

На правах рукописи

Аврамчик Олеся Александровна

**Закономерности процесса электровосстановления
кислорода в присутствии антиоксидантов и их
применение в аналитической практике**

02.00.02 — аналитическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Томск — 2006

Работа выполнена на кафедре физической и аналитической химии
Томского политехнического университета

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ: доктор химических наук,
профессор Карбаинов Ю.А.

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ: доктор химических наук,
профессор Гунцов А.В.
кандидат химических наук,
доцент Мамонтова И.П.

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: НИИ безопасности
жизнедеятельности республики
Башкортостан

Защита диссертации состоится 20 декабря 2006 г. в 14.30 на заседании диссертационного совета Д 212.269.04 при Томском политехническом университете по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке Томского политехнического университета по адресу: г. Томск, ул.Белинского, 53

Автореферат разослан: « » ноября 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
канд. хим. наук, доцент



Гиндуллина Т.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Вопросы кислородного метаболизма в организме человека являются объектами постоянного внимания медиков, химиков и биохимиков. Особенно сейчас, когда стало очевидно, что избыточное содержание кислорода и его активных радикалов вызывают радикально-цепные процессы окисления в клетках организма, приводя к значительным нарушениям в их нормальном метаболизме.

Фармакологическая коррекция оксидативного стресса осуществляется с помощью биологически-активных веществ (**БАВ**), в частности, антиоксидантов (**АО**). Они прерывают быстрорастущие процессы окисления, образуя малоактивные радикалы, легко выводящиеся из организма. Терапия с включением АО находит все большее применение при лечении ряда заболеваний. Поэтому на первый план выносится проблема количественной оценки суммарной антиоксидантной активности (**САОА**) комплексных препаратов и их эффективных концентраций, изучение электрохимических свойств АО, исследование их влияния на жизненно важные процессы окисления, происходящие в организме.

Совершенствование способов обнаружения и исследования антиоксидантных свойств препаратов стимулирует создание новых методов, применение которых должно помочь уточнению диагноза, лечению заболеваний и оценке эффективности антиоксидантной терапии у конкретного больного. Основным препятствием на пути таких исследований является ограниченный круг применяемых методов, в большинстве своем дорогостоящих, неэффективных и зачастую трудоемких. Кроме того, результаты исследований часто несопоставимы, так как получены в разных модельных системах, не отражающих окислительные процессы организма человека и животного. Поэтому поиск других альтернативных методов определения САОА лекарственных препаратов, пищевых продуктов и растительных объектов представляет актуальную задачу.

Электрохимические методы анализа интенсивно развиваются в настоящее время. Оперативность, высокая чувствительность и использование в качестве модельной реакции процесса электровосстановления кислорода (**ЭВ O₂**), идущего по механизму, аналогичному восстановлению кислорода в клетках организма человека и животного, являются характеристиками, которые позволяют вольтамперометрическому анализу успешно конкурировать с традиционными методами определения САОА, предлагая им, в ряде случаев, разумную альтернативу.

Цель работы: рассмотреть закономерности процесса ЭВ O₂ в присутствии АО в условиях нестационарной диффузии на электродах ограниченного объема с точки зрения их использования в решении ряда аналитических проблем, в частности, для определения САОА различных объектов.

В соответствии с этим в работе были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработать новый, более эффективный способ определения САОА объектов. Установить количественные критерии оценки САОА.

2. Исследовать влияние индивидуальных АО на кинетические закономерности процесса ЭВ O_2 в условиях нестационарной диффузии на электродах ограниченного объема.

3. Провести оценку наиболее эффективной концентрации и времени активного действия индивидуальных АО по отношению к процессу ЭВ O_2 с использованием методов планирования экспериментов.

4. Исследовать САОА ряда индивидуальных веществ, лекарственных препаратов, объектов растительного и природного происхождения для дальнейшего выяснения их роли в механизмах антиоксидантной защиты организма и ослабления действия окислительного стресса.

5. Рассмотреть влияние ряда факторов: исходного типа сырья, способа выделения и концентрирования, рН раствора – на САОА ряда объектов, что может позволить более грамотно подойти к комплексной антиоксидантной терапии.

6. Исследовать процессы релаксации ряда оксигенированных инфузионных растворов по отношению к процессу ЭВ O_2 с целью расширения возможностей неотложной помощи при острой гипоксии.

Научная новизна. Впервые рассмотрены теоретические закономерности процесса ЭВ O_2 в условиях нестационарной диффузии на стационарных электродах ограниченного объема в присутствии АО. Предложен способ определения константы скорости последующей химической реакции взаимодействия АО с активными кислородными радикалами.

Дано теоретическое обоснование результатов влияния АО на электрохимическое восстановление кислорода и его кинетические закономерности. Сделано предположение, что процесс соответствует ЕС-механизму.

Впервые для количественной оценки введены концентрационный и кинетический критерии САОА объектов.

Проведена оценка эффективной концентрации АО и времени их активного действия, используя методы планирования эксперимента.

Впервые проведено определение САОА индивидуальных веществ, ряда лекарственных препаратов, объектов растительного происхождения и готовой косметической продукции методом вольтамперометрии.

Предложен способ оценки процессов релаксации оксигенированных инфузионных растворов для их более эффективного использования в лечении острой гипоксии.

Практическая значимость.

Способ определения константы скорости последующей химической реакции взаимодействия АО с активными кислородными радикалами.

Новый метод аналитического контроля САОА различных объектов с помощью катодной вольтамперометрии, отличающийся высокой чувствительностью, простотой исполнения, экспрессностью и универсальностью.

Количественные критерии САОА: концентрационный, отражающий эффективную концентрацию АО, и кинетический, отражающий количество кислородных радикалов, прореагировавших с АО во времени.

Оценка САОА индивидуальных веществ, лекарственных препаратов, объектов растительного происхождения, косметической продукции. Определены оптимальные условия применения исследованных объектов.

На защиту выносятся:

1. Количественные критерии определения САОА различных объектов.
2. Результаты определения САОА ряда индивидуальных веществ, лекарственных препаратов, объектов растительного происхождения, косметической продукции.
3. Результаты исследований кислородной емкости ряда инфузионных растворов, применяемых для лечения гипоксических состояний.
4. Способ определения константы скорости последующей химической реакции взаимодействия АО с активными кислородными радикалами.

Апробация работы. Основные результаты работы представлены в устных докладах на VI Международной конференции “Биоантиоксидант” (Москва, 2002); Региональной научно-практической конференции “Химия и технология лекарственных препаратов и полупродуктов” (Новокузнецк, 2002) и стендовых докладах на XII International Conference “EuroFoodChem” (Brugge, 2003); 3th International Conference “Instrumental Methods of Analysis” (Thessaloniki, 2003); 15th International Symposium “Pharmaceutical and Biomedical Analysis” (Florence, 2004); III Всероссийской научной конференции “Химия и химическая технология на рубеже тысячелетий” (Томск, 2004); VII Всероссийской научной конференции “Аналитика Сибири и Дальнего Востока” (Новосибирск, 2004); Всероссийской научной конференции с международным участием “Электроаналитика 2005” (Екатеринбург, 2005); Международной научной конференции “Химия, химическая технология и биотехнология на рубеже тысячелетий” (Томск, 2006).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 статей и 9 тезисов докладов.

Диссертация выполнена при поддержке гранта Минобразования РФ № 12.58.2004 “Разработка методики и создание макета вольтамперометрического комплекса определения антиоксидантной активности объектов”; ведомственной научной программы “Развитие научного потенциала высшей школы”: проект № 5.21.2005 “Создание комплекса по определению суммарной антиоксидантной активности биологических объектов” и проект № 5.31.2005 “Исследование связи антиоксидантных, электрохимических и квантово-химических свойств ряда лекарственных препаратов и ферментов, их теоретическое обоснование”.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, обсуждения результатов, выводов, списка литературы из 207 наименований и приложения. Содержит 176 страниц, 15 таблиц, 27 рисунков.

Во введении раскрыта актуальность темы, определены цель и задачи исследования, сформулированы научная новизна и практическая значимость работы.

В первой главе приведен литературный обзор, характеризующий современное состояние теории и практики процесса ЭВ O_2 , его кинетических и физико-химических закономерностей. Рассмотрены общие вопросы процесса восстановления кислорода в биологических мембранах. Описаны способы определения САОА.

Во второй главе рассмотрены теоретические закономерности процесса ЭВ O_2 в присутствии АО в условиях нестационарной диффузии на электродах ограниченного объема. Обоснованы количественные критерии оценки САОА объектов.

В третьей главе описаны условия эксперимента, способы приготовления растворов и электродов, представлены данные об используемом оборудовании и объектах исследования.

В четвертой главе рассмотрены особенности процесса ЭВ O_2 в присутствии индивидуальных АО в водных средах.

В пятой главе описано применение установленных закономерностей процесса ЭВ O_2 в аналитических целях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследования проводили на полярографе ПУ-1 с двухкоординатным самописцем ЛКД – 4 и вольтамперометрическом анализаторе ТА-2 в комплекте с ПК. В работе использовали метод катодной вольтамперометрии, в качестве модельной реакции рассматривали процесс ЭВ O_2 , который идентичен восстановлению кислорода в клетках и тканях организма. Для оценки влияния исследуемых веществ рассматривали зависимости предельного тока первой волны ЭВ O_2 от концентрации их в объеме раствора и от времени протекания процесса ЭВ O_2 в их присутствии.

Вольтамперограммы исследуемых растворов регистрировали на стационарных электродах с линейной разверткой потенциала со скоростью 20 мВ/с. Для измерений использовали индикаторный ртутнопленочный электрод (РПЭ). В качестве электрода сравнения применяли хлоридсеребряный электрод. Вспомогательным электродом служил стеклоуглеродный электрод.

Концентрацию кислорода в растворах электролитов контролировали при помощи потенциометрического кислородного датчика № 5972 «МЕРА-ЭЛЬВРО». рН растворов измеряли при помощи лабораторного рН-метра-150М с электродом ЭСКЛ-08М и автоматическим термокомпенсатором ТКА-8М.

В качестве растворителя использовали воду, очищенную двойной перегонкой. Для приготовления водных фоновых растворов с заданным значением рН использовали набор стандарт-титров. В большинстве случаев

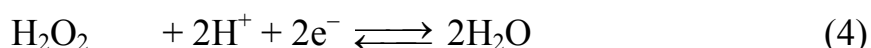
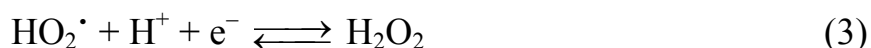
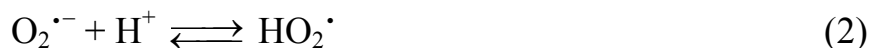
применяли фосфатный буфер с рН 6.86 (0.025М КН₂РO₄, 0.025М Na₂НРO₄). В работе использовали реактивы и индивидуальные вещества марок х.ч. и о.с.ч., органические растворители этиловый спирт и диметилформамид (ДМФА).

Объектами лекарственного растительного сырья служили сухие экстракты различных растений флоры Сибири. В качестве косметических средств исследовали крем, гель и тоник. Оксигенация инфузионных растворов осуществлялась путем насыщения кислородом под давлением 5 атм.

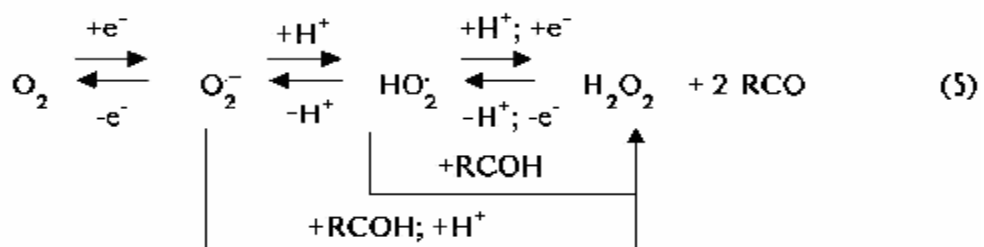
ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Закономерности процесса электровосстановления кислорода в присутствии антиоксидантов в водных средах

Известно, что процесс ЭВ O₂ на РПЭ является квазиобратимым и протекает в несколько стадий (1)-(4). Лимитирующими в протонных средах являются объединенные стадии (1) и (2):

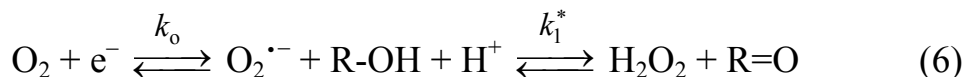


В данной работе рассматривали первую волну ЭВ O₂ (1)-(3). АО, легко и быстро вступающие во взаимодействие с активными кислородными радикалами, согласно (5), влияют на кинетику процесса ЭВ O₂:



Для большинства АО наблюдаются уменьшение тока ЭВ O₂ и сдвиг потенциала предельного тока ЭВ O₂ в положительную область. По-видимому, это связано с взаимодействием АО с продуктами восстановления кислорода, что облегчает данный процесс.

ЭВ O₂ – сложный, многостадийный процесс, причем реализация каждой стадии, ее обратимость, кинетические параметры зависят от ряда факторов. Поэтому в данном случае рассматривали лишь замедленную стадию катодного восстановления кислорода и упрощенную схему электродного процесса ЭВ O₂ для средних значений рН: 3 < рН < 10 в водных средах (6):



Предполагаемый механизм, ЕС, включает последующую химическую реакцию взаимодействия АО с активными кислородными радикалами.

Для оценки кинетических параметров процесса ЭВ O_2 в присутствии АО была решена краевая задача, с учетом последующей химической реакции имеющая вид:

$$\frac{\partial C_{O_2}(x,t)}{\partial t} = D_{O_2} \frac{\partial^2 C_{O_2}(x,t)}{\partial x^2} \quad 0 \leq x \leq \infty \quad (7)$$

$$\frac{\partial C_{O_2^{\cdot-}}(x,t)}{\partial t} = D_{O_2^{\cdot-}} \frac{\partial^2 C_{O_2^{\cdot-}}(x,t)}{\partial x^2} \quad 0 \leq x \leq \infty \quad (8)$$

$$\text{При } t = 0, \quad x \geq 0, \quad C_{O_2}^s(x,0) = C_{O_2}^0; \quad C_{O_2^{\cdot-}}(x,0) = 0 \quad (9)$$

$$\text{При } t > 0, \quad x \rightarrow \infty, \quad C_{O_2}^s(\infty, t) = C_{O_2}^0 \quad (10)$$

$$D_{O_2} \frac{\partial C_{O_2}(x,t)}{\partial x} \Big|_{x=0} = k_0 C_{O_2}^s(x,t) \quad (11)$$

$$D_{O_2} \frac{\partial C_{O_2}(x,t)}{\partial x} \Big|_{x=0} = -D_{O_2^{\cdot-}} \frac{\partial C_{O_2^{\cdot-}}(x,t)}{\partial x} \Big|_{x=0} \quad (12)$$

Условие (9) означает, что анион-радикал кислорода $O_2^{\cdot-}$ генерируется в данном случае только в результате электрохимической реакции. Предполагается, что исходная концентрация АО должна быть таковой, что ее изменениями в зависимости от расстояния от поверхности электрода можно пренебречь.

При решении краевой задачи получены следующие уравнения для тока на электрод в отсутствие и присутствии АО, соответственно:

$$I_0 = zFSk_0 \cdot C_{O_2}^0 \cdot \xi \left(\frac{k_0 \sqrt{t}}{\sqrt{D_{O_2}}} \right) \quad (13)$$

$$I = zFS C_{O_2}^0 \cdot \xi \left(\frac{k_0 \sqrt{t}}{\sqrt{D_{O_2}}} \right) \cdot \left[k_0 + k_1^* \sqrt{\frac{D_{O_2^{\cdot-}}}{D_{O_2}}} - k_1^* \sqrt{\frac{D_{O_2^{\cdot-}}}{D_{O_2}}} \frac{1}{\xi \left(\frac{k_0 \sqrt{t}}{\sqrt{D_{O_2}}} \right)} \right] \quad (14)$$

$$k_1^* = k_1 \cdot C_{\text{РОН}}^0 \quad (15)$$

где z – количество электронов; F – постоянная Фарадея, Кл; S – площадь электрода, см^2 ; D – коэффициенты диффузии, $\text{см}^2/\text{с}$; $C_{O_2}^0$ – концентрация O_2 в отсутствие АО, $\text{моль}/\text{см}^3$; $C_{\text{РОН}}^0$ – концентрация АО, $\text{моль}/\text{см}^3$; t – время, с; k_0 – константа скорости лимитирующей стадии процесса ЭВ O_2 , $\text{см}/\text{с}$; k_1^* – константа скорости последующей химической реакции взаимодействия АО с активными кислородными радикалами, с^{-1} .

В данном случае целесообразнее рассмотреть ряд предельных случаев:

1) При $t \rightarrow 0$ $\xi\left(\frac{k_0\sqrt{t}}{\sqrt{D_{O_2}}}\right) \rightarrow 1$. При $\left(\frac{k_0\sqrt{t}}{\sqrt{D_{O_2}}}\right) \leq 0.05$ функция $\xi\left(\frac{k_0\sqrt{t}}{\sqrt{D_{O_2}}}\right) \rightarrow 1$, и с ошибкой

менее 5 % ее можно принять равной 1. Тогда выражение (13) приводится к виду, полученному ранее в работах Карбаинова Ю.А. и Коротковой Е.И.:

$$I_0 = zFSk_0C^o_{O_2} \quad (16)$$

Это предельное состояние соответствует максимальному значению тока на электрод, которое можно использовать для оценки константы скорости замедленной стадии процесса ЭВ O_2 в условиях нестационарной диффузии на электродах ограниченного объема в протонных средах в отсутствие АО в растворе (k_0).

2) С ростом t функция $\xi\left(\frac{k_0\sqrt{t}}{\sqrt{D_{O_2}}}\right)$ уменьшается, в пределе она стремится к нулю. При значениях $\left(\frac{k_0\sqrt{t}}{\sqrt{D_{O_2}}}\right) \geq 3.16$, с ошибкой менее 5 %, можно принять

$\xi\left(\frac{k_0\sqrt{t}}{\sqrt{D_{O_2}}}\right) = \frac{\sqrt{D_{O_2}}}{k_0\sqrt{t}\sqrt{\pi}}$ и, учитывая $\sqrt{\frac{D_{O_2}}{D_{O_2}}} \approx 1$, выражение для тока на электрод в присутствии АО будет выглядеть следующим образом:

$$I = zFS C^o_{O_2} \cdot \left(\frac{\sqrt{D_{O_2}}}{k_0\sqrt{\pi}\sqrt{t}}\right) \cdot \left[k_0 + k_1^* - k_1^* \frac{k_0\sqrt{\pi}\sqrt{t}}{\sqrt{D_{O_2}}}\right] \quad (17)$$

Зная константу скорости замедленной стадии процесса ЭВ O_2 в отсутствие АО (k_0), можно оценить значение константы скорости последующей химической реакции взаимодействия АО с активными кислородными радикалами (k_1^*).

Известно, что концентрация O_2 подвержена колебаниям в зависимости от температуры и давления окружающей среды. Поэтому в качестве аналитического сигнала целесообразнее использовать относительное изменение высоты предельного тока катодного восстановления кислорода. Тогда выражение в аналитическом виде для оценки константы скорости последующей химической реакции взаимодействия АО с активными кислородными радикалами (k_1^*) будет иметь следующий вид:

$$R = \frac{I}{I_0} = 1 - k_1^* \cdot \frac{\sqrt{\pi}\sqrt{t}}{\sqrt{D_{O_2}}} \quad (18)$$

Правильность предложенного механизма будет подтверждать линейный характер зависимости $\frac{I_i}{I_0} - f(\sqrt{t})$. Используя полученное уравнение, на

основании опытных данных из зависимости $\frac{I_i}{I_0} - f(\sqrt{t})$ были определены значения констант скорости последующей химической реакции взаимодействия ряда веществ с активными кислородными радикалами (табл. 1).

Константы скорости последующей химической реакции АО
с активными кислородными радикалами ($n=5$, $p=0.95$)

Название	k_1^* , c^{-1}
Аскорбиновая кислота	$(1.38 \pm 0.05) \cdot 10^{-5}$
Аскорбат лития	$(1.72 \pm 0.04) \cdot 10^{-5}$
Аскорбат кальция	$(0.76 \pm 0.03) \cdot 10^{-5}$
Сорбиновая кислота	$(1.61 \pm 0.06) \cdot 10^{-5}$
Бензойная кислота	$(0.68 \pm 0.04) \cdot 10^{-5}$
4-гидроксibenзойная кислота	$(0.98 \pm 0.05) \cdot 10^{-5}$
Метилловый эфир 4-гидроксibenзойной кислоты	$(0.85 \pm 0.09) \cdot 10^{-5}$
Этиловый эфир 4-гидроксibenзойной кислоты	$(0.99 \pm 0.06) \cdot 10^{-5}$
Пропиловый эфир 4-гидроксibenзойной кислоты	$(1.21 \pm 0.13) \cdot 10^{-5}$
Бутиловый эфир 4-гидроксibenзойной кислоты	$(1.43 \pm 0.14) \cdot 10^{-5}$

Прямолинейный характер зависимости $\frac{I_i}{I_0} - f(\sqrt{t})$ на РПЭ в фоновом электролите (рис. 1) подтверждает правильность исходных предположений и теоретических выводов для процесса ЭВ O_2 , осложненного присутствием АО.

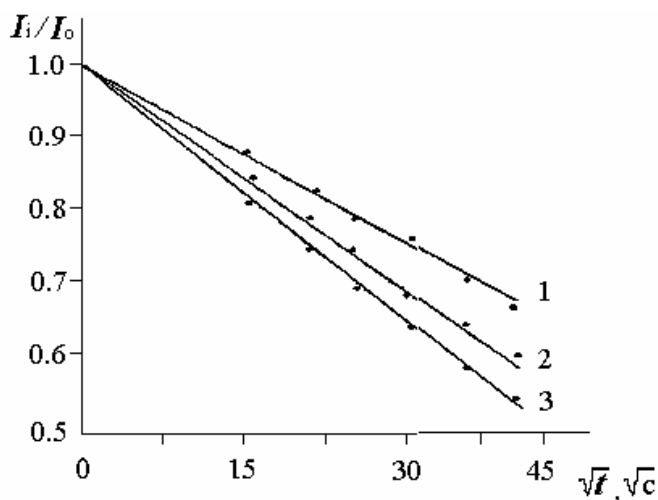


Рис. 1. Зависимость относительного изменения тока ЭВ O_2 от времени протекания процесса в фоновом электролите в присутствии 0.5 мг/мл: аскорбата кальция (1), аскорбиновой кислоты (2) и аскорбата лития (3). РПЭ, фосфатный буфер pH 6.86 (0.025M KH_2PO_4 , 0.025M Na_2HPO_4), $W = 20$ мВ/с

Определение оптимальных условий для оценки антиоксидантной активности с использованием методов планирования эксперимента

Из полученного выражения (18), позволяющего экспериментально обосновать механизм процесса ЭВ O_2 в присутствии АО, очевидно, что АОА зависит как от концентрации АО, так и от времени протекания процесса. Поэтому для оценки оптимальных условий действия АО в данной работе использовали методы планирования эксперимента.

Для получения математической модели процесса ЭВ O_2 в присутствии АО, оценки ее адекватности и оценки значимости коэффициентов полученного уравнения регрессии использовали полный факторный эксперимент.

Варьируемыми факторами служили концентрация АО и время его взаимодействия с активными кислородными радикалами. В качестве функции отклика использовали относительное изменение тока ЭВ O_2 . Для всех исследуемых веществ получено, что модель адекватно описывает процесс, эффект взаимодействия факторов не значим, все коэффициенты линейной модели значимы и имеют знак плюс, что означает увеличение критериев оптимизации с увеличением значений обоих факторов. Следует отметить, что наибольшее влияние оказывает второй фактор - время взаимодействия АО с активными кислородными формами.

Получены следующие уравнения математической модели для исследованных АО с учетом значимости коэффициентов:

Аскорбиновая кислота $Y = 0.158 + 0.073 X_1 + 0.083 X_2$ (19)

Аскорбат лития $Y = 0.140 + 0.045 X_1 + 0.099 X_2$ (20)

Аскорбат кальция $Y = 0.083 + 0.023 X_1 + 0.038 X_2$ (21)

Сорбиновая кислота $Y = 0.089 + 0.028 X_1 + 0.062 X_2$ (22)

Бензойная кислота $Y = 0.054 + 0.003 X_1 + 0.033 X_2$ (23)

4-гидроксibenзойная кислота $Y = 0.061 + 0.018 X_1 + 0.025 X_2$ (24)

Метилловый эфир 4-гидроксibenзойной кислоты $Y = 0.077 + 0.008 X_1 + 0.046 X_2$ (25)

Этиловый эфир 4-гидроксibenзойной кислоты $Y = 0.074 + 0.022 X_1 + 0.051 X_2$ (26)

Пропиловый эфир 4-гидроксibenзойной кислоты $Y = 0.061 + 0.017 X_1 + 0.057 X_2$ (27)

Бутиловый эфир 4-гидроксibenзойной кислоты $Y = 0.068 + 0.017 X_1 + 0.057 X_2$ (28)

Для нахождения точки оптимума был реализован метод крутого восхождения (метод Бокса–Уилсона). Для всех исследуемых веществ получены двухфакторные поверхности отклика с типом «стационарное возвышение» – плавное возрастание функции отклика при изменении факторов. При таком типе поверхности отклика максимум не наблюдается (рис. 2).

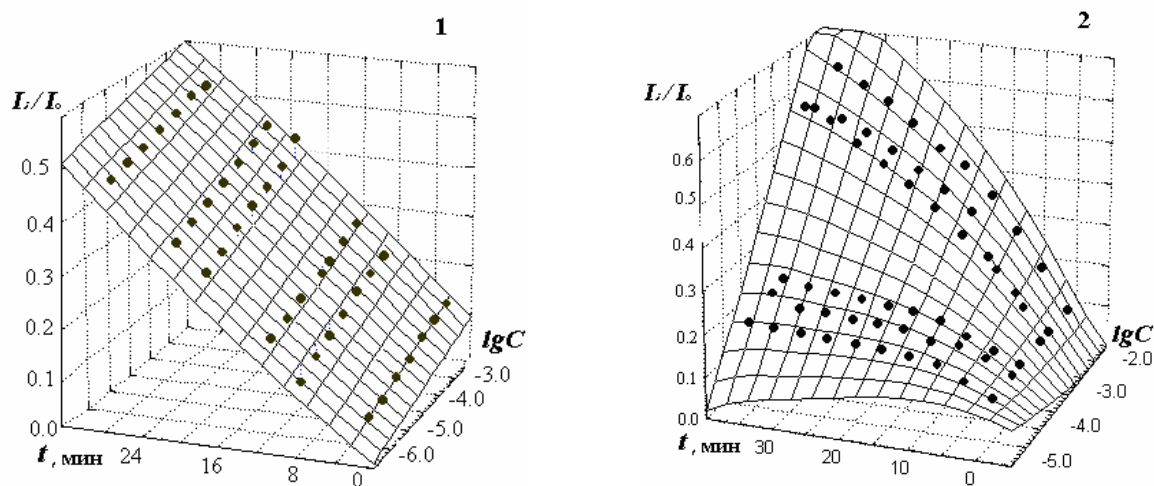


Рис. 2. Двухфакторные поверхности отклика исследуемых АО: аскорбиновая кислота (1) и бензойная кислота (2).

На основании полученных результатов, согласно методике определения АОА вольтамперометрическим методом, исходя из практических соображений, было предложено два эмпирических критерия оценки АОА. Концентрационный критерий отражает степень изменения концентрации кислорода и его активных радикалов в зависимости от концентрации АО в растворе (29); кинетический критерий отражает количество активных кислородных радикалов, прореагировавших с АО (или суммарным содержанием АО) во времени (30):

$$K_{\text{конц}} = \frac{I_i}{I_o} \cdot \frac{1}{C_{\text{АО}}} \quad (29)$$

где I_i -ток ЭВ O_2 в присутствии АО в растворе, мкА; I_o -ток ЭВ O_2 в отсутствие АО в растворе, мкА; $C_{\text{АО}}$ - концентрация АО, г/мл.

$$K_{\text{кинет}} = \left(1 - \frac{I_i}{I_o}\right) \cdot \frac{C_{O_2}^o}{t} \quad (30)$$

где I_i -ток ЭВ O_2 в присутствии АО в растворе, мкА, I_o -ток ЭВ O_2 в отсутствие АО в растворе, мкА; $C_{O_2}^o$ - исходная концентрация O_2 в растворе, мкмоль/л; t -время протекания реакции взаимодействия АО с активными кислородными радикалами, мин.

Определение антиоксидантной активности индивидуальных веществ

Исследовали АОА аскорбиновой кислоты, металлокомплексов с аскорбиновой кислотой, используемых в клинической практике, и органических соединений, применяемых в качестве консервантов в пищевой и косметической промышленности.

На рис.3 и 4 (на примере аскорбата лития) представлены вольтамперограммы предельного тока ЭВ O_2 в зависимости от концентрации АО в объеме раствора и от времени взаимодействия АО с активными кислородными радикалами, соответственно. Аналогичные зависимости были получены для всего ряда исследуемых веществ.

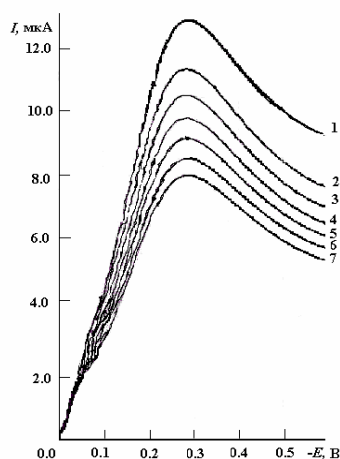


Рис. 3. Вольтамперограммы тока ЭВ O_2 на РПЭ в фосфатном буфере с pH 6.86 (0.025M KH_2PO_4 , 0.025M Na_2HPO_4), $W=20$ мВ/с в отсутствие (1) и в присутствии аскорбата лития: 0.1 мг/мл (2); 0.3 мг/мл (3); 0.5 мг/мл (4); 0.7 мг/мл (5); 0.9 мг/мл (6); 1.1 мг/мл (7).

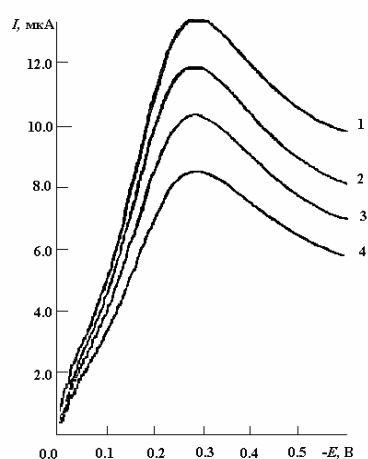


Рис. 4. Вольтамперограммы тока ЭВ O_2 на РПЭ в фосфатном буфере с pH 6.86 (0.025M KH_2PO_4 , 0.025M Na_2HPO_4), $W=20$ мВ/с. в отсутствие (1) и в присутствии 0.5 мг/мл аскорбата лития: при t : 10 мин (2), 20 мин (3), 30 мин (4).

Значительное уменьшение тока ЭВ O₂ при увеличении концентрации исследуемых веществ и времени протекания процесса свидетельствует об их высокой АОА. На основе полученных данных построены зависимости: $(\frac{I_i}{I_0}) - f(C_{AO})$ и $(1 - \frac{I_i}{I_0}) - f(t)$ (рис. 5, рис. 6).

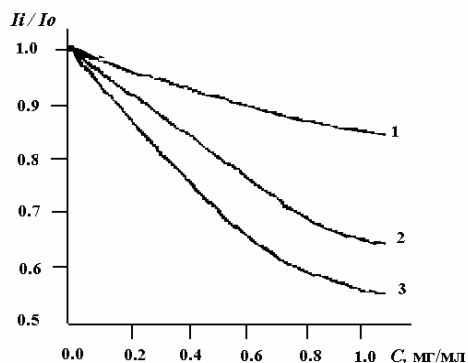


Рис. 5. Зависимость относительного изменения тока ЭВ O₂ от концентрации исследуемых образцов в фоновом электролите: аскорбат кальция (1); аскорбат лития (2); аскорбиновая кислота (3)

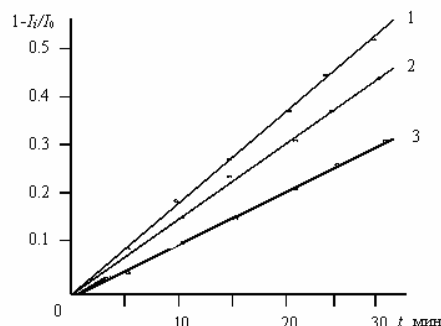


Рис. 6. Зависимость относительного изменения тока ЭВ O₂ от времени протекания процесса в фоновом электролите в присутствии 0.5 мг/мл: аскорбата лития (1); аскорбиновой кислоты (2) и аскорбата кальция (3)

В табл. 2 приведены значения коэффициентов АОА исследуемых веществ: концентрационный критерий, $K_{конц}$, и кинетический критерий, $K_{кинет}$, рассчитывались по уравнениям (29) и (30), соответственно.

Таблица 2
Коэффициенты антиоксидантной активности исследуемых веществ (n=5, p=0.95)

Название	$K_{конц}$, мг/г	$K_{кинет}$, мкмоль/л·мин
Аскорбиновая кислота	137.8±5.1	1.15±0.10
Аскорбат лития	63.4±3.2	1.25±0.14
Аскорбат кальция	16.7±1.0	0.58±0.04
Сорбиновая кислота	15.3±0.4	1.49±0.09
Бензойная кислота	7.5±0.2	0.73±0.06
4-гидроксibenзойная кислота	34.2±0.9	1.09±0.08
Метилловый эфир 4-гидроксibenзойной кислоты	15.3±0.6	1.01±0.08
Этиловый эфир 4-гидроксibenзойной кислоты	44.4±1.1	1.08±0.07
Пропиловый эфир 4-гидроксibenзойной кислоты	77.9±3.9	1.31±0.09
Бутиловый эфир 4-гидроксibenзойной кислоты	98.1±3.7	1.43±0.07

Наблюдается корреляция между концентрационным и кинетическим критериями. Так же хорошо согласуются результаты определения АОА исследуемых веществ со значениями констант скорости последующей химической реакции АО с активными кислородными радикалами.

Данные по АОА металлокомплексов аскорбиновой кислоты хорошо согласуются с результатами исследования токсичности данных препаратов на мышах линии BALB/c при их внутрибрюшинном введении (100, 500 и

1000 мг/кг). Показано, что аскорбаты металлов в изученном спектре доз не обладают побочным токсичным действием, в отличие от фармакопейных препаратов лития и кальция. По-видимому, это связано с наличием АОА у исследованных аскорбатов металлов.

Данные по АОА исследуемых консервантов хорошо согласуются с результатами исследования липофильности и объясняются их структурными особенностями, влиянием электронных эффектов на кислотно-основные свойства. Так, для сложных эфиров 4-гидроксибензойной кислоты коэффициенты АОА возрастают с увеличением длины алифатического радикала сложноэфирной группы. Предполагается, что это происходит благодаря протонизации кислородного атома карбонильной группы и депротонизации фенольного гидроксила. Объясняя этот факт, мы предполагаем, что чем длиннее алифатическая цепь сложного эфира, тем сильнее ее положительный индуктивный эффект. Электронная плотность кислорода карбонильной группы увеличивается, и в этом случае происходит более прочная координация протона. С другой стороны, связь протона с атомом кислорода в гидроксильной группе ослабевает, что приводит к депротонизации.

Влияния различных факторов на суммарную антиоксидантную активность исследуемых объектов

Установленные закономерности процесса ЭВ O_2 в присутствии АО, в условиях нестационарной диффузии на электродах ограниченного объема позволяют более оптимально использовать данный процесс в аналитических целях.

Первое. Влияние рН раствора на АОА лекарственного препарата токоферола моноглюкозида (ТМГ) – водорастворимой формы α -токоферола.

В Японии был синтезирован аналог α -токоферола, токоферол моноглюкозид (рис. 7). Известно, что он имеет высокую растворимость в воде, и его антирадикальная активность не уступает α -токоферолу. Однако информация о влиянии рН на антиоксидантные свойства препарата оказалась весьма противоречивой.

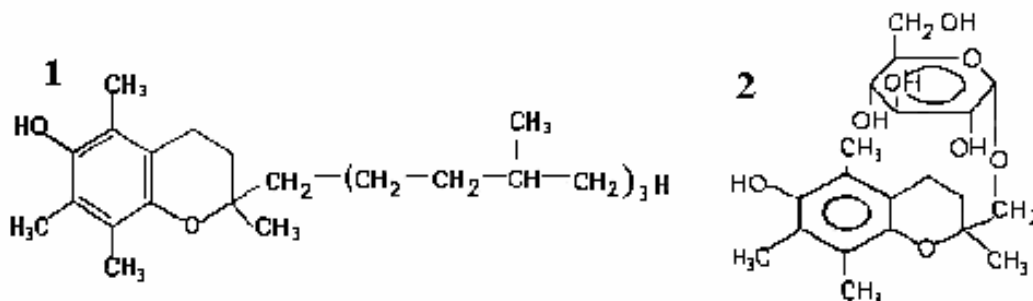


Рис. 7. Структурная формула α -токоферола (1) и токоферола моноглюкозида (2).

В связи с этим рассматривалась АОА препарата ТМГ в зависимости от рН раствора. Наблюдается неоднозначное влияние ТМГ на процесс ЭВ O_2 в растворах с различным значением рН (рис. 8). При добавлении исследуемого

препарата в растворы с $pH < 5.5$ наблюдалось увеличение, а в растворы с $pH > 5.5$ уменьшение величины катодного тока ЭВ O_2 . Наибольшая АОА препарата ТМГ наблюдалась в растворах с $pH 6 \div 8$.

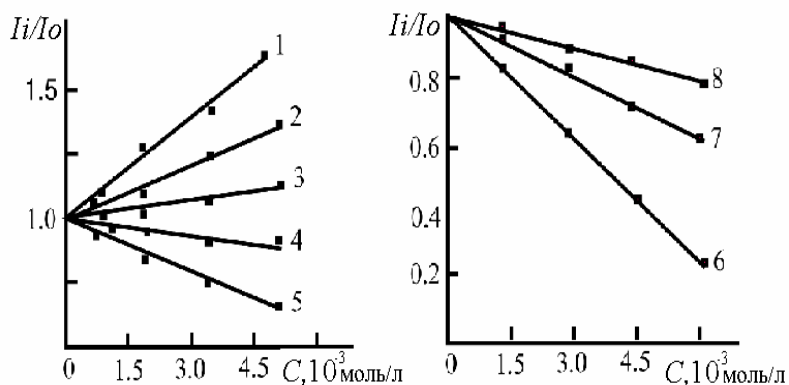


Рис.8. Зависимость относительного тока ЭВ O_2 от изменения тока ЭВ O_2 от концентрации ТМГ в растворах с различными значениями pH : 2.2 (1), 3.2 (2), 4.2 (3), 5.5 (4), 6.8 (5), 7.3 (6), 8.5 (7), 9.1 (8)

Предполагается, что это обусловлено стабильностью ТМГ фенольного гидроксила в нейтральной среде. В кислой среде диссоциация гидроксильной группы молекулы ТМГ затруднена. В щелочной среде наблюдается уменьшение АОА вследствие полной диссоциации гидроксильной группы молекулы ТМГ. Исследования АОА ТМГ хорошо согласуются с результатами испытаний на животных. Отмечено, что при введении препарата с пищей перорально предполагаемой защиты от радиационного воздействия не наблюдалось, животные погибали. А при внутривенном введении защитные действия препарата были максимальны, и животные выживали после смертельной дозы радиации.

Второе. Влияние экстрагента на САОА лекарственного растительного сырья.

Объектами исследований служили сухие экстракты из различных лекарственных растений флоры Сибири. Все изученные образцы в большей или меньшей степени проявили САОА (рис. 9). Сравнительный анализ 30 % и 70 % растворов водно-спиртовых экстрактов не выявил определенных закономерностей. По-видимому, это обусловлено сложным составом исследуемых образцов и извлечением разных БАВ спиртовыми экстрагентами.

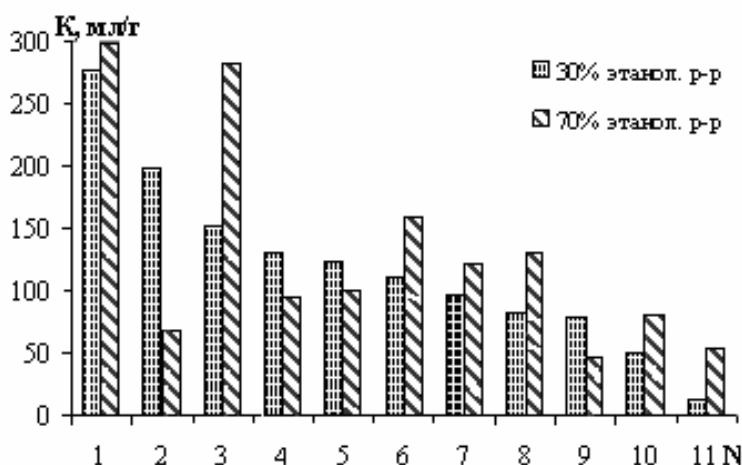


Рис. 9. Сравнительная диаграмма САОА исследуемых растительных объектов: 1-лист брусники, 2-злаки овса посевного, 3-корни полыни обыкновенной, 4-трава репешка обыкновенного, 5-злаки ячменя обыкновенного, 6-трава княжика сибирского, 7-трава чертополоха, 8-хвоя сосны обыкновенной, 9-цветы тысячелистника обыкновенного, 10-плоды рябины сибирской, 11-соплодия ольхи

Установлено, что ряд экстрактов обладают САОА превышающей известные АО: аскорбиновую кислоту ($K=137.8$ мл/г) и дигидрокверцетин ($K=257.8$ мл/г). Среди изученных образцов можно выделить лист брусники, корни полыни обыкновенной, злаки ячменя обыкновенного, трава княжика сибирского, трава чертополоха, которые имеют высокую САОА, поэтому их можно рекомендовать в качестве фитопрепаратов антиоксидантного действия.

Проведено определение САОА суммарных экстрактов, полученных из побегов багульника болотного, цветов клевера лугового, коры калины обыкновенной и пырея ползучего (табл. 3). Следует отметить, что 40 % и 70% растворы водно-спиртовых экстрактов проявляют большую САОА по сравнению с водными извлечениями. Очевидно, это обусловлено тем, что спиртовые экстрагенты извлекают БАВ наиболее полно из растительного сырья.

Поскольку суммарные экстракты представляют собой сложную многокомпонентную смесь веществ, часть из которых может не проявлять антиоксидантных свойств, была проведена последовательная экстракция из одной сухой навески сырья с переходом от неполярного к более полярному растворителю (хлороформ, этилацетат, бутанол). Разделение проводилось с целью получения фракции, проявляющей максимальную антиоксидантную активность (табл. 4).

Таблица 3

Коэффициенты суммарной антиоксидантной активности экстрактов растительного сырья ($n=5$, $p=0.95$)

Название	70% эт. р-р	40% эт. р-р	Водн. р-р
	К, мл/г	К, мл/г	К, мл/г
побеги багульника болотного	341.9±29.8	347.2±25.9	186.5±7.0
цветы клевера лугового	58.5±3.6	57.8±3.6	54.6±2.7
кора калины обыкновенной	281.5±24.5	151.7±15.1	93.2±3.5
корни пырея ползучего	192.4±7.2	123.6±6.1	62.1±2.3

Таблица 4

Коэффициенты суммарной антиоксидантной активности отдельных фракций экстрактов растительного сырья ($n=5$, $p=0.95$)

Название	хлороф. фр.	этилацет. фр.	бутан. фр.	водн. ост.
	К, мл/г	К, мл/г	К, мл/г	К, мл/г
побеги багульника болотного	144.5±19.8	542.4±40.5	332.6±12.4	151.3±7.5
цветы клевера лугового	78.9±2.9	524.2±45.6	254.6±9.5	206.7±10.3
кора калины обыкновенной	99.3±3.7	529.1±46.0	297.8±11.1	142.1±8.8
корни пырея ползучего	125.4±6.2	229.1±14.2	187.4±9.3	131.3±4.9

Известно, что агликоны флавоноидов наиболее полно экстрагируются этилацетатом, этим и обусловлено проявление наиболее высокой САОА этилацетатной фракции. Бутанол, как более полярный растворитель по сравнению с этилацетатом, избирательно экстрагирует гликозиды флавоноидов, обладающие меньшей АОА по сравнению с агликонами. Высокие значения

коэффициентов САОА хлороформной фракции обусловлены наличием кумаринов, которые также обладают хорошими антиоксидантными свойствами.

Третье. Влияние различных композиций БАВ на качество косметической продукции.

В косметике, основным предназначением которой является защита кожного покрова, широко используются природные и синтетические антиоксидантные системы – от индивидуальных веществ, до сложных природных композиций. Однако для более эффективной работы косметических средств необходимо соблюдать определенный баланс используемых веществ.

В исследуемую косметическую продукцию были введены экстракты лекарственных растений - люцерны, солодки, клевера и хмеля. Была определена САОА смесей, содержащих экстракты различного состава (табл. 5). Были выбраны наиболее эффективные композиции для повышения качества косметических средств, увеличения их срока годности, а также сохранения противовоспалительных и бактериостатических свойств. Проведена оценка антиоксидантной эффективности готовой косметической продукции (табл. 6).

Таблица 5

Коэффициенты суммарной антиоксидантной активности водно-спиртовых экстрактов растительных объектов (n=5, p=0.95)

Название	I	II	III
	K, мл/г	K, мл/г	K, мл/г
солодка гладкая	58.94±2.2	48.13±1.8	13.60±0.7
люцерна	42.60±1.6	15.24±0.6	11.66±0.6
клевер луговой	72.02±2.7	76.92±2.9	31.75±1.6
хмель дикорастущий	36.94±1.4	119.30±5.9	86.6±3.2

Примечание. Состав растительных экстрактов : I - 2.3 % солодки, 1.2 % люцерны и клевера, 0.6 % хмеля; II - 1.2 % солодки, 0.6 % люцерны и клевера, 0.3 % хмеля; III - 0.6 % солодки, 0.3 % люцерны и клевера, 0.1 % хмеля.

Таблица 6

Коэффициенты суммарной антиоксидантной активности косметической продукции (n=5, p=0.95)

Название	I	II	III
	K, мл/г	K, мл/г	K, мл/г
тоник	89.88±4.5	79.66±3.0	75.44±4.7
крем:			
без экстрактов	15.56±1.0	12.11±0.6	12.11±0.6
с экстрактами	90.69±4.5	92.70±5.8	88.43±3.3
гель:			
без экстрактов	2.76±0.2	2.06±0.1	1.87±0.1
с экстрактами	49.80±2.5	50.64±3.1	44.06±2.2

I-исходный продукт; II-разбавление в два раза; III-разбавление в три раза

Разбавление тоника показало небольшое ухудшение результатов, т.е. наиболее эффективные сочетания компонентов наблюдаются в исходном препарате. Гель и крем с экстрактами оказались более эффективными в

разбавленном в два раза состоянии. Это подтверждают исследования экстрактов клевера и хмеля. Уменьшение их концентрации в два раза в продукции, очевидно, приведет к наилучшим результатам. Крем и гель без экстрактов также показали небольшую САОА. По-видимому, это связано с антиоксидантной активностью основных компонентов продукции.

Четвертое. Сравнительная характеристика оксигенированных инфузионных растворов.

Все большее распространение в практическом здравоохранении получает внутривенная гемоксигенация при затруднении внутрилегочного газообмена. Перед инфузией оксигенированного раствора необходима декомпрессия с целью профилактики газовой эмболии. Была изучена кислородная емкость нескольких инфузионных растворов, применяемых для лечения гипоксических состояний (рис. 10).

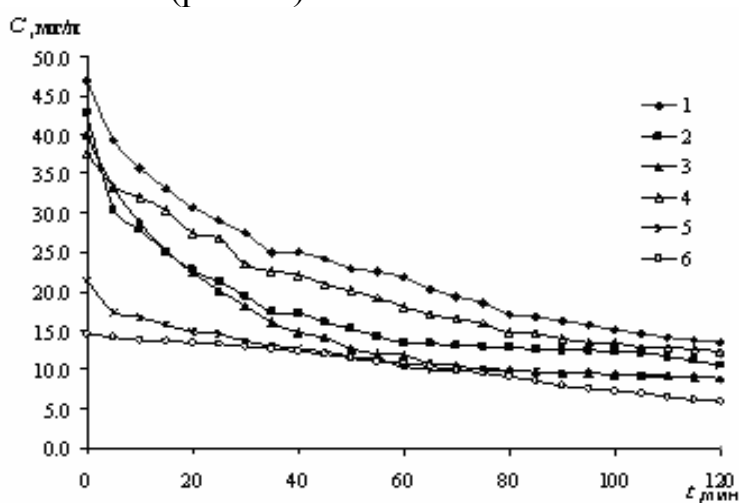


Рис. 10. Зависимость концентрации кислорода в оксигенированных растворах после декомпрессии от времени: (1) физиологический раствор; (2) раствор полиглюкина; (3) раствор реамберина; (4) раствор стабизола; (5) раствор Рингера-Локка; (6) 10 % раствор глюкозы.

Показано, что процесс острой декомпрессии длится в течение 5-7 минут. Наибольшей кислородной емкостью обладает физиологический раствор. Раствор полиглюкина длительно задерживается в сосудистом русле, но значительно уступает противошоковому эффекту растворов стабизола и реамберина. Гипероксигенированный раствор реамберина обладает несколько большей емкостью по сравнению со стабизолом, но в процессе декомпрессии быстро отдает весь растворенный кислород, что имеет большое значение для купирования острой гипоксии при проведении реанимационных мероприятий. Для раствора стабизола процессы релаксации замедлены, что может быть использовано для лечения хронической гипоксии. Самую малую кислородную емкость и время релаксации имеют растворы Рингера-Локка и глюкозы.

Так как инфузионный раствор после приготовления в асептических условиях пригоден для внутривенного введения в течение 30 дней, исследовали кислородную емкость в указанных растворах, подвергнутых гипероксигенации, на протяжении данного периода времени. Показано, что физиологический раствор удерживает кислород в гипероксигенированном состоянии в максимальной концентрации до 30 дней. Характер отдачи кислорода остальными растворами остается прежним, что свидетельствует о стабильности физико-химических свойств гипероксигенированных растворов в течение исследуемого времени.

ВЫВОДЫ

1. Проведен теоретический анализ закономерностей процесса ЭВ O_2 в присутствии АО в условиях нестационарной диффузии на электродах ограниченного объема, и получено уравнение для тока O_2 на электрод в условиях смешанной кинетики в присутствии АО в растворе. Даны количественные критерии экспериментальной проверки теоретических выводов. Определены константы скорости последующей химической реакции взаимодействия АО с активными кислородными радикалами.

2. На основе проведенных теоретических и экспериментальных исследований разработан новый метод аналитического контроля САОА объектов с помощью катодной вольтамперометрии, отличающийся высокой чувствительностью, простотой исполнения, экспрессностью и универсальностью. Предложено два количественных критерия САОА: концентрационный, и кинетический.

3. Разработанный метод аналитического контроля зарекомендовал себя достаточно эффективным:

- в процессе определения АОА новых комплексов лития и кальция, содержащих в качестве биоактивного лиганда аскорбиновую кислоту. Исследования АОА аскорбатов металлов хорошо согласуется с результатами токсичности данных препаратов на животных.

- в процессе определение АОА широко используемых консервантов (сорбиновой кислоты, бензойной кислоты, 4-гидроксibenзойной кислоты и ее производных). Исследования АОА хорошо согласуется с результатами липофильности исследуемых веществ, и объясняются их структурными особенностями.

- в оценке влияния рН раствора на АОА препарата токоферола моноглюкозида – водорастворимого аналога α -токоферола. Установлен оптимальный диапазон рН раствора, при котором наблюдалась наибольшая АОА исследуемого препарата. Данные по АОА ТМГ хорошо согласуется с результатами испытаний на животных.

- в оценке САОА различных растений флоры Сибири. Показано, что спиртовые экстракты проявляют наиболее высокую САОА, по сравнению с водными извлечениями. Исследование отдельных фракций растительных экстрактов показало, что этилацетат является оптимальным экстрагентом, способным наиболее полно извлечь природные АО из растительного сырья.

- при анализе САОА водно-спиртовых экстрактов растительных объектов, входящих в состав косметических средств. Выбраны наиболее эффективные композиции для повышения качества косметических средств. Проведена оценка САОА готовой косметической продукции. Большая разница в САОА продукции без экстрактов и с экстрактами растений говорит об эффективной работе добавляемых экстрактов.

4. Исследованы процессы релаксации ряда оксигенированных инфузионных растворов по отношению к процессу ЭВ O_2 с целью расширения возможностей неотложной помощи при острой гипоксии.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Короткова Е.И., Карбаинов Ю.А., Аврамчик О.А. Новый вольтамперометрический способ определения активности антиоксидантов // Тез. докл. VI Международной конференции “Биоантиоксидант”. Москва. 2002. С.298-299.
2. Аврамчик О.А., Короткова Е.И., Карбаинов Ю.А., Шелковников В.В. Вольтамперометрическое определение антиоксидантной активности растительного лекарственного сырья // Тез. докл. Региональной научно-практической конференции “Химия и технология лекарственных препаратов и полупродуктов”. Новокузнецк. 2002. С.147-149.
3. Korotkova E.I., Karbainov Y.A., Avramchik O.A., Bakibaev A.A. New electrochemical sensor for antioxidant activity determination // Book of abstr. 3th International Conference "Instrumental Methods of Analysis". Thessaloniki. 2003. P.707-710.
4. Avramchik O.A., Korotkova E.I., Karbainov Y.A., Kostyrev K.M. Investigation of antioxidant properties of some foodstuff by voltammetry // Book of abstr. XII Int. Conf. “EuroFoodChem”. Brugge. 2003. P.199-202.
5. Korotkova E.I., Avramchik O.A., Karbainov Y.A., Bashkatova N.V. Investigation of antioxidant properties of some complex compounds of lithium // Book of abstr. 15th International Symposium “Pharmaceutical and Biomedical Analysis”. Florence. 2004. P.36.
6. Белоусов Е.В., Аврамчик О.А., Короткова Е.И., Белоусова Н.И., Дубоделов Е.Л. Сравнительная характеристика кислородной емкости гипероксигенированных инфузионных растворов // Тез. докл. III Всероссийской научной конференции “Химия и химическая технология на рубеже тысячелетий”. Томск. 2004. С.142.
7. Аврамчик О.А., Короткова Е.И., Плотников Е.В., Карбаинов Ю.А. Изучение антиоксидантной активности и токсичности аскорбатов лития // Тез. докл. VII Всероссийской научной конференции “Аналитика Сибири и Дальнего Востока”. Новосибирск. 2004. С.177.
8. Короткова Е.И., Аврамчик О.А. Определение антиоксидантной активности ряда консервантов методом вольтамперометрии // Тез. докл. Всероссийской научной конференции с международным участием “Электроаналитика 2005”. Екатеринбург. 2005. С.97.
9. Белоусов Е.В., Аврамчик О.А., Белоусова Н.И., Короткова Е.И., Огинский Д.В. Продолжительность удерживания кислорода в гипероксигенированных инфузионных растворах // Тез. докл. Международной научной конференции “Химия, химическая технология и биотехнология на рубеже тысячелетий”. Томск. 2006. С.24-26.
10. Короткова Е.И., Карбаинов Ю.А., Аврамчик О.А. Вольтамперометрическое определение антиоксидантной активности растительного сырья и некоторых продуктов питания // Изв. вузов. Химия и хим. технология. 2002. Т.45. № 3. С.110-112.

11. Korotkova E.I., Karbainov Y.A., Avramchik O.A. Investigation of antioxidant and catalytic properties of some biologically active substances by voltammetry // *Anal. Bioanal. Chem.* 2003. V.375. №3. P.465-468.
12. Белоусов Е.В., Дамбаев Г.Ц., Аврамчик О.А., Короткова Е.И., Белоусова Н.И., Куценко А.Э. Применение оксигенированных инфузионных растворов в лечении борльных бронхиальной астмой// *Бюллетень Сибирской медицины.* 2003. Т.2. №1. С.78-83.
13. Короткова Е.И., Аврамчик О.А., Юсубов М.С., Белоусов М.В., Андреева Т.И. Определение антиоксидантной активности экстрактов растительного сырья методом катодной вольтамперометрии // *Хим-фарм. журнал.* 2003. Т.37. №9. С.63-65.
14. Korotkova E.I., Avramchik O.A., Kagiya T., Karbainov Y.A., Tcherdyntseva N.V. Study of antioxidant properties of a water-soluble vitamin E derivative - Tocopherol monoglucoside (TMG) by differential pulse voltammetry // *Talanta.* 2004. V.63. №3. P.729-734.
15. Короткова Е.И., Аврамчик О.А., Каморзина И.Г., Карбаинов Ю.А., Лукина А.Н. Новый вольтамперометрический метод определения антиоксидантной активности косметической продукции // *Заводская лаборатория.* 2004. Т.70. №8. С.13-17.
16. Avramchik O.A., Korotkova E.I., Plotnikov E.V., Lukina A.N., Karbainov Y.A. Investigation of antioxidant properties of some complex compounds of lithium // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005. V.37. № P.1149–1154.
17. Korotkova E.I., Avramchik O.A., Angelov T.M., Karbainov Y.A. Investigation of antioxidant activity and lipophilicity parameters of some preservatives // *Electrochim. Acta.* 2005. V.51. № P.324–332.

Автор считает своим долгом выразить искреннюю признательность научному консультанту – к.х.н., доценту Коротковой Елене Ивановне за помощь при подготовке и написании диссертационной работы; а также д.х.н., зав кафедрой химии СибГМУ, профессору Юсубову Мехману Сулеймановичу; к.ф.н., ст. преподавателю кафедры фармацевтической химии с курсом токсикологической химии СибГМУ Шиловой Инессе Владимировне; к.ф.н., доценту ТВМИ Андреевой Тамаре Ивановне; д.б.н., доценту кафедры госпитальной хирургии с курсом онкологии СибГМУ Белоусову Евгению Валерьевичу, к.х.н., доценту кафедры химии СибГМУ Белоусовой Надежде Ивановне; д.б.н., зам. директора по науке НИИ Онкологии ТМЦ СО РАН д.б.н., профессору Чердынцевой Надежде Викторовне; сотруднику НИИ Фармакологии ТНЦ СО РАН Плотникову Владимиру Михайловичу; к.х.н., зам. директора по науке ЗАО «Компания Кора» Каморзиной Ирине Глебовне; научному сотруднику Department of Quality Control, Unipharm-JSCo Ангелову Трифону (Sofia, Bulgaria) за проявленный интерес к работе и плодотворное сотрудничество.