Сафонова, С.С. Воропаева, А.И. Сливкин. Антиоксидантная активность водно-спиртовых извлечений листьев крапивы двудомной // Фармация. 2013. № 1. С. 11–12.
28. О.В. Тринеева, И.И. Сафонова, Е.Ф. Сафонова, А.И. Сливкин. Определение антиоксидантной активности извлечений из

- плодов облепихи крушиновидной // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2012. № 2. С. 266–268.
29. Л.П. Нилова, А.А. Вытовтов, Е.В. Камбулова, М.С. Кайгородцева. Определение антиоксидантной активности порошков из растительного сырья перманганатным методом // Потребительский рынок Евразии: современное состояние, теория и практика в условиях Евразийского экономического союза и ВТО: Сборник статей III Международной научно-практической конференции. 2015. С. 118–122.
 30. О.В. Тринева, Е.Ф. Сафонова, А.И. Сливкин, И.И. Сафонова. Определение антиоксидантной активности растительных масел и масляных экстрактов, применяемых в фармации // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2013. Т. 79. № 2. С. 26–27.
 31. Д.А. Фадеева, М.А. Халикова, Т.С. Полухина и др. Определение антиоксидантной активности некоторых веществ аминокислотной, пептидной и полифенольной природы *in vitro* // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. 2011. № 4(99). Вып. 13/2. С. 178–180.
 32. ГОСТ Р 54036-2010. Продукты пищевые. Определение содержания водорастворимых антиоксидантов в клубнях картофеля амперометрическим методом. Введ. 2012–01–01. – М.: Изд-во стандартов, 2011. 7 с.
 33. Е.Н. Семенистая, О.Г. Ларионов. Изучение состава и антиоксидантной активности растительных экстрактов методом ВЭЖХ с УФ- и амперометрическим детектированием // Химико-фармацевтический журнал. 2008. Т. 42. № 9. С. 43–48.
 34. Н.Н. Сажина. Определение антиоксидантной активности различных биоантиоксидантов и их смесей амперометрическим методом // Химия растительного сырья. 2016. № 4. С. 71–76.
 35. В.М. Мисин, Н.Н. Сажина, Е.И. Короткова. Измерение антиоксидантной активности экстрактов смесей чая электрохимическими методами // Химия растительного сырья. 2011. № 2. С. 137–143.
 36. Е.И. Рябинина, Е.Е. Зотова, Е.Н. Ветрова и др. Новый подход в оценке антиоксидантной активности растительного сырья при исследовании процесса аутоокисления адреналина // Химия растительного сырья. 2011. № 3. С. 117–121.
 37. П.Н. Савин, В.М. Болотов, Д.А. Кудинов. Антиоксидантная активность антоциановых красителей // Тезисы материалов межрег. научно-практ. конф. «Проблемы здоровьясбережения школьников и студентов. Новые научные тенденции в медицине и фармации». – Воронеж. 2008. С. 381–383.
 38. П.Н. Савин, В.М. Болотов. Исследование антиоксидантных свойств желейного мармелада // Химия растительного сырья. 2008. № 4. С. 177–179.
 39. В.В. Иванов, О.Н. Денисенко, Л.А. Бережная. Определение антиоксидантной активности извлечений из травы горца (рейноутрии) сахалинского *Polygonum Sachalinense* F. SCHMIDT // Здоровье и образование в XXI веке. 2016. Т. 18. № 10. С. 125–128.
 40. Н.С. Родионова, М.В. Мануковская, Я.П. Коломникова, М.В. Серченя. Исследование антиоксидантной активности настоек из ежевики и клюквы, приготовленных методом ультразвукового экстрагирования // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. 2015. № 4(66). С. 98–103.
 41. Ю.А. Панасенкова, Е.И. Ременякина, В.Д. Левичкин и др. Способы тестирования антиоксидантных свойств лекарственных препаратов в лабораторных условиях и возможности использования этих показателей в клинической практике // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2013. Т. 24. № 25(168). С. 239–243.
 42. Е.Ю. Демченкова. Новый метод определения антиоксидантной активности лекарственных средств // Биомедицина. 2006. Т. 1. № 5. С. 22.
 43. Е.Ю. Демченкова, В.П. Пахомов. Определение антиоксидантной активности лекарственных средств, БАДов и лекарственного растительного сырья // Биомедицина. 2010. Т. 1. № 5. С. 76–78.
 44. М.А. Сысоева, Л.Р. Юмаева, В.С. Гамаурова и др. Сравнительная характеристика антиоксидантной активности водных и спиртовых извлечений чаги // Химия растительного сырья. 2009. № 2. С. 121–124.
 45. В.А. Гульшина, Л.Б. Терешкина, Н.П. Романова и др. Оценка качества сырья амаранта по содержанию антиоксидантов и кальция // Тезисы материалов IV Всеросс. научной конф. «Химия и технология растительных веществ». – Сыктывкар. 2006. С. 241.
 46. Г.М. Алексеева, Э.Л. Арзуманян, Л.И. Слепян, А.Л. Марченко. Определение антиоксидантной активности в водных и спиртоводных извлечениях из штаммов растений семейства аралиевых // Сборник научных трудов: «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». – Пятигорск. 2012. Вып. 67. С. 382–383.
 47. М.В. Ларина. Растительные фенолы и антиокислительная активность экстрактов // Тезисы материалов IV Всеросс. научной конф. «Химия и технология растительных веществ». – Сыктывкар. 2006. С. 107.
 48. И.В. Шилова, Е.А. Краснов, Е.Ю. Авдеева и др. Химический состав и антиоксидантные свойства растений рода лабазник и альфредия // Тезисы материалов IV Всеросс. научной конф. «Химия и технология растительных веществ». – Сыктывкар. 2006. С. 217.
 49. И.В. Шилова, Е.И. Короткова, А.Н. Втроушина. Антиоксидантные свойства и биологически активные вещества экстракта лабазника обыкновенного // Тезисы материалов V Всеросс. научной конф. «Химия и технология растительных веществ». – Уфа. 2008. С. 329.
 50. Е.Р. Газизуллина, Я.А. Окулова, К.Г. Попова и др. Потенциометрический метод определения антиоксидантной активности пищевых объектов и объектов фармации с использованием комплексов металлов // Материалы XX Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. 2016. С. 251.
 51. Л.П. Некрасова, Р.И. Михайлова, И.Н. Рыжова. Определение антиоксидантной активности электрохимически активированной воды потенциометрическим и спектрофотометрическим методами // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2016. № 5–4. С. 559–563.
 52. А.С. Чистякова, Т.А. Брежнева, А.А. Мальцева. Изучение антиоксидантной активности некоторых групп БАВ методом ТСХ // Сборник научных трудов «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». – Пятигорск. 2012. Вып. 67. С. 289–290.
 53. Д.Н. Оленников, Л.В. Дударева. Химический состав и антирадикальная активность эфирного масла российских образцов *Mentha piperita* // Химия растительного сырья. 2011. № 4. С. 109–114.
 54. А.Л. Самусенко. Исследование антиоксидантной активности эфирных масел лимона, розового грейпфрута, кориандра, гвоздики и их смесей методом капиллярной газовой хроматографии // Химия растительного сырья. 2011. № 3. С. 107–112.
 55. П.Б. Лубсандоржиева. Антиоксидантная активность экстрактов *Calendula officinalis* L. // Химия растительного сырья. 2009. № 4. С. 123–126.
 56. А.Ш. Кайшев, С.А. Реккандт, Н.Ш. Кайшева, В.А. Челомбитько. Антиоксидантная активность биокомпозиций на основе спиртовых отходов // Фармация. 2009. № 5. С. 7–10.
 57. Е.И. Кондратенко, А.В. Великородов, Мохамад Ахмед Эль сайед Авад и др. Химический состав и антиоксидантная активность экстрактов семян NELUMBO NUCIFERA // Химия растительного сырья. 2012. № 3. С. 115–120.
 58. А.А. Федосеева, О.С. Лебедкова, Л.В. Каниболоцкая. Антиоксидантная активность настоев чая // Химия растительного сырья. 2008. № 3. С. 123–127.

59. М.С. Макиева, А.В. Воронков, Ю.А. Морозов. Определение антиоксидантной активности трансдермальной мази с экстрактом лимонника китайского // Фармация и фармакология. 2015. Т. 3. № 1. С. 66–67.
60. Е.И. Кондратенко, Н.А. Ломтева, А.А. Бони и др. Иммунотропные и антиоксидантные свойства экстракта лотоса орехоносного // Фармация. 2012. № 1. С. 40–42.
61. Н.Б. Еремеева, Н.В. Макарова, И.А. Платонов. Антиоксидантная активность экстрактов черноплодной рябины, полученных в надкритических условиях // Техника и технология пищевых производств. 2016. Т. 42. № 3. С. 12–18.
62. Ю.А. Батуева, А.А. Торопова, А.Г. Монадодоев, Л.Н. Шантанова. Мембраностабилизирующее и антиоксидантное действие комплексного растительного средства «Литофит» в тест-системах *in vitro* // Сибирский медицинский журнал. 2015. Т. 136. № 5. С. 122–124.
63. В.С. Бережной, О.В. Смирнова, И.В. Ефимова. Определение антиоксидантной и антирадикальной активности низкотемпературных фракций гуминовых веществ // Вестник Новгородского государственного университета им. Ярослава Мудрого. 2013. № 73–2. С. 68–71.
64. Е.Г. Линхоева, А.А. Торопова, Е.В. Петров, С.В. Лемза. Определение антиоксидантной активности противодиабетического средства «Глюковит» // Вестник Бурятского государственного университета. 2013. № 12. С. 146–149.
65. В.Б. Кулиев. Антиоксидантная активность экстрактов из плодов *Crataegus Meyeri* (Rosaceae) // Растительные ресурсы. 2013. Т. 49. № 2. С. 275–286.
66. А.В. Белый, Н.И. Белая. Антирадикальная активность дубильных веществ корневищ *BERGENIA CRASSIFOLIA* в реакции с 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразилом // Химия растительного сырья. 2012. № 3. С. 121–126.
67. Е.И. Рябинина, Е.Е. Зотова, Е.Н. Ветрова, Н.И. Пономарева. Сравнение химико-аналитических методов определения танидов и антиоксидантной активности растительного сырья // Аналитика и контроль. 2011. Т. 15. № 2. С. 202–208.
68. А.Р. Ахметьянова, Т.В. Булгаков, Э.Х. Галиахметова и др. Оценка уровня антиоксидантной активности перспективных дикорастущих и культивируемых лекарственных растений республики Башкортостан // Медицинский вестник Башкортостана. 2016. Т. 11. № 4(64). С. 68–71.
69. В.А. Волков, Н.А. Дорофеева, П.М. Пахомов. Кинетический метод анализа антирадикальной активности экстрактов растений // Химико-фармацевтический журнал. 2009. Т. 43. № 6. С. 27–31.
70. В.И. Дейнека, И.П. Анисимович, А.Ю. Михеев и др. О некоторых особенностях определения антиоксидантной активности // Сборник научных трудов: «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». – Пятигорск. 2012. Вып. 67. С. 415–418.
71. А.А. Мальцева, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин, П.А. Гвоздевский. Флавоноиды растения *Polemonium coeruleum* L. и предварительная оценка их антиоксидантной активности // Сборник научных трудов: «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». – Пятигорск. 2010. Вып. 65. С. 89–90.
72. В.Н. Сорокопудов, Н.А. Лучина, О.А. Мостовой. Антиоксидантные свойства видов малины // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. 2011. № 4(99). Вып. 13/2. С. 196–198.
73. И.Г. Конкина, С.А. Грабовский, Ю.И. Муринов, Н.Н. Кабальнова. Сравнительная оценка реакционной способности кверцетина и дигидрокверцетина по отношению к пероксильным радикалам // Химия растительного сырья. 2011. № 3. С. 207–208.
74. М.Н. Макарова, В.Г. Макаров, И.Г. Зенкевич. Антирадикальная активность флавоноидов и их комбинаций с другими антиоксидантами // Фармация. 2004. № 2. С. 30–32.
75. А.А. Чиркин, Е.И. Коваленко, Г.Н. Бузук, Т.А. Толкачева. Антиоксидантная активность водных экстрактов лекарственных растений // Вестник Віцебскага дзяржаўнага ўніверсітэта. 2012. Т. 1. № 67. С. 47–53.
76. И.В. Бабенкова, Ю.О. Телескин, Н.А. Тюкавкина и др. Антиоксидантная активность масла из зародышей пшеницы // Фармация. 2001. № 2. С. 15–18.
77. И.В. Бабенкова, Е.А. Буравлев, К.В. Буравлева, Ю.О. Теселкин. Определение антиоксидантной активности плазмы крови в экспериментальных и клинических исследованиях // Евразийский союз ученых. 2015. № 4–10(13). С. 97–100.
78. А.В. Паничкин, Л.С. Большакова, В.Н. Милентьев и др. Использование хемилюминесценции для оценки антиоксидантных свойств пищевых веществ // Фундаментальные исследования. 2013. № 10–11. С. 2436–2439.
79. Р.Т. Муллагулов, В.Н. Козлов, Л.Ф. Пономарева. Изучение антиоксидантной активности лекарственных трав методом хемилюминесценции в опытах *in vitro* // Вестник Волжского университета им. В.Н. Татищева. 2012. № 1(9). С. 231–234.
80. А.А. Ноздрунова, О.И. Кривонос, В.Е. Высокогорский и др. Химический состав и окислительные свойства жидких продуктов термической переработки сапропелей // Химия растительного сырья. 2008. № 4. С. 141–146.
81. Н.Ю. Грибова, Т.А. Филиппенко, А.Н. Николаевский и др. Влияние ультразвука при экстракции антиоксидантов из листьев толокнянки // Химико-фармацевтический журнал. 2008. Т. 42. № 10. С. 43–45.
82. Т.А. Филиппенко, Н.Ю. Грибова. Антиоксидантное действие экстрактов лекарственных растений и фракций их фенольных соединений // Химия растительного сырья. 2012. № 1. С. 77–81.
83. О.В. Тринеева, А.И. Сливкин. Исследование мембраностабилизирующей, антиоксидантной и антитоксической активности водных извлечений из лекарственного растительного сырья (на примере плодов облепихи крушиновидной и листьев крапивы двудомной) на тест-системе *Paramecium caudatum* // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2016. № 1. С. 165–169.
84. И.В. Полежаева, О.Ф. Веселова, Н.И. Полежаева. Антиоксидантные свойства водного экстракта вегетативной части кипрея узколистного // Тезисы материалов IV Всеросс. научной конф. «Химия и технология растительных веществ». – Сыктывкар. 2006. С. 274.
85. А.Н. Николаевский, Т.А. Филиппенко, О.П. Книга, В.В. Левкина. Определение антиоксидантной активности веществ при окислении липопротеинов яичного желтка газовойolumетрическим методом // Биомедицинская химия. 2006. Т. 52. № 2. С. 211–218.
86. Э.Т. Оганесян, О.А. Андреева, Ю.А. Быковских и др. Изучение антиоксидантной активности извлечений из надземной части хризантемы корейской (*Chrysanthemum x koreanum Makai* семейства Asteraceae) // Сборник научных трудов: «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». – Пятигорск. 2012. Вып. 67. С. 358–359.
87. Н.Л. Наумова. Современный взгляд на проблему исследования антиоксидантной активности пищевых продуктов // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии. 2014. Т. 2. № 1. С. 5–8.
88. В.А. Смирнов, В.В. Смирнова. Современные методы измерения антиоксидантной активности биологических объектов // Альманах современной метрологии. 2015. № 2. С. 248–279.
89. И.Ф. Русина, А.Ф. Карташева, Т.В. Максимова, О.Т. Касайкина. Анализ содержания антиоксидантов в фарм-препаратах, пищевых добавках и биосистемах методом хемилюминесценции // Альманах клинической медицины. 2006. № 12. С. 128.