

На правах рукописи

Короткова Елена Ивановна

**Вольтамперометрический метод определения суммарной
активности антиоксидантов в объектах искусственного и
природного происхождения**

02.00.02 – аналитическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук

Томск 2009

Работа выполнена на кафедре физической и аналитической химии Томского политехнического университета

Научный консультант: доктор химических наук, профессор Ю. А. Карбаинов

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор Г. К. Будников

доктор химических наук, профессор А. В. Гунцов

доктор химических наук, профессор Г. М. Мокроусов

Ведущая организация: Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится «07» октября 2009г в 14.30 на заседании диссертационного совета Д 212.269.04 Томского политехнического университета 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: «_____» _____ 2009 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

канд. хим. наук, доцент

Гиндуллина Т. М.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Антиоксиданты, как вещества, предотвращающие зарождение и развитие свободно – радикальных процессов окисления в объектах органического и неорганического происхождения, нашли широкое применение в химической, пищевой, косметической, фармацевтической промышленности, биологии и медицине в последнее время. Особенно широко антиоксиданты применяются в составе биологически - активных добавок, косметических средств, фармацевтической продукции. Лавинообразный рост подобной продукции на рынке предъявляет все более серьезные требования к сертификации товара. В настоящее время в нормативных документах РФ не существует единого показателя антиоксидантной активности подобных препаратов. Для проверки их качества используются длительные, трудоемкие, не всегда сопоставимые и неточные исследования, опирающиеся иногда на неаттестованные методики. Необходимость введения новых методик и приборов, обеспечивающих надежные результаты по определению суммарной антиоксидантной активности подобных препаратов, является актуальной задачей, от решения которой зависит качество, эффективность и безопасность предлагаемых на рынке продуктов.

В последнее время в литературе предлагается большое число методов по определению антиоксидантов и их активности. Однако, эти данные имеют разрозненный характер, используют разные модельные системы, представления о характере их действия на радикалы различной природы. Полученные результаты имеют разные размерности, что не позволяет сопоставить их друг с другом. Достаточно мало аттестованных методик и сертифицированных приборов, способных быстро и на качественном уровне определить суммарную антиоксидантную активность продукции. Недостаточно сведений о влиянии ряда факторов на антиоксидантные свойства продукции, например, pH среды, природы самих антиоксидантов, растворителя и др. Недостаточно изученными факторами остаются эффективная концентрация антиоксидантов, время их активного действия и совместимость компонентов в смесях антиоксидантов. Поэтому обобщение информации и поиск новых подходов к определению антиоксидантов и их активности на данном этапе является весьма актуальной задачей.

Одними из перспективных и доступных методов определения активности антиоксидантов являются электрохимические методы, обладая низкой себестоимостью, высокой чувствительностью, возможностью анализировать как водные, так и неводные среды. В России большой вклад в развитие электрохимии антиоксидантов внесли такие ученые, как Г.К. Будников (Казанский государственный университет), Х.З. Брайнина (Уральский государственный экономический университет), З.А. Темердашев (Кубанский государственный университет) и другие.

Достаточно удобным для определения антиоксидантов и их активности является вольтамперометрический метод, так как он, как и антиоксиданты, весьма чувствителен к наличию в среде кислорода и его активных радикалов. Это позволило предложить новый подход к определению суммарной антиоксидантной активности объектов, используя в качестве модельной системы процесс электровосстановления кислорода в отсутствие и при наличии антиоксидантов различного происхождения. Поскольку с участием кислорода протекает большинство окислительных процессов в объектах органического и неорганического происхождения, такой подход должен быть успешным и в

некоторой степени моделировать характер взаимодействия антиоксидантов с кислородом и его активными формами в организме человека и животных.

Цель работы: Развитие теории и практики вольтамперометрического метода определения активности антиоксидантов на основе модельной системы: кислород, активные формы кислорода - антиоксидант. Создание на этой основе методического обеспечения для определения суммарной антиоксидантной активности объектов искусственного и природного происхождения.

Для достижения поставленной цели предстояло решить следующие задачи.

1. Обосновать выбор модельной системы: кислород, активные формы кислорода – антиоксидант для определения антиоксидантной активности объектов искусственного и природного происхождения. Рассмотреть влияние различных факторов: рН среды, природы растворителя, концентрации молекулярного кислорода, на процесс электровосстановления кислорода. Показать возможность использования относительного изменения тока электровосстановления кислорода в присутствии антиоксидантов на ртутно – пленочном электроде как средство измерения антиоксидантной активности объектов искусственного и природного происхождения.

2. Исследовать влияние поверхностно активных веществ, сопутствующих антиоксидантам в различных объектах, на процесс электровосстановления кислорода. Рассмотреть закономерности влияния различных факторов (рН среды, материала электрода) на процесс электровосстановления кислорода в присутствии разных типов поверхностно активных веществ.

3. Изучить физико-химические закономерности процесса электровосстановления кислорода в присутствии антиоксидантов различной природы. Предложить преимущественные механизмы взаимодействия антиоксидантов с кислородом и его активными формами.

4. Осуществить и обосновать выбор количественных критериев оценки антиоксидантной активности объектов искусственного и природного происхождения на основании относительного изменения тока электровосстановления кислорода в присутствии антиоксидантов.

5. Провести оценку антиоксидантной активности индивидуальных антиоксидантов, их смесей, объектов искусственного и природного происхождения. Выявить наиболее активные соединения. Рассмотреть влияние концентрации, времени взаимодействия антиоксидантов с кислородом и его активными радикалами, рН среды, совместимости компонентов в смесях на антиоксидантную активность объектов.

6. Исследовать электрохимические свойства ряда антиоксидантов. Особое внимание уделить впервые синтезированным соединениям с антиоксидантными свойствами, таким, как производные антипирина, антипириламида, кумарина, имеющими фармацевтическое значение. Определить оптимальные условия получения аналитического сигнала с целью дальнейшей разработки методик их количественного определения. Установить взаимосвязь между антиоксидантными свойствами и электрохимическими параметрами (потенциалами окисления) антиоксидантов на примере ряда флавоноидов и витаминов.

7. Разработать методику определения антиоксидантной активности объектов искусственного и природного происхождения на основе полученных закономерностей. Рассчитать основные метрологические характеристики методики в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-2002, действующего на территории РФ.

Провести сравнительные испытания методики с другими известными методами определения активности антиоксидантов. Разработать вольтамперометрический анализатор для определения показателя антиоксидантной активности объектов искусственного и природного происхождения. Провести сертификацию нового анализатора.

Научная новизна

1. Впервые предложен новый подход на основе метода вольтамперометрии и модельной системы: кислород, активные формы кислорода – антиоксидант для оценки суммарной антиоксидантной активности объектов искусственного (продукция пищевой, косметической, фармацевтической промышленности) и природного (экстракты растений, вытяжки торфа, биологические объекты) происхождения.
2. Впервые проведены и обобщены исследования по влиянию поверхностно активных веществ, сопутствующие антиоксидантам, на процесс электровосстановления кислорода. Показан неоднозначный характер данного влияния, зависящий от материала электрода, рН среды, типа поверхностно активных веществ. На основе изученных закономерностей показано, что только на платиновых металлах в кислых средах наблюдается пропорциональное уменьшение тока кислорода в присутствии поверхностно активных веществ. На этой основе разработан новый способ определения суммарного содержания поверхностно – активных веществ в водных средах. На ртутно - пленочном электроде подобной закономерности не обнаружено, что дает возможность использовать данный процесс для определения антиоксидантной активности объектов в присутствии поверхностно активных веществ.
3. Впервые установлены физико-химические закономерности процесса электровосстановления кислорода в присутствии антиоксидантов различной природы. Получены новые уравнения для тока кислорода, осложненного наличием предшествующей и последующей химических реакций взаимодействия с антиоксидантами в условиях линейной полубесконечной диффузии на твердых электродах. На основе этого предложены и обоснованы преимущественные механизмы взаимодействия антиоксидантов с кислородом и его активными формами. Установлено, что для каталазы, как фермента антиоксидантной природы, характерен механизм с последующей химической реакцией диспропорционирования и частичной регенерацией деполяризатора. В присутствии антиоксидантов фенольной природы наблюдается преимущественное протекание электродного процесса восстановления кислорода с последующими химическими реакциями взаимодействия антиоксидантов с активными кислородными радикалами. Для N, S и Se содержащих антиоксидантов характерен механизм с преимущественным протеканием предшествующей химической реакцией взаимодействия с молекулярным кислородом.
4. Впервые предложены и теоретически обоснованы новые количественные критерии определения антиоксидантной активности объектов по отношению к процессу электровосстановления кислорода: емкостный $(\text{мг/л})^{-1}$ критерий, отражающий степень изменения модельного сигнала в зависимости от концентрации антиоксиданта в растворе; кинетический критерий (мкмоль/л мин), отражающий концентрацию кислорода и его активных форм, прореагировавших с антиоксидантом за минуту времени.

5. С использованием факторного эксперимента, метода крутого восхождения и центрального ортогонального композиционного планирования, впервые получены математические модели первого и второго порядков для определения активности антиоксидантов в зависимости от концентрации и времени их взаимодействия с кислородом и его активными формами. Полученные уравнения позволяют определять эффективные концентрации и время активного действия антиоксидантов по отношению к процессу электровосстановления кислорода.
6. С использованием кинетического и емкостного критериев впервые выявлено значительное влияние ряда факторов, таких, как рН среды, природы растворителя при выделении компонентов растительного сырья, совместимости компонентов в смесях, на антиоксидантные свойства объектов. На примере токоферола моногликозида показано, что данный антиоксидант наиболее активен в нейтральной области рН (7,1 – 7,3). При фракционировании экстрактов растений выявлена наиболее активная этилацетатная фракция, которая рекомендована для наиболее полного извлечения антиоксидантов из растительного сырья. При оценке совместимости компонентов в смесях антиоксидантов показано, что при увеличении числа компонентов (больше 2) их суммарная антиоксидантная активность падает, при этом аддитивности сигнала не наблюдается. На основе данных исследований предложена наиболее эффективная композиция из числа исследованных антиоксидантов на основе аскорбиновой кислоты и дигидрохверцетина в соотношении 1:1.
7. Методом циклической вольтамперометрии впервые установлены механизмы протекания электродных процессов окисления – восстановления ряда вновь синтезированных соединений с антиоксидантными свойствами, имеющими фармацевтическое значение (производные антипирина, антипириламида, кумарина). Показан обратимый характер протекания процессов, определены потенциалы окисления – восстановления исследуемых соединений. Найдены оптимальные условия получения аналитического сигнала (пиков окисления) для исследованных веществ.
8. Найдена взаимосвязь между электрохимическими свойствами (потенциалами окисления) и антиоксидантной активностью веществ. Получено уравнение, которое позволяет прогнозировать значения электрохимических потенциалов окисления и осуществлять целенаправленный синтез и анализ новых соединений с антиоксидантными свойствами.

Достоверность разработанных научных положений и сформулированных выводов обеспечена корреляцией полученных экспериментальных результатов с теоретическими, хорошей сопоставимостью с литературными данными, получением согласованных результатов сравнительных определений вольтамперометрического метода с независимыми аналитическими спектрофотометрическими, кинетическими, флуоресцентными методами, оценкой основных метрологических характеристик результатов определения с помощью методов математической статистики в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-2002, действующего на территории РФ.

Практическая значимость работы. Исследование антиоксидантных свойств широкого круга объектов методом вольтамперометрии на основе процесса электровосстановления кислорода, позволило выявить наиболее активные антиоксиданты, их композиции, предложить способ фракционирования экстрактов растений и дать рекомендации для их дальнейшего использования в фитотерапии.

С использованием полученных результатов фирмой «Диадема» (г. Иркутск) разработана новая биологически – активная добавка «Лавитол», прошедшая необходимую процедуру сертификации и допущенная к применению как профилактическое средство сердечно - сосудистых заболеваний. Фирма «Биокор» (г. Новосибирск), используя результаты данной работы, выпустила на рынок новый кисломолочный продукт «Наринэ-2» с улучшенными свойствами.

При исследовании антиоксидантной активности нового синтезированного препарата токоферолмоногликозида выявлены оптимальная концентрация, время активного действия антиоксиданта, рН среды. Результаты данной работы внедрены в НИИ онкологии г. Томска для разработки рекомендаций к лечению и профилактике онкологических заболеваний с использованием данного препарата.

На основе результатов определения совместимости компонентов в смесях антиоксидантов разработаны эффективные антиоксидантные композиции, улучшающие качество питьевой минерализованной воды, косметической продукции. На основе полученных результатов фирма «Кора» (г. Москва) разработала новые косметические средства антиоксидантного назначения, способствующие эффективной защите и омоложению клеток кожи.

Разработан анализатор «Антиоксидант» для определения антиоксидантной активности объектов искусственного и природного происхождения. Прибор прошел государственные испытания, по результатам которых ему присвоен тип средства измерения – «Анализатор АОА» с приписанными метрологическими и техническими характеристиками. Анализатор сертифицирован Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии РФ (Сертификат RU.C.31.113.A № 28715) и внесен в единый ГОСреестр СИ под номером 35466-07. В настоящее время анализатор прошел международную сертификацию в Чехии (г. Прага) (Сертификат IEC № 603066-01/01 of 11.07.2008) и допущен к применению в аналитических и научно-исследовательских лабораториях Европы и Америки.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Обоснование выбора вольтамперометрического метода и модельной системы: кислород, активные формы кислорода – антиоксидант для определения антиоксидантной активности объектов искусственного и природного происхождения.
2. Результаты оценки влияния поверхностно активных веществ, сопутствующих антиоксидантам, на процесс электровосстановления кислорода в зависимости от материала электрода, рН среды, типа поверхностно – активного вещества.
3. Физико-химические закономерности процесса электровосстановления кислорода в присутствии антиоксидантов различной природы. Классификация антиоксидантов по механизмам их взаимодействия с кислородом и его активными формами.
4. Количественные критерии определения антиоксидантной активности объектов по отношению к процессу электровосстановления кислорода: емкостный (мг/л)⁻¹ критерий, отражающий степень изменения модельного сигнала в зависимости от концентрации антиоксиданта в растворе; кинетический критерий (мкмоль/л·мин), отражающий концентрацию кислорода и его активных форм, прореагировавших с антиоксидантом за минуту времени.

5. Результаты определения антиоксидантной активности по отношению к процессу электровосстановления кислорода ряда индивидуальных веществ, объектов искусственного и природного происхождения.
6. Результаты определения электрохимических свойств (потенциалов окисления – восстановления) производных антипирина, антипириламида, кумарина, в модельных растворах и лекарственных формах. Выявленные зависимости между электрохимическими свойствами (потенциалами окисления) и антиоксидантной активностью ряда флавоноидов и витаминов.
7. Результаты сравнительных определений антиоксидантной активности некоторых биологически активных веществ с использованием метода вольтамперометрии и независимых аналитических методов анализа (спектрофотометрический, флуориметрический, амперометрический с использованием биосенсора).
8. Методика определения антиоксидантной активности объектов искусственного и природного происхождения по отношению к процессу электровосстановления кислорода.

Апробация работы Основные результаты диссертации доложены и обсуждены на следующих Международных и Всероссийских конференциях: VI Межд. конф. «Биоантиоксидант» (г. Москва 2002); Int. conf. “Euroanalysis-12”, (Dortmund, Germany, 2002); Всерос. конф. «Актуальные проблемы аналитической химии» (г. Москва, 2002); Всерос. научно –практ. конф. «Химия и технология лекарственных препаратов и полупродуктов» (г. Новокузнецк 2002); I, II, III, IV Всерос. научн. конф. «Химия и химическая технология на рубеже тысячелетий» (г. Томск, 2000, 2002, 2004, 2006); 203rd Meeting of the electrochemical society (Paris, France 2003); XVII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии (г. Казань 2003); Int. conf. Euro Food Chem XII (Brugge, Belgium 2003); Научно- практ. конф. «Технология органических веществ и высокомолекулярных соединений» (г.Томск, 2003); 3-rd, 4-th, 5- th Int. conf. “Instrumental Methods of Analysis” (Greece 2003, 2005, 2007); V Всерос. конф. «Экоаналитика – 2003». (Санкт- Петербург 2003); 7th- Int conf. on pharmacy and applied physical chemistry (Innsbruck, Austria 2003); 15th Int. symp. of pharmaceutical and biomedical analysis (Florence, Italy 2004); Int. conf. “Euroanalysis – 13” (Salamanca, Spain 2004); I семинара «Методы и средства определения антиоксидантной активности препаратов». (г.Москва, 2004); VII Всерос. науч. конф. «Аналитика Сибири и Дальнего Востока», (г.Новосибирск 2004); 10th Int. conf. on electroanalysis (Ireland 2004); Всерос. научн. конф. «Электроаналитика-2005». (г.Екатеринбург 2005); научно - практ. конф, «Технологии и продукты здорового питания» (г. Москва 2005); Межд. симп. «Молекулярные механизмы регуляции функции клетки» (г. Тюмень 2005); Int. conf “Analytical chemistry and chemical analysis”. (Kyev, Ukraine. 2005); 2-nd Int. symp. on Recent advances in food analysis. (Prague Czech Republic 2005); 8-ой Межд. семинар «Биотехнология-2005» (Пушино. 2005); 2-ой Всерос. конф. «Аналитические приборы 2005» (г Санкт-Петербург 2005); 9-th Annual meeting of the Israel analytical chemistry society (Tel-Aviv Israel 2006); 13-th World congress “Food in life”. (Nantes. France 2006); Int. congress ICAS-2006. (Moscow, Russia 2006); III Всерос. конф. «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (г.Барнаул, 2007); Int. conf. “4th Black Sea basin conference on analytical chemistry” (Sunny Beach, Bulgaria 2007); Int. conf. “Euroanalysis XIV”. (Antwerp, Belgium 2007); Межд. XVIII Менделеевский съезд по общей и

прикладной химии (г.Москва 2007); II Всерос. конф. по аналитической химии с межд. участием (г. Туапсе 2007); Всерос. научно- практ. конф. «Здоровое питание – основа жизнедеятельности человека» (г.Красноярск 2008); VII Всерос. конф. «ЭМА – 2008» (г. Уфа 2008).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 128 печатных работ в виде 43 статей (29 статей входит в список журналов, рекомендованных ВАК), материалов докладов и конференций, 4 патентов РФ.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 6-ти глав, обсуждения результатов, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 370 наименований, изложена на 368 страницах текста, содержит 70 таблиц, 104 рисунка и 3 приложения на 30-страницах.

Личный вклад автора Вклад автора состоял в формировании направления исследования, активном участии во всех этапах исследования, постановке конкретных задач и их экспериментальном решении, интерпретации и обсуждении экспериментальных данных. Диссертационная работа представляет собой обобщение результатов многолетних исследований, полученных автором лично, а также совместно с научным консультантом Ю.А. Карбаиновым, сотрудниками и аспирантами кафедры физической и аналитической химии Томского политехнического университета.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и образования РФ. Программа “Развитие научного потенциала высшей школы”. Подпрограмма: «Прикладные исследования и разработки по приоритетным направлениям науки и техники» № 5.21.2005 Тема: «Создание комплекса по определению суммарной антиоксидантной активности объектов», Федеральной целевой программы (ФЦП) РФ. ГК № 02.512.11.2174 (2007-2008гг), ГК № 02.512.11.2282 (2009-2010гг) Тема: «Разработка анализатора для определения антиоксидантов в биологических объектах», РФФИ. № 07 – 08 – 00227 – а (2007-2009гг) Тема: «Разработка новых автоматизированных комплексов по определению антиоксидантов в объектах», Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере. ГК № 4764p/5098 Тема: «Создание комплекса по исследованию свойств и сертификации биологически-активных добавок».

Автор выражает глубокую признательность и благодарность за совместное проведение исследований и обсуждение результатов работы д.х.н., проф. Я.И. Турьяну (г. Иерусалим Израиль), д.х.н., проф. Е.Б. Бурлаковой, д.х.н.. В.М. Мисину (ИБХФ им. Н.М. Эмануэля РАН г. Москва), проф. д.м.н. Н.В. Чердынцевой (НИИ онкологии СО РАМН г. Томск), prof. T. Kagiya (Kyoto Health Research Foundation Japan), д.х.н., проф. А.А. Бакибаеву (ТПУ г. Томск), prof. R. Nikolova, (Sofia University. Bulgaria), prof. I. Schepetkin (Montana State University USA), проф., д.х.н. А.И. Хлебникову (г.Барнаул. Алтайский ГТУ), д.х.н., проф. В.Д. Филимонову и аспиранту А.В. Воловоденко (ТПУ г. Томск), проф., д.х.н. М.С. Юсубову (СМГУ г. Томск), докторанту СМГУ, к.б.н. И.В. Шиловой. Выражаю благодарность проф., д.х.н. Н.А. Колпаковой за помощь в обсуждении результатов работы. Выражаю благодарность за помощь в оформлении материала сотрудникам ТПУ к.х.н. О.А. Аврамчик, к.х.н. Н.В. Башкатовой, аспирантам А.Н. Вторушиной, О.И. Липских.

Особая благодарность моему научному консультанту, безвременно ушедшему из жизни, проф., д.х.н. Ю.А. Карбаинову.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Характеристика предмета исследования

Термин «антиоксидант» произошел от английского слова «antioxidant» и характеризовал вещество, препятствующее протеканию окислительных процессов в различных средах. Одним из первых широко распространенных применений антиоксидантов явилось предотвращение окислительных процессов деструкции полимеров. В данном случае антиоксиданты характеризовались как ингибиторы или стабилизаторы свободно-радикальных процессов окисления.

В последнее время антиоксиданты широко используются как регуляторы окислительного метаболизма в живых организмах. Они характеризуются способностью в малых количествах различными путями нейтрализовать свободные радикалы, обрывать цепные реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ). В широком смысле «антиоксидант» может быть определен как вещество, которое защищает биологическую мишень от окислительного разрушения.

Механизмы действия антиоксидантов весьма разнообразны. Для того, чтобы охарактеризовать весь спектр действия различных классов антиоксидантов, было введено неспецифическое интегральное понятие, обозначенное в литературе как «суммарная антиоксидантная активность», характеризующая потенциальную возможность антиоксидантного действия всех компонентов, находящихся в образце, причем не по отдельности, а в совокупности их взаимодействия между собой в сложной системе, учитывая потенциальный синергизм их кооперативного антиоксидантного действия и вклад неизвестных, редко встречающихся или минорных антиоксидантов.

Выбор адекватных систем оценки антиоксидантной активности имеет первостепенное значение для правильной интерпретации полученных результатов, так как предполагает не просто идентификацию какого-то вещества или нескольких веществ, а выявление «функциональной» антиоксидантной активности по отношению к модельной системе, где протекают окислительно-восстановительные реакции.

Необходимость введения показателя суммарной антиоксидантной активности в контроль качества продукции обусловлено еще и потому, что повышенное содержание антиоксидантов в препаратах или неправильное их применение могут повлечь за собой нежелательные последствия. Антиоксиданты могут превратиться в свою противоположность – промоторов радикальных процессов, которые могут ингибировать белки – ферменты, модифицировать структуру мембран, обладать мутагенными свойствами.

В настоящее время существует множество методов оценки антиоксидантной активности. Каждый из них имеет свои преимущества и недостатки. При этом суммарная антиоксидантная активность определяется по ингибированию модельного сигнала в присутствии антиоксидантов. Зачастую такие системы работают в узком диапазоне рН, концентраций антиоксидантов, природы среды. Для расширения возможности анализа в данной работе предложен новый подход, где в качестве модельной реакции используется процесс электровосстановления кислорода ($\text{ЭВ } \text{O}_2$), который реализуется в несколько стадий с генерацией на поверхности электрода активных форм кислорода:





Суммарный процесс:



При повышенном содержании H_2O_2 в растворе возможно образование активных OH^\cdot радикалов по схеме:



В щелочных средах при $\text{pH} > 12$ происходит преимущественное образование OH^- иона по схеме:



Для определения концентрации молекулярного кислорода в различных средах широкое применение на практике нашел платиновый электрод, где реализуется 4-ех электронный механизм восстановления кислорода (5) с образованием молекул воды как конечного продукта. Платиновый электрод в сочетании с хлорид – серебряным электродом сравнения известен под названием «Электрод Кларка» и широко используется в большинстве стандартных кислородных датчиков.

На ртутных электродах стадии (1) – (3) и (4) можно изучать отдельно в связи с большим перенапряжением восстановления перекиси водорода на ртути. Кроме того, на ртутных электродах при различных парциальных давлениях кислорода как в водных, так и в неводных средах в области pH 2-10, порядок реакции по O_2 равен единице, а по водороду – 0. Это указывает на то, что лимитирующей стадией процесса является стадия (1). Для определения активности антиоксидантов в данной работе предложено использовать первую волну ЭВ O_2 , соответствующую стадиям (1) – (3), когда на поверхности электрода образуются активные кислородные радикалы и перекись водорода как конечный продукт.

Время жизни анион радикала кислорода $\text{O}_2^{\cdot-}$ в безводных апротонных средах составляет около 20 часов. Гибель его обусловлена взаимодействием со следами влаги:



В водных средах время жизни анион радикала кислорода значительно меньше. Полагают, что оно составляет несколько секунд.

Закономерности процесса ЭВ O_2 в присутствии поверхностно – активных веществ (ПАВ)

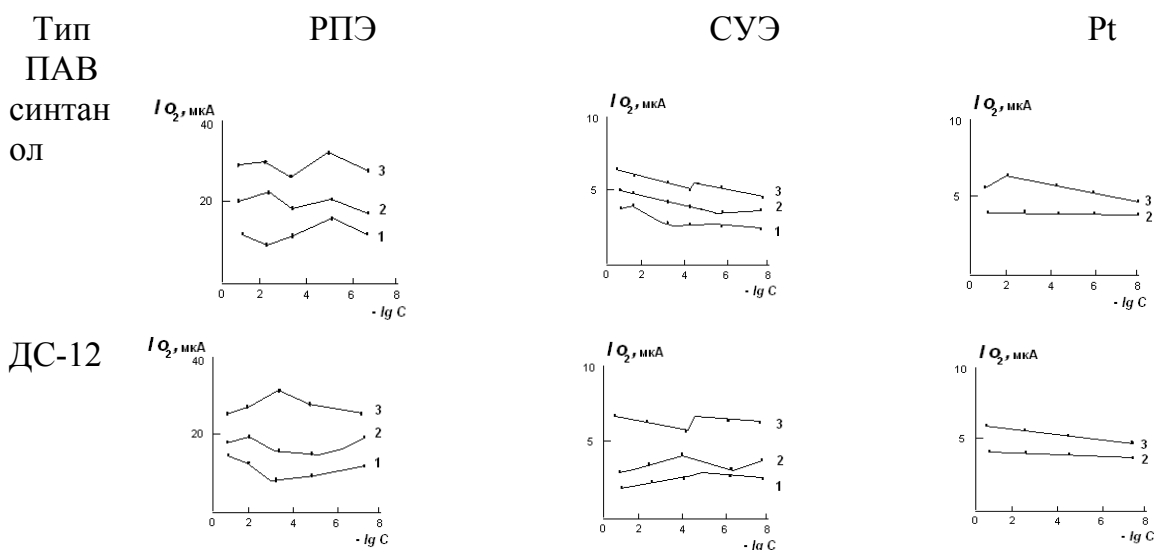
Поверхностно-активные вещества, сопутствующие антиоксидантам в объектах искусственного и природного происхождения, оказывают основное мешающее влияние в вольтамперометрическом анализе. Особенно это известно для анализа металлов. Вопрос влияния ПАВ на процесс ЭВ O_2 активно дискутируется в литературе. Большинство работ в этой области имеют противоречивый, не систематизированный характер. Однозначным остается факт, что характер влияния адсорбции ПАВ на процесс ЭВ O_2 определяется условиями эксперимента (материал электрода, pH среды, природа растворителя, вид полярографии).

Влияние ПАВ на электрохимическое поведение кислорода рассмотрено на модельных растворах, содержащих различные типы ПАВ, которые наиболее широко используются в промышленности и рекомендуются в литературе в качестве стандартных: лаурилсульфат натрия (NaЛС) –анионное ПАВ, цетилпиридиний хлористый (ЦПСИ) – катионное ПАВ, синтанол, оксиэтилированный на 12 молей додециловый спирт (ДС-12) – неионогенные ПАВ. Кроме того, в качестве суммарного стандарта ПАВ рассмотрен раствор, состоящий из равных количеств ЦПСИ, NaЛС и ДС-12 в соотношении: 1:1:1 (Σ ПАВ).

Если для большинства электрохимических систем введение ПАВ в раствор вызывает ингибирование как катодных, так и анодных пиков, то по отношению к процессу ЭВ O_2 такой зависимости не наблюдается. Это подтверждают снятые зависимости предельного тока ЭВ O_2 от логарифма концентрации ПАВ в растворе в широком диапазоне (рис. 1). Все они не имеют пропорционального характера и неоднозначны для разных типов ПАВ на трех типах электродов (ртутно-пленочном (РПЭ), стеклоуглеродном (СУЭ) и платиновом (Pt) при различных рН.

Причина такого поведения ПАВ возможно кроется в гидрофобности молекулярного кислорода и в механизме влияния ПАВ на молекулу кислорода на поверхности электрода, где сами органические вещества, адсорбируясь на электроде, принимают участие в передаче электрона от металла через адсорбированную частицу ПАВ к восстанавливающейся молекуле кислорода со скоростью большей, чем скорость диффузии O_2 , особенно для РПЭ. Кроме того, адсорбируясь на поверхности электрода, ПАВ затрудняют процессы адсорбции – десорбции продуктов реакции ЭВ O_2 , что в свою очередь ведет к невоспроизводимости результатов исследований. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными, объясняя столь неоднозначное влияние ПАВ на катодный ток O_2 .

Подтверждением вышеописанного механизма служит и сдвиг потенциала предельного тока O_2 в отрицательную область с ростом концентрации ПАВ в растворе для СУЭ и платинового электрода.



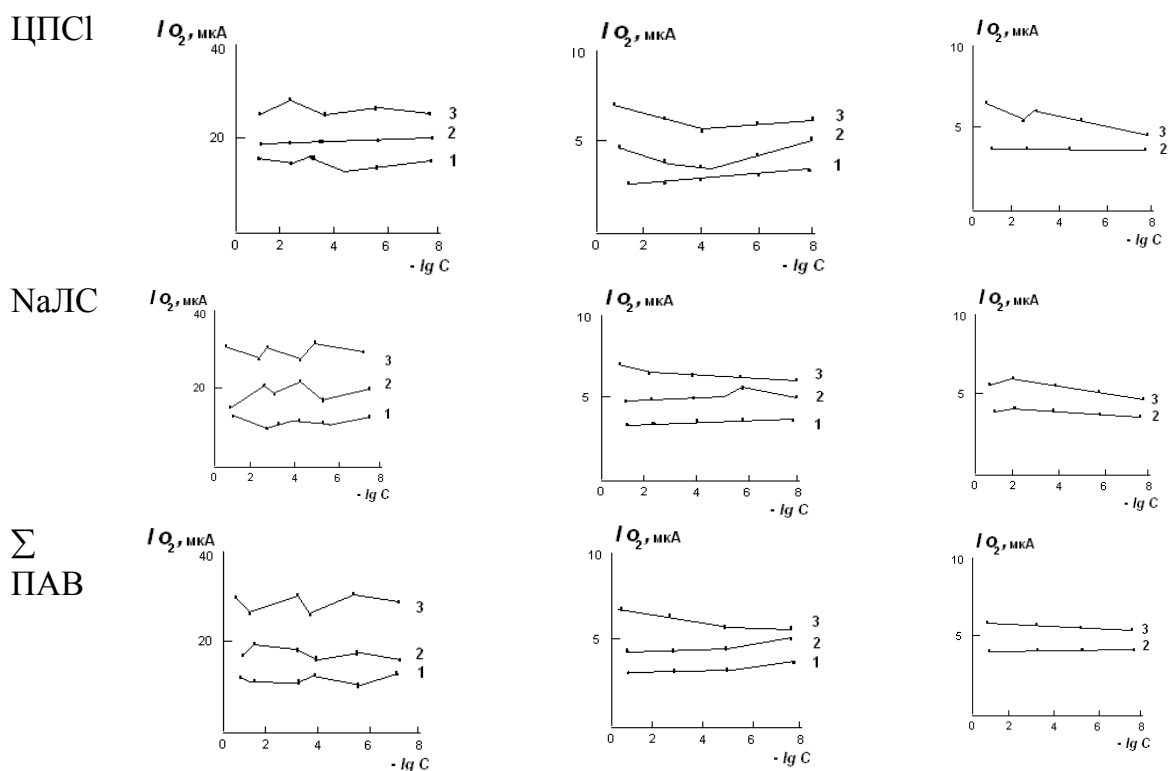


Рис. 1. Зависимость тока ЭВ O_2 от логарифма концентрации ПАВ (г/л) в водном растворе 0.1 М $NaClO_4$ при рН 3 (1), рН 6 (2) и рН 12 (3) на РПЭ, СУЭ и Pt электроде для разных типов ПАВ.

Полученные результаты показали, что только на платиновом электроде наблюдается пропорциональное изменение тока и потенциала предельного тока кислорода в присутствии ПАВ в кислой среде ($pH < 5$). В данных условиях на металлах 1 группы (Pt и другие) меняются механизм и характер замедленной стадии катодного восстановления O_2 , которое начинает подчиняться закономерностям необратимого электродного процесса. Причем в данных условиях наблюдается предварительная адсорбция ионов водорода, а в качестве замедленной выступает стадия взаимодействия адсорбированных атомов водорода с молекулой кислорода на поверхности электрода:



Следовательно, в кислых средах на металлах платиновой группы наблюдается ингибирование катодных волн O_2 с ростом концентрации ПАВ в растворе, причем, зависимости $i = f(\lg C_{ПАВ})$ имеют прямолинейный характер, различаясь в наклоне для разных типов ПАВ (рис. 2).

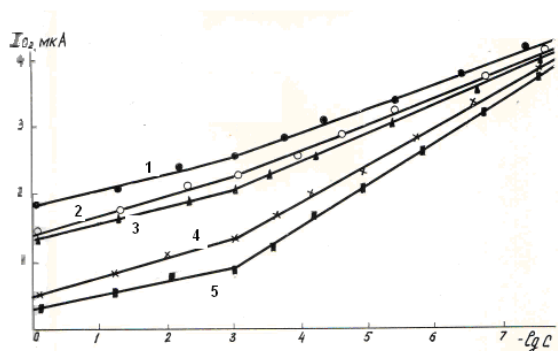


Рис. 2. Зависимость тока ЭВ O_2 от логарифма концентрации ПАВ на Pt электроде, г/л : синтанол (1), ДС-12 (2), НаЛС (3), Σ ПАВ (4), ЦПСІ (5)

Следует заметить, что при одновременном снижении катодных волн кислорода на платиновом электроде в кислой среде наблюдается их расширение и сдвиг потенциала при увеличении концентрации ПАВ в растворе. Такой характер изменения катодных волн позволяет предположить, что в данном случае вероятный механизм ингибирования электродного процесса ЭВ O_2 в присутствии ПАВ заключается в торможении собственно электрохимической реакции (лимитирующей стадии процесса). В чистом фоновом растворе на поверхности Pt электрода при $pH < 5$ в качестве переносчика электронов к восстанавливаемой молекуле O_2 выступает адсорбированный атом водорода $H^+_{(адс)}$ по реакции (29), которая является замедленной для всего процесса ЭВ O_2 . Введение ПАВ вызывает блокировку части рабочей поверхности электрода, конкурируя с $H^+_{(адс)}$. Это характерно для всех типов рассмотренных ПАВ в растворе.

На основании полученных результатов разработан вольтамперометрический способ определения суммарного содержания ПАВ в водных объектах высокой чистоты на платиновом электроде в подкисленной среде, используя процесс ЭВ O_2 . Способ защищен патентом РФ. На РПЭ механизм и закономерности процесса ЭВ O_2 меняются, что дает возможность использовать данный процесс для определения показателя АОО природных и промышленных объектов даже в присутствии ПАВ.

Физико-химические закономерности влияния антиоксидантов на процесс электровосстановления кислорода в условиях вольтамперометрического анализа

Как известно, электровосстановление кислорода на ртутном пленочном электроде при средних значениях скорости развертки потенциала ($V=20 - 80$ мВ/с) является квазиобратимым процессом и протекает в условиях смешанной кинетики, когда скорость диффузии кислорода в растворе сопоставима со скоростью протекания электрохимической стадии его восстановления. При оценке влияния природы антиоксидантов на процесс электровосстановления кислорода было замечено, что они по-разному влияют на данный процесс, при этом сами не являясь электрохимически активными в данной области потенциалов ($E=-0.1 \div -0.9$ В). В таблице 1 приведены исследуемые антиоксиданты и БАВ как искусственного, так и природного происхождения, условно разделенные на 3 группы, различающиеся по характеру влияния на процесс ЭВ O_2 . На рис. 3 приведены вольтамперограммы, характеризующие влияние антиоксидантов различных групп на процесс ЭВ O_2 .

Первая группа веществ увеличивает ток ЭВ O_2 и сдвигает потенциал в сторону отрицательных значений (каталаза) (рис.3а). К данной группе относится фермент антиоксидантной природы (каталаза), а также гуминовые кислоты, порфирины, фталоцианины металлов. Все эти вещества очень разные по своей природе, однако их объединяет одно общее свойство: все они относятся к металлокомплексам, имея в своей структуре ионы переходных металлов. Это свойство как раз и обуславливает каталитический характер влияния на процесс ЭВ O_2 . Сдвиг потенциала полуволны тока ЭВ O_2 в отрицательную область позволил предположить наличие механизма ЕС* с последующей реакцией диспропорционирования продукта реакции и частичной регенерацией деполаризатора: молекулярного кислорода.

Группы изученных биологически активных веществ (БАВ), различающиеся по характеру влияния на процесс ЭВ O_2

№ группы	1 группа	2 группа	3 группа
Названия веществ	Металлокомплексы (каталаза, фталоцианины, порфирины металлов, гуминовые кислоты)	Соединения фенольной природы (витамины А, Е, С, В, аскорбаты металлов, флавоноиды, кумарины, коэнзим Q_{10} , экстракты растений).	N, S, Se-содержащие биологически активные вещества (Se содержащие БАД, производные антипирина и антипириламида)
Влияние на ЭВ O_2	Увеличение тока ЭВ O_2 , сдвиг потенциала в отрицательную область	Уменьшение тока ЭВ O_2 , сдвиг потенциала в положительную область.	Уменьшение тока ЭВ O_2 , сдвиг потенциала в отрицательную область.
Предполагаемый электродный механизм.	Механизм ЕС* с последующей реакцией диспропорционирования	Механизм ЕС	Механизм СЕС

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

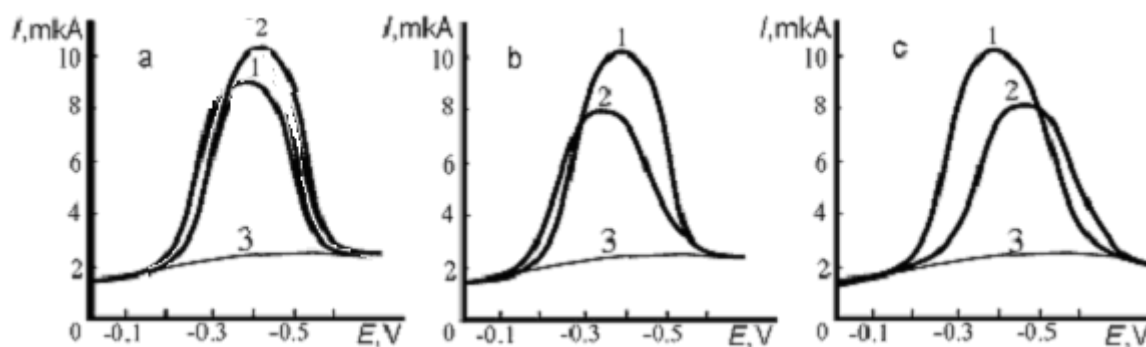


Рис. 3. Вольтамперограммы тока ЭВ O_2 в отсутствии (1) и в присутствии разных групп антиоксидантов (2): а) 0.005г/мл каталазы, б) 0.005г/мл витамина С, с) 0.005г/мл селенита натрия. 3 – фоновый ток в отсутствии кислорода в растворе.

Вторая группа веществ наиболее многочисленная и изучена более подробно, т.к. именно эти вещества относят к классическим антиоксидантам, и их широко используют в качестве добавок в пищевой, косметической, фармацевтической промышленности. Все из указанных веществ уменьшали ток ЭВ O_2 , сдвигая потенциал в положительную область (рис.3б), проявляя механизм ЕС с последующими химическими реакциями взаимодействия антиоксидантов с активными кислородными радикалам. Исследованы антиоксидантные свойства по отношению к процессу ЭВ O_2 флавоноидов (рутина, кверцетина,

дигидрохверцетина, катехина), ряда витаминов (E, A, C, B₆), аскорбатов металлов, коэнзима Q₁₀, экстрактов растений.

Третья группа веществ также уменьшает ток ЭВ O₂, но сдвигает потенциал в отрицательную область (рис. 3с), увеличивая перенапряжение процесса. Предполагается, что вещества этой группы взаимодействуют преимущественно по СЕ механизму с молекулярным кислородом, растворенным в электролите или СЕС механизму с предшествующей и последующей химическими реакциями взаимодействия антиоксиданта с молекулярным кислородом и продуктами его восстановления. Из экспериментальных результатов по данной группе изучены антиоксидантные свойства селен содержащих БАД, синтезированных производных антипирина, антипириламида, бенздиазепина, имеющих фармацевтическое значение.

Рассмотрим физико – химические закономерности влияния каждой группы из представленных веществ на процесс ЭВ O₂ более подробно.

Закономерности влияния каталазы на процесс ЭВ O₂.

При влиянии каталазы на процесс ЭВ O₂ наблюдается увеличение тока ЭВ O₂ и сдвиг потенциала полуволны в отрицательную область, что характеризует наличие последующей химической реакцией диспропорционирования, в результате которой происходит частичная регенерация деполяризатора (молекулярного кислорода).

Подобные процессы рассматривались в монографиях З. Галюса, Ф. Шольца, Р. Комптона. Исходя из вышеописанных работ, продукт электродной реакции неустойчив и диспропорционирует под воздействием катализатора, в результате чего частично регенерируется исходный деполяризатор.

Для обратимых и квазиобратимых процессов в условиях малых V (до 50 мВ/с) потенциал полуволны был описан уравнением:

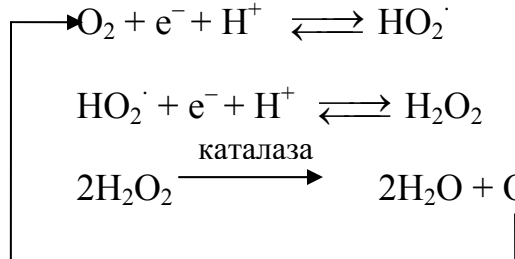
$$E_{p/2} = E^{\circ} - \frac{0.071}{n} - \frac{0.020}{n} \lg n + \frac{0.020}{n} \lg \frac{k_1 C_{Ox}^{\circ}}{V} \quad (10)$$

При малых V (до 50 мВ/с), ток пика не зависит от диффузии, и его можно представить в виде:

$$I_p = nFA C_{Ox}^{\circ} (Dk_1 Z^{\circ})^{1/2} \quad (11)$$

Где k_1 константа скорости последующей реакции диспропорционирования, л/моль·с, V – скорость развертки потенциала, мВ/с, n – количество электронов, участвующих в лимитирующей стадии электродного процесса, C_{Ox}° – концентрация деполяризатора, моль/л, A – площадь электрода, см², D – коэффициент диффузии деполяризатора, см²/с, Z° – концентрация катализатора, моль/л.

В случае процесса ЭВ O₂ с последующей реакцией диспропорционирования перекиси водорода под воздействием каталазы схему процесса можно представить в следующем виде:



Данный электродный процесс удовлетворяет всем признакам наличия последующей химической реакции диспропорционирования и частичной регенерации деполяризатора – молекулярного кислорода.

1. Потенциал полуволны катодного восстановления кислорода в присутствии каталазы зависит от концентрации деполяризатора и $\lg 1/V$ в области малых значений V (до 50 мВ/с) (рис. 4).

2. По уравнению $|E_p - E_{p/2}| = 0.041/n$ определено количество электронов, участвующих в лимитирующей стадии электродного процесса: $n=1$.

3. Форма волны не меняется, при этом происходит увеличение предельного тока деполяризатора и сдвиг потенциала в сторону отрицательных значений с увеличением концентрации каталазы в растворе при наличии последующей реакции диспропорционирования (рис. 5).

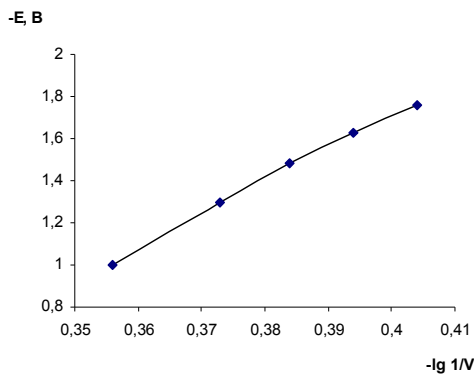


Рис.4 Зависимость потенциала пика от $\lg 1/V$

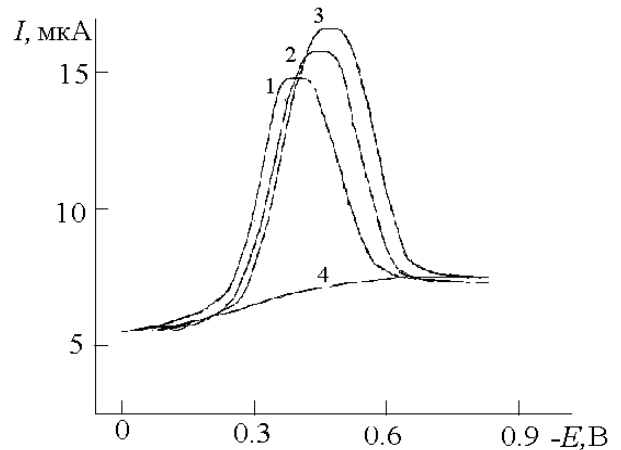


Рис. 5. Вольтамперограммы тока ЭВ O_2 в фоновом электролите (1), в присутствии $3 \cdot 10^{-5}$ г/мл каталазы (2), $6 \cdot 10^{-5}$ г/мл каталазы (3).

График зависимости предельного тока ЭВ O_2 от корня квадратного концентрации каталазы в растворе, показанного на рис. 6, в диапазоне концентраций от $4,31 \cdot 10^{-8}$ до $6,51 \cdot 10^{-8}$ моль/л имеет прямолинейный характер.

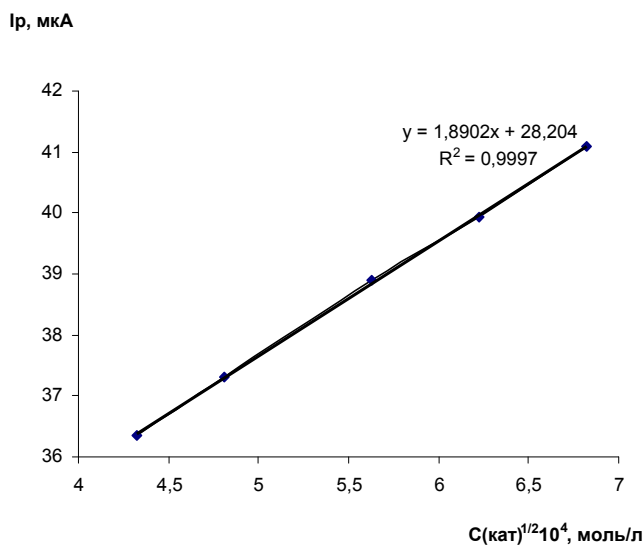


Рис.6. Зависимость предельного тока ЭВ O_2 от концентрации каталазы в степени $1/2$ при $V = 50$ мВ/с, $pH=6,86$.

Используя тангенс угла наклона прямолинейной зависимости тока ЭВ O_2 от корня квадратного концентрации каталазы в растворе (рис.6), можно определить константу последующей химической реакции диспропорционирования перекиси водорода под воздействием каталазы k_1 по уравнению (11) (таблица 2).

Полученные значения хорошо согласуются с литературными данными (Гейровский Я., Кута И. Основы полярографии. – М.: Мир, 1965. – 559с) (табл. 2). Наибольшая константа скорости последующей реакции диспропорционирования наблюдается в нейтральной области рН=6.86, что связано с денатурацией фермента при значениях рН, отличающихся от нейтрального.

Таблица 2.

Значения констант скорости последующей реакции диспропорционирования перекиси водорода в присутствии каталазы при различных значениях рН ($n=3$, $p=0.95$).

рН	k_1 , л/моль·с (метод вольтамперометрии)	k_1 , л/моль·с (метод полярографии).
4,01	$0.14 \cdot 10^7$	-
6,86	$1,11 \cdot 10^7$	$1,70 \cdot 10^7$
9,18	$0.82 \cdot 10^7$	-
12,45	$0.10 \cdot 10^7$	-

Антиоксиданты, взаимодействующие с активными кислородными радикалами по механизму ЕС.

Вопрос влияния последующей гомогенной химической реакции на электродный процесс активно обсуждается в различных литературных источниках. Однако, единого мнения о влиянии последующей химической реакции на предельный ток деполяризатора в условиях квазиобратимого электродного процесса нет.

В процессе систематизации литературных данных были выявлены и обобщены признаки наличия последующей химической реакции в электродном процессе по механизму ЕС. Показано, что для процесса ЭВ O_2 в присутствии антиоксидантов фенольной природы, взаимодействующих с активными кислородными радикалами, данные признаки соблюдаются. Зависимость потенциала полувольты тока ЭВ O_2 в присутствии антиоксидантов от $\lg(V^{1/2})$ носит линейный характер, в то время как в отсутствие АО для данного процесса зависимость не линейна (рис.7). При уменьшении скорости развертки потенциала наблюдается сдвиг потенциала полувольты ЭВ O_2 в присутствии антиоксиданта в положительную область, а также уменьшение предельного тока ЭВ O_2 (рис.8). При уменьшении $V^{1/2}$ в 10 раз, потенциал пика смещается на $2.3RT/2zF$ и составляет 30 мВ при $n=1$ (количество электронов, участвующих в лимитирующей стадии процесса).

Полученные данные подтверждают наличие последующей химической реакции взаимодействия антиоксидантов с активными кислородными радикалами по механизму ЕС для процесса ЭВ O_2 . Однако, для более точной трактовки влияния последующей химической реакции на процесс ЭВ O_2 рассмотрим данный механизм в условиях стационарной диффузии, что весьма допустимо при малых скоростях развертки потенциала.

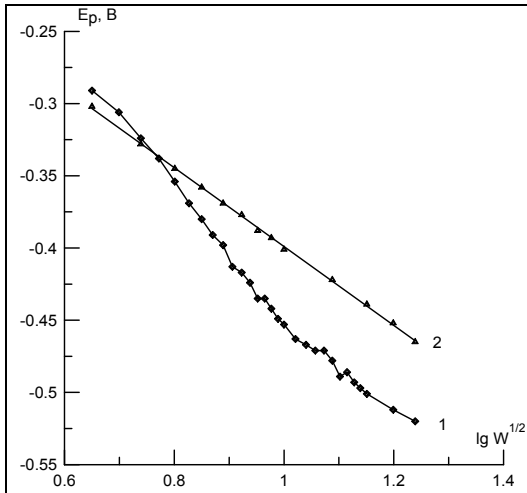


Рис.7. Зависимость потенциала предельного тока ЭВ O_2 от скорости развертки потенциала: (1) в отсутствие АО в растворе, (2) в присутствии аскорбиновой кислоты $C = 1 \cdot 10^{-5}$ г/мл

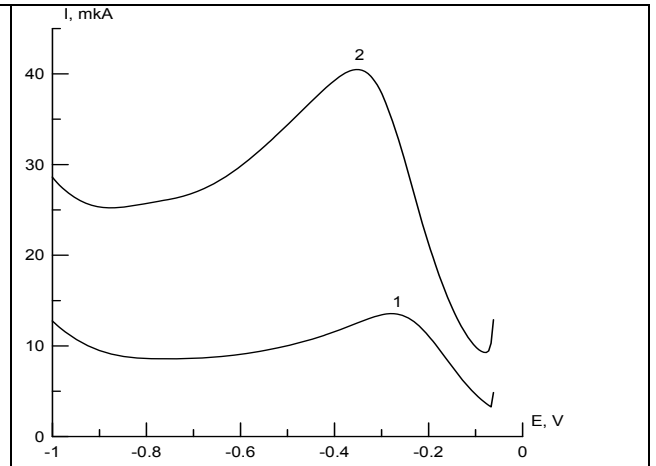
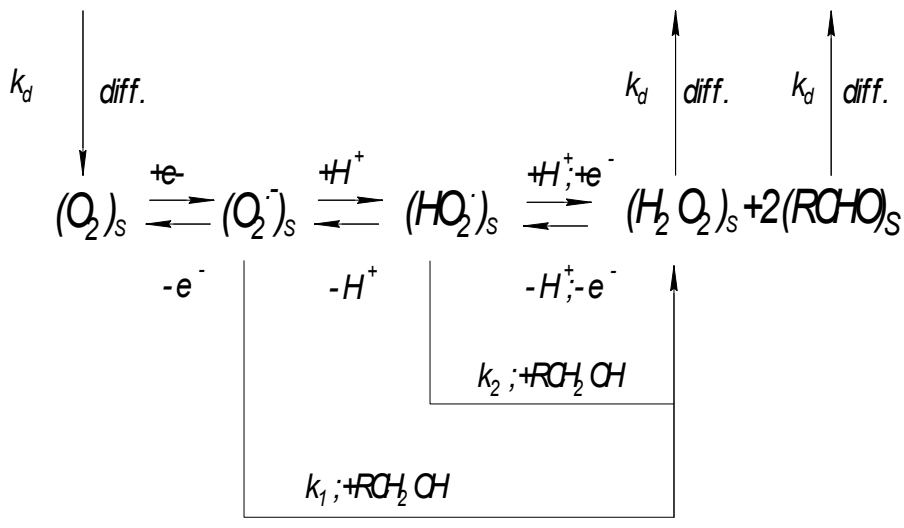


Рис.8. Вольтамперограммы тока ЭВ O_2 в фосфатном буфере (pH 6.86) в присутствии аскорбиновой к-ты ($C = 1 \cdot 10^{-5}$ г/мл) при: (1) $V=30$ мВ/с, (2) $V=300$ мВ/с

Представим общую схему электродного процесса с последующими химическими реакциями взаимодействия антиоксидантов с активными кислородными радикалами выражением (15).



В данном случае предполагается, что антиоксиданты не реагируют с молекулярным кислородом ни на поверхности электрода, ни в глубине раствора. Для обоснования этого постулата были проведены измерения концентрации молекулярного кислорода в отсутствие и присутствии антиоксидантов, используя стандартный кислородный датчик (производства «МЭРА – Эльвро» Польша), позволяющий определять концентрацию молекулярного кислорода до 10^{-4} моль/л. Шкала данного датчика градуирована в % относительно исходного содержания молекулярного кислорода в растворе. В данном случае при добавлении в раствор в качестве антиоксидантов некоторых флавоноидов (дигидрокверцетина, рутина, катехина, кверцетина) даже в больших концентрациях ($C=0.001 - 0.1$ моль/л) изменение сигнала обнаружено не было. Этот факт позволил подтвердить постулат об отсутствии взаимодействия или незначительном взаимодействии АО второй группы с молекулярным кислородом в объеме раствора.

В работе Я.И. Турьяна (Turyan Y.I., Gorenbein P., Kohen R.//J. Electroanalytical Chem. – 2004. – Vol. 571, №571. – P. 183-188) для описания электродного процесса ЭВ O_2 в присутствии антиоксидантов была использована теория реакционного слоя. При этом применялись следующие допущения:

1. Использовались условия стационарной диффузии, что может быть допустимо при малых скоростях развертки потенциала на стационарном ртутно-пленочном электроде.
2. Среди продуктов реакции по схеме (15) в раствор диффундирует только форма H_2O_2 как конечный продукт.
3. Коэффициенты диффузии окисленной и восстановленной форм процесса ЭВ O_2 принимались равными друг другу.
4. В качестве лимитирующей стадии выступала стадия (1) образования супероксид анион радикала. Остальные стадии электродного процесса являются обратимыми и протекают с достаточно большой скоростью.
5. Антиоксиданты реагируют с активными кислородными радикалами на поверхности электрода преимущественно в прямом направлении. Реакция взаимодействия антиоксидантов с молекулярным кислородом как на поверхности электрода, так и в глубине раствора не учитывалась.
6. Концентрация антиоксиданта была достаточно большой, поэтому ее изменения в ходе электродного процесса можно пренебречь.
7. Влияние pH раствора нивелировалось использованием буферной системы в качестве фонового электролита.

Исходя из схемы (15) и принятых допущений, получено выражение для тока кислорода на электрод в присутствии (16) и отсутствии (17) антиоксидантов в растворе:

$$I_k = I_d - F \left\{ k'_1 [O_2^-]_S [H^+] + k'_2 [HO_2^\cdot]_S \right\} C_{AO} \quad (16)$$

$$I_d = 2Fk'_d [H_2O_2]_S \quad (17)$$

где

$$k'_1 = 10^{-6} k_1 S \mu_1 \quad (18)$$

$$k'_2 = 10^{-3} k_2 S \mu_2 \quad (19)$$

$$k'_d = 10^{-3} k_d \quad (20)$$

где I_k , А, - кинетический ток в присутствии АО в растворе, I_d – диффузионный ток в отсутствие антиоксидантов в растворе, F- постоянная Фарадея, k_1 и k_2 – константы скорости последующих химических реакций взаимодействия антиоксиданта с активными кислородными радикалами, k_d – константа диффузионного тока, μ - толщина диффузионного слоя, см.

С учетом равновесных стадий (2) и (3) в схеме (15), введем соответствующие константы равновесия:

$$K_2 = \frac{[HO_2^\cdot]_S}{[O_2^\cdot]_S [H^+]} \quad (21)$$

$$\frac{[H_2O_2]_S}{[HO_2^\cdot]_S [H^+]} = K_3 = \exp \left[-\frac{F}{RT} (E - E_2^0) \right] \quad (22)$$

При определении относительного изменения тока в присутствии АО, получим следующее выражение для соотношения токов на электрод:

$$\frac{I_k}{I_d} = 1 - \frac{(k'_1 + k'_2 K_2)}{2k'_d K_2 K_3 [H^+]} C_{AO} \quad (23)$$

В случае присутствия АО в виде ионов, выражение (22) преобразуется в (23)

$$\frac{I_k}{I_d} = 1 - \frac{(k'_1 + k'_2 K_2)}{2k'_d K_2 K_3} C_{AO} \quad (24)$$

Исходя из полученных уравнений, общий множитель перед концентрацией АО можно принять за константу в данных условиях эксперимента. Тогда мы получим выражение:

$$\frac{I_k}{I_d} = 1 - k C_{AO} \quad (25)$$

В данном случае полученное уравнение не дает возможности рассчитать кинетические параметры процесса, но объясняет наличие линейной зависимости изменения тока ЭВ O_2 от концентрации антиоксидантов в растворе. При этом понижение предельного тока ЭВ O_2 в присутствии антиоксидантов будет наблюдаться при соотношении:

$$(k'_1 + k'_2 K_2) C_{AO} < 2k'_d K_2 K_3 [H^+] \quad (26)$$

В случае отсутствия взаимодействия веществ с кислородными радикалами, мы не будем наблюдать изменения сигнала ЭВ O_2 в присутствии данных веществ, тогда выражения будут равны друг другу:

$$I_k = 0: (k'_1 + k'_2 K_2) C_{AO} = 2k'_d K_2 K_3 [H^+] \quad (27)$$

И наконец, при

$$I_k < 0: (k'_1 + k'_2 K_2) C_{AO} > 2k'_d K_2 K_3 [H^+] \quad (28)$$

Таким образом, в условиях квазиобратимого электродного процесса ЭВ O_2 при наличии последующей химической реакции взаимодействия АО с активными кислородными радикалами, уменьшение предельного тока обусловлено большими константами равновесия стадий образования $HO_2\cdot$ (2) и перекиси водорода H_2O_2 (3) на схеме (15) и соизмеримыми константами скоростей последующих химических реакций взаимодействия с антиоксидантами.

Процесс ЭВ O_2 в присутствии N, S, Se содержащих антиоксидантов

Для подтверждения наличия взаимодействия антиоксидантов 3-ей группы (табл. 1) с молекулярным кислородом по механизму СЕ были проведены измерения концентрации молекулярного кислорода в отсутствие и присутствии антиоксидантов, используя стандартный кислородный датчик. В данном случае при добавлении в раствор в качестве антиоксидантов сульфита натрия, селенита натрия в концентрациях ($C=0.0001 - 0.01$ моль/л) идет уменьшение % содержания молекулярного кислорода в растворе. Этот факт позволил подтвердить наличие взаимодействия исследованных АО с молекулярным кислородом по механизму СЕ или СЕС.

В случае влияния S, Se - содержащих антиоксидантов на процесс ЭВ O_2 все признаки наличия предшествующей химической реакции соблюдаются. Наблюдается сдвиг потенциала в сторону отрицательных значений при увеличении концентрации антиоксиданта в растворе, растянутость пика (рис.9). Однако,

предельный ток ЭВ O_2 зависит от скорости развертки потенциала в присутствии указанных антиоксидантов (рис.10). Это указывает на то, что предшествующая химическая реакция не является лимитирующей стадией процесса.

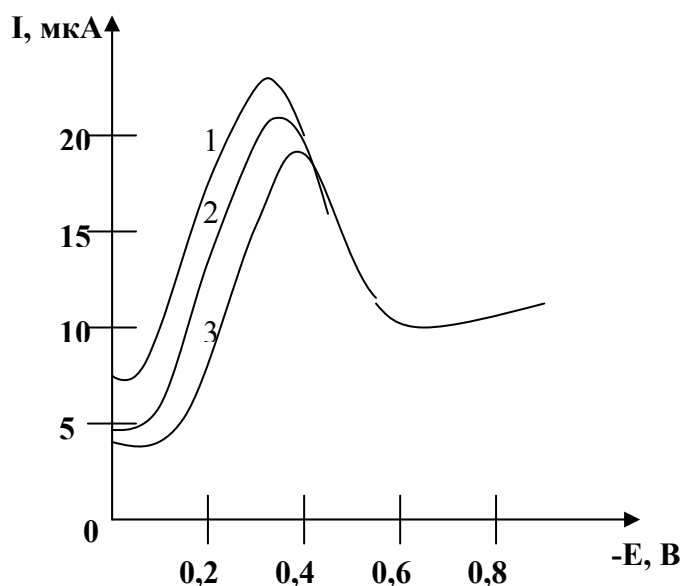


Рис.9. Вольтамперограмма процесса ЭВ O_2 в отсутствие (1) и в присутствии БАД «Селенактив» $C = 0,001$ г/мл (2), $C = 0,005$ г/мл (3).

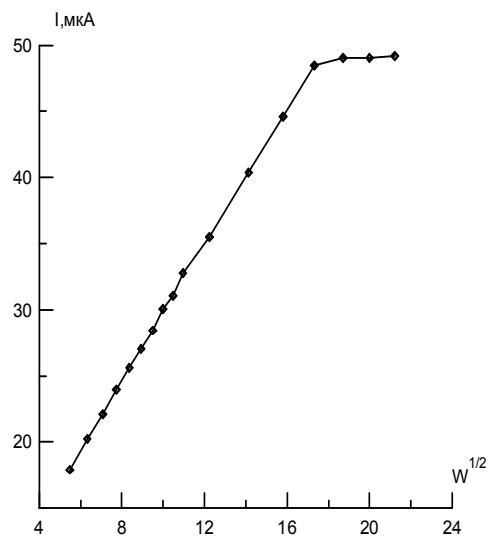
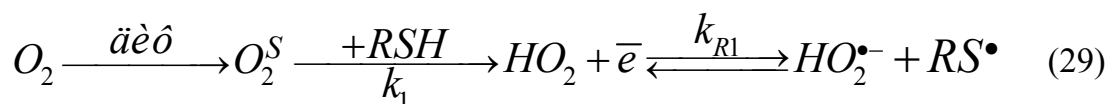


Рис.10. Зависимость тока ЭВ O_2 от скорости развертки потенциала в степени $1/2$ в присутствии БАД «Селенактив» $C = 0,001$ г/мл.

Из приведенных данных можно предположить наличие следующего механизма протекания процесса (СЕС):



При этом лимитирующей стадией процесса является электрохимическая реакция (29) с константой скорости k_{R1} . Остальные химические реакции протекают с достаточно большой скоростью и не лимитируют процесс.

Критерии оценки антиоксидантной активности объектов

Исходя из литературных данных, наиболее общепринятыми критериями оценки антиоксидантной активности объектов являются следующие:

1. Международный критерий *ORAC* (Oxygen radicals absorbance capacity – способность поглощать кислородные радикалы), отнесенный к стандартному антиоксиданту (например, тролоксу в неводных средах, так называемый тролоксовый эквивалент). Данный критерий рассчитывается по следующей обобщенной формуле:

$$ORAC = k \frac{(S_{\text{образца}} - S_{\text{тролокса}})}{(S_{\text{фона}} - S_{\text{тролокса}})} \quad (32)$$

где $S_{\text{образца}}$ – аналитический сигнал (площадь под пиком) образца, $S_{\text{тролокса}}$ – аналитический сигнал (площадь под пиком) тролокса - вещества взятого в данном случае за стандарт, $S_{\text{фона}}$ – общая площадь фона, k – коэффициент разбавления или коэффициент пересчета (постоянная величина для каждого метода), подбирается эмпирически для удобства интерпретации результатов анализа.

В условиях вольтамперометрического анализа данный критерий рассчитывался по формуле:

$$ORAC = \left(\frac{I_0 - I}{I_0 - I_{st}} \right), \quad (33)$$

где I — предельный ток электровосстановления кислорода в присутствии антиоксиданта в растворе, мкА, I_0 — предельный ток электровосстановления кислорода в отсутствие антиоксиданта в растворе, мкА, I_{st} — предельный ток электровосстановления кислорода в присутствии стандартного антиоксиданта в растворе, мкА.

Использование данного критерия весьма удобно в работе, так как ток ЭВ O_2 со стандартным антиоксидантом можно снять один раз, а затем использовать это значение в рутинных анализах, не повторяя данную процедуру, при одинаковых условиях анализа. Кроме того, данный критерий безразмерен, и его можно использовать для сравнения результатов различных методов анализа.

2. Биохимический критерий IC_{50} , отражающий концентрацию антиоксиданта при ингибировании модельного сигнала на 50%. Размерность: моль/л или мг/л. По результатам определений строят график зависимости степени ингибирования модельного сигнала от концентрации добавляемого антиоксиданта. Данный критерий трактован здесь как «биохимический», в связи с его широким использованием в биохимических исследованиях.

Данный критерий весьма удобно использовать для сравнительных определений антиоксидантной активности различными методами и для исследования антиоксидантных свойств индивидуальных веществ, особенно имеющих биохимическое значение.

3. Определение антиоксидантной активности образца по градуировочному графику.

В данном случае необходим выбор стандартного антиоксиданта, по которому строится градуировочный график изменения модельного сигнала от известной концентрации антиоксиданта в растворе. Далее для исследуемого образца определяется величина модельного сигнала и по градуировочному графику определяется показатель антиоксидантной активности в пересчете на стандартный антиоксидант (косвенное определение). Размерность данного критерия выражена в единицах концентрации стандартного антиоксиданта (моль/л или мг/л).

Удобство использования данного критерия заключается в том, что можно один раз построить градуировочную зависимость, а потом ее использовать в рутинных анализах, периодически проверяя наличие отклонений, согласно регламентируемой процедуре выполнения измерений в аналитических лабораториях.

В данной работе, наряду с общеизвестными критериями, для оценки антиоксидантной активности объектов предложено использовать 2 новых

критерия:

1. Емкостный критерий отражает степень изменения тока ЭВ O_2 в зависимости от концентрации антиоксиданта в растворе. Размерность: мл/г.

При исследовании физико-химических закономерностей процесса ЭВ O_2 в присутствии антиоксидантов в условиях стационарной диффузии при малых значениях скорости развертки потенциала был сделан вывод, что активность антиоксидантов можно определять, используя относительное изменение тока ЭВ O_2 в зависимости от концентрации антиоксиданта в растворе.

По формуле (34) рассчитывается емкостный критерий антиоксидантной активности, $K_{емк}$ (мл/г):

$$K_{\hat{a}i \hat{e}} = \frac{I_i}{I_0} \cdot \frac{1}{C_{AO}} \quad (34)$$

где I_i -ток ЭВ O_2 в присутствии АО в растворе, мкА, I_0 -ток ЭВ O_2 в отсутствие АО в растворе, мкА; C – концентрация АО в растворе, г/мл.

Данный критерий отражает степень изменения модельного сигнала (тока ЭВ O_2) в зависимости от концентрации антиоксиданта в растворе и определяется по тангенсу угла наклона графика зависимости относительного изменения тока ЭВ O_2 от концентрации антиоксиданта в растворе.

Данный критерий освобождается от необходимости использовать стандартный антиоксидант, однако, применение его в аналитической практике затруднено из-за несоответствия диапазонов концентраций различных антиоксидантов, используемых в различных отраслях промышленности. Данный критерий имеет эмпирический характер, и его удобно использовать для исследования антиоксидантных свойств индивидуальных веществ в одинаковом концентрационном диапазоне.

2. Кинетический критерий отражает количество кислорода и активных кислородных радикалов, прореагировавших с антиоксидантом (или суммарным содержанием антиоксидантов) за минуту времени. Размерность: мкмоль/л·мин. Формула:

$$K = \frac{C_0}{t} \left(1 - \frac{I}{I_0}\right), \quad (35)$$

где I — предельный ток электровосстановления кислорода в присутствии антиоксиданта в растворе, мкА, I_0 — предельный ток электровосстановления кислорода в отсутствие антиоксиданта в растворе, мкА, C_0 — исходная концентрация кислорода в растворе, мкмоль/л (приравнивается к растворимости кислорода в исследуемом электролите при н.у.), t — время экспозиции рабочего электрода при постоянном потенциале предельного тока кислорода, характеризующее протекания реакции взаимодействия антиоксиданта с активными кислородными радикалами, мин.

По процедуре выполнения анализа снимались вольтамперограммы тока ЭВ O_2 в фоновом электролите, а затем с добавкой антиоксиданта или исследуемого образца. Так как добавки антиоксиданта были достаточно малы (0.1 мл) по сравнению с объемом фонового электролита (10 мл), то изменениями концентрации молекулярного кислорода при добавке раствора с антиоксидантом можно пренебречь. Вольтамперограммы фиксировались каждый раз после выдерживания рабочего электрода в исследуемом растворе при потенциале

предельного тока ЭВ O_2 ($E = -0.3$ В для водных сред, $E = -0.6$ В для неводных сред) в течение 3 минут (рис. 11).

По полученным результатам строились графики зависимости функции $\left(1 - \frac{I}{I_0}\right)$ как доли прореагировавшего с антиоксидантом кислорода, от времени протекания процесса при постоянном содержании антиоксиданта в растворе (рис. 12).

По линейной части графика и по тангенсу угла наклона касательной к данному участку кривой рассчитывался кинетический критерий антиоксидантной активности образцов — K , мкмоль/л·мин по формуле (35). Например, для аскорбиновой кислоты ($C = 0.1$ мг/мл) его величина равна 1.15 мкмоль/л·мин.

Использование относительного изменения тока электровосстановления кислорода позволяет значительно повысить точность метода, избежать влияния растворителя, окружающей среды и других побочных факторов на определение суммарной антиоксидантной активности образцов.

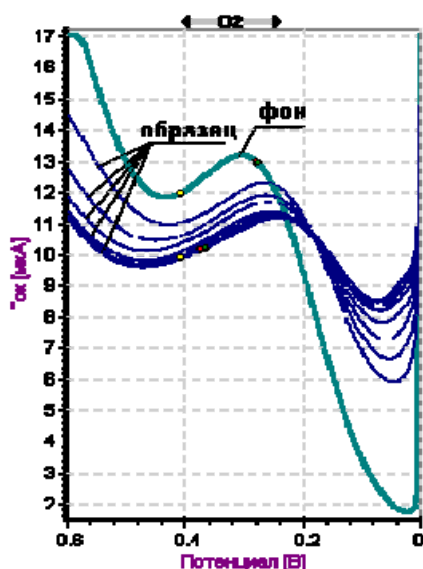


Рис. 11. Вольтамперограмма тока электровосстановления кислорода в присутствии аскорбиновой кислоты. Верхняя линия — фоновый ток в отсутствие образца в растворе. Нижние линии характеризуют уменьшение тока кислорода в зависимости от времени протекания реакции между кислородными формами и веществом в растворе.

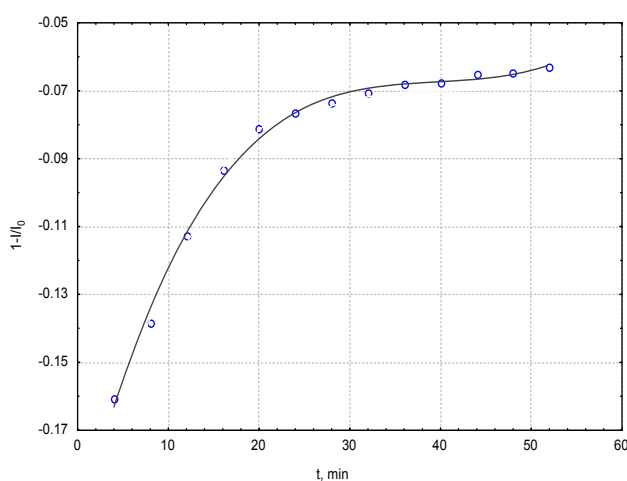


Рис. 12. Зависимость относительного изменения тока ЭВ O_2 от времени протекания процесса в присутствии аскорбиновой кислоты при $C = 0.01$ г/мл, фоновый электролит: фосфатный буфер $pH = 6.86$.

Кинетический критерий носит эмпирический характер. Он введен для удобства в интерпретации результатов определения суммарного показателя антиоксидантной активности сложных объектов (экстрактов растений, продукции пищевой, косметической, фармацевтической промышленности). Данный критерий также освобождается от необходимости привлечения стандартного антиоксиданта,

что весьма удобно для сравнительных определений антиоксидантной активности объектов.

Используя изученные закономерности и предложенные критерии, были исследованы антиоксидантные свойства ряда индивидуальных соединений, а также объектов искусственного и природного происхождения. Для определения антиоксидантной активности объектов основными рабочими условиями проведения эксперимента выбраны следующие: рабочий электрод - ртутно-пленочный, электрод сравнения и вспомогательный электрод - хлорид - серебряные, фоновый электролит - фосфатный буфер для водных сред (рН=6.86), 0.1М NaClO₄ для апротонных сред (диметилформамид).

Антиоксидантная активность некоторых флавоноидов по отношению к процессу ЭВ O₂

На основе полученных закономерностей определена антиоксидантная активность ряда флавоноидов (рутина, кверцетина, дигидрокверцетина и катехина). Предложен способ определения оптимальных концентрации и времени активного действия исследованных флавоноидов по отношению к процессу ЭВ O₂, используя методы планирования эксперимента. В качестве функции отклика (Y) было выбрано относительное изменение тока ЭВ O₂ в присутствии исследуемого АО: $Y=I/I_0$.

С использованием центрального ортогонального композиционного планирования получены уравнения регрессии для рассматриваемых флавоноидов с учетом значимости коэффициентов в оптимальной области факторного пространства:

$$\begin{aligned} \text{Рутин} & y=0.0699+0.0212x_1-0.0112x_2+0.0078x_1^2 \\ \text{Кверцетин} & y=0.1504-0.0373x_2-0.0112x_1x_2-0.0731x_1^2+0.0250x_2^2 \\ \text{Дигидрокверцетин} & y=0.0859-0.029x_1-0.0134x_2-0.0116x_1x_2+0.125x_1^2 \\ \text{Катехин} & y=0.0275+0.0083x_1+0.0090x_2+0.0030x_1x_2-0.0104x_1^2- \\ & 0.0144x_2^2 \end{aligned}$$

На основе полученных двухфакторных поверхностей отклика для каждого из веществ были определены оптимальные интервалы концентраций (X₁) и время активного действия (X₂) флавоноидов, а также их антиоксидантная активность, рассчитанная по кинетическому критерию.

По данным таблицы 3 наибольшую активность из рассмотренных флавоноидов проявил кверцетин, также, как и наибольшее время активного действия. Наименьшую концентрацию при наибольшей активности показал рутин.

Таблица 3.

Значения антиоксидантной активности образцов по отношению к процессу ЭВ O₂ при оптимальных значениях концентрации и времени взаимодействия (p=0.95, n=5)

Флавоноид	C _{эф.} *10 ⁶ , моль/л	t _{эф.} , мин	K, мкмоль/л·мин
Рутин	0.82 ± 0.04	40	0.12 ± 0.09
Катехин	1.40 ± 0.06	20	0.23 ± 0.05
Кверцетин	1.55 ± 0.04	45	0.27 ± 0.03
Дигидрокверцетин	3.20 ± 0.03	30	0.14 ± 0.06

Антиоксидантные свойства производных кумарина

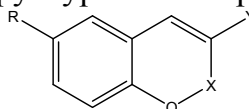
Кумарины представлены группой веществ, в основе которых лежит бициклическое ядро бензопирона (табл. 4). Методом вольтамперометрии исследованы антиоксидантные свойства некоторых вновь синтезированных производных кумаринов. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4.

Значения антиоксидантной активности производных кумаринов по отношению к процессу ЭВ O_2 ($p=0.95$, $n=5$)

№	X	Y	R	K , мкмоль/л·мин	$K_{емк_2}$ мл/Г
1	C=O	P(O)(OEt) ₂	H	0.11 ± 0.02	0.20 ± 0.05
2	P(O)(OEt)	C(O)OEt	H	0.10 ± 0.08	0.19 ± 0.03
3	C=O	P(O)(OEt)(OH)	H	0.09 ± 0.07	0.13 ± 0.06
4	C=O	P(O)(OEt) ₂	6-Br	0.13 ± 0.04	0.21 ± 0.02
5	C=O	P(O)(OEt) ₂	6-Cl	0.17 ± 0.06	0.26 ± 0.04
6	C=O	P(O)(OEt) ₂	7-N(Et) ₂	0.53 ± 0.05	0.36 ± 0.04

Где X, Y, R – заместители в структуре синтезированных кумаринов:



Для всех рассмотренных веществ наблюдается ингибирование катодного тока кислорода и сдвиг потенциала в положительную область. Также видна взаимосвязь между значениями емкостного и кинетического критериев, что говорит об активном влиянии на процесс ЭВ O_2 обоих факторов времени и концентрации исследуемых производных кумаринов в растворе.

Показано, что вновь синтезированные производные кумаринов обладают неплохой антиоксидантной активностью по отношению к процессу ЭВ O_2 , не уступающих по своим показателям природным аналогам, извлечение которых из растительного сырья достаточно трудоемкий и долговременный процесс.

Антиоксидантные свойства некоторых витаминов.

Среди витаминов наиболее известны как эффективные антиоксиданты водорастворимые витамины С, группы В, жирорастворимые витамины Е, А. Показатель антиоксидантной активности объектов определялся по относительному уменьшению тока ЭВ O_2 , используя кинетический критерий – K . Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 5.

Значения антиоксидантной активности, рассчитанных по кинетическому критерию для водорастворимых витаминов С, В₆, жирорастворимых витаминов Е, А ($p=0.95$, $n=5$)

Название витаминов	K , мкмоль/л·мин	
	C=0.599 мг/мл	C=1.195 мг/мл
Витамин А	10.01 ± 0.07	12.91 ± 0.03
Витамин Е	9.26 ± 0.04	11.29 ± 0.08
	C=0.100 мг/мл	C= 1.000 мг/мл
Витамин С	1.15 ± 0.08	1.43 ± 0.02
Витамин В ₆	0.32 ± 0.04	0.35 ± 0.07

Как видно из таблицы 5 активность витаминов зависит от их концентрации в растворе. Наиболее активен по отношению к процессу ЭВ O_2 витамин А из жирорастворимых и витамин С из водорастворимых витаминов из представленных в таблице.

Антиоксидантные свойства Se содержащих БАД

В данной работе исследовалась антиоксидантная активность ряда пищевых (биологически активных) добавок в различных диапазонах концентраций, содержащих селен.

Антиоксидантную активность селен - содержащих препаратов определяли с использованием емкостного критерия. Результаты исследований приведены в таблице 6.

Спектр действий селена внутри организма довольно широк. Он выполняет каталитическую, структурную и регуляторную функции, взаимодействует с витаминами, ферментами и биологическими мембранами, участвует в окислительно-восстановительных процессах, обмене жиров, белков и углеводов. Как видно из таблицы 6, все изученные образцы проявили в большей или меньшей степени антиоксидантную активность. Сравнительный анализ позволяет выделить такие образцы как «Селенактив» и «СеленЕС+J+Zn», которые наряду с их несомненной антиоксидантной активностью имеют и другие полезные свойства.

В БАД «Селенактив» Se содержится в форме ксантена в сочетании с витамином Е. Очевидно это сочетание наиболее эффективно, поскольку Se в данной форме усиливает как собственные антиоксидантные свойства биомолекулы так и свойства витамина Е.

Таблица 6.

Значения антиоксидантной активности Se -содержащих БАД, рассчитанные по емкостному критерию

Название БАД	Дополнительные компоненты	форма Se	C_{Se} , мкг/табл.	$C_{исх}$, г/мл	$K_{емк}$, мл/г	Sr
Селенактив	витамин Е	ксантен	35	0.1	27.66	0.08
Селен ЕС+I+Zn	I_2 , Zn; витамины С, Е, B_1 , B_2 и B_6	органический Se	10	0.1	12.2	0.09
Селен ЕС	витамины С и Е	органический Se	10	0.1	10.12	0.08
Селцинк плюс	Zn; витамины С, Е	селенит натрия	50	0.1	4.52	0.08

Полученные данные позволяют рекомендовать данные пищевые добавки в целях профилактики многих заболеваний, нормализации обмена веществ и укрепления организма. Однако, в данном случае необходимо строго соблюдать дозировку указанных веществ.

Определение показателя антиоксидантной активности объектов искусственного и природного происхождения

На основе полученных закономерностей влияния антиоксидантов на процесс электровосстановления кислорода была определена антиоксидантная активность

объектов искусственного (продукция пищевой, косметической, фармацевтической промышленности) и природного (экстракты растений, вытяжки из торфов) происхождения. Достаточно обширная база данных по суммарной антиоксидантной активности (АОА) собрана для экстрактов растений. На рисунке 13 показана диаграмма значений АОА для водно-этанольных экстрактов растений флоры Сибири.

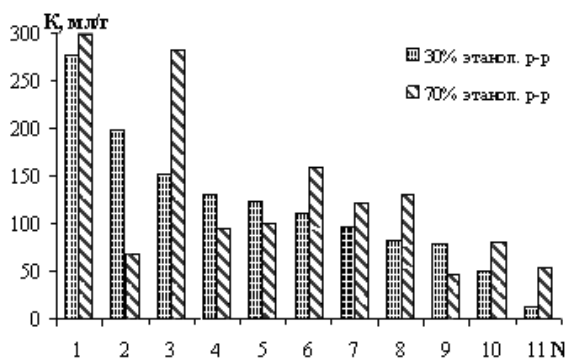


Рис. 13. Сравнительная диаграмма суммарной АОА исследуемых растительных объектов: 1-лист брусники, 2-злаки овса посевного, 3-корни полыни обыкновенной, 4-трава репешка обыкновенного, 5-злаки ячменя, 6-трава княжика сибирского, 7-трава чертополоха, 8-хвоя сосны обыкновенной, 9-цветы тысячелистника обыкновенного, 10-

плоды рябины сибирской, 11-сопло ольхи.

С целью разработки эффективных фитопрепаратов для профилактики различных заболеваний на основе экстрактов растений было проведено фракционирование экстрактов, и выявлена наиболее эффективная фракция, более полно извлекающая БАВ с антиоксидантными свойствами (таблица 7 на примере растения Альфредии).

Таблица 7.

Значения антиоксидантной активности фракций экстракта надземной части *Alfredia serotina*, полученного обработкой 70% этанолом, по отношению к процессу ЭВ O_2 ($p=0.95$, $n=5$)

Фракция	Кинетический критерий АОА (K), мкмоль/л·мин
Хлороформная	0.57 ± 0.03
Этилацетатная	0.65 ± 0.04
Бутанольная	0.56 ± 0.06
Водный остаток	0.16 ± 0.05

С использованием тонкослойной хроматографии выявлено следующее распределение биологически активных веществ по фракциям: основное количество флавоноидов сконцентрировалось в этилацетатной фракции, кумарины обнаружены в хлороформной и этилацетатной фракциях, фенолкарбоновые кислоты и тритерпеновые соединения – в хлороформной, этилацетатной и бутанольной фракциях. Следовательно, наиболее полно фенольные соединения, обладающие антиоксидантными свойствами, извлекает этилацетатная фракция, которая также показала наибольшую активность по отношению к процессу ЭВ O_2 .

В работе рассмотрена возможность применения метода катодной вольтамперометрии на основе процесса ЭВ O_2 к исследованию суммарной антиоксидантной активности продукции косметической промышленности. На

примере исследования антиоксидантных свойств сырья и готовой продукции фирмы «Кора» (г. Москва) определены оптимальные композиции экстрактов растений, введение которых позволило повысить общий антиоксидантный уровень продукции, улучшив ее качество (таблица 8).

Таблица 8.

Значения суммарной антиоксидантной активности косметической продукции, рассчитанные по емкостному критерию ($n=5$, $p=0.95$)

Название	I	II	III
	K , мл/г	K , мл/г	K , мл/г
тоник	89.88±0.05	79.66±0.03	75.44±0.07
крем без экстрактов	15.56±0.08	12.11±0.06	12.11±0.06
с экстрактами	90.69±0.05	92.70±0.08	88.43±0.03
гель без экстрактов	2.76 ±0.02	2.06 ±0.01	1.87 ±0.01
с экстрактами	49.80±0.05	50.64±0.01	44.06±0.02

Примечание. I – исходный продукт; II – разбавление в два раза;
III – разбавление в три раза

Из продукции пищевой промышленности рассмотрена антиоксидантная активность пищевых консервантов (таблица 9). Все указанные вещества хоть и в малой степени, но проявили антиоксидантную активность. Полученные данные объясняются структурными особенностями веществ, а именно влиянием электронных эффектов на кислотно-основные свойства веществ.

Таблица 9.

Значения АОА некоторых консервантов, рассчитанных по емкостному и кинетическому критериям ($n=5$, $p=0.95$)

Название	K , мл/г	K , мкмоль/л·мин
Сорбиновая кислота	15.32±0.08	0.49±0.09
Бензойная кислота	7.46±0.08	0.13±0.06
4-оксибензойная кислота	34.21±0.05	0.89±0.08
Метилловый эфир 4-гидроксибензойной кислоты	15.26±0.06	0.51±0.07
Этиловый эфир 4-гидроксибензойной кислоты	44.41±0.10	1.08±0.06
Пропиловый эфир 4-гидроксибензойной кислоты	77.89±0.08	1.31±0.09
Бутиловый эфир 4-гидроксибензойной кислоты	98.13±0.06	1.49±0.07

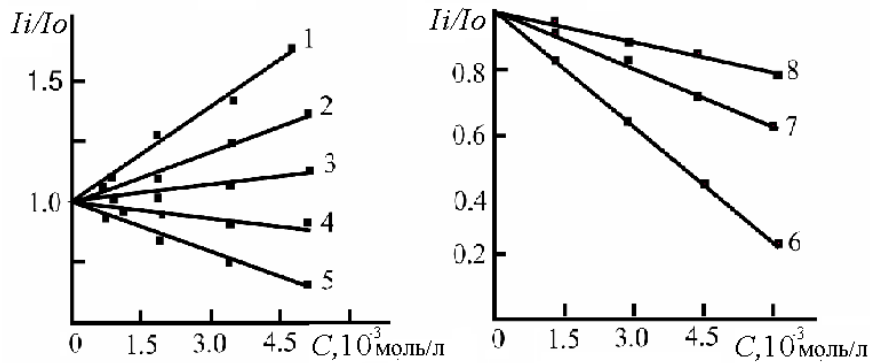
В работе рассмотрена возможность использования метода катодной вольтамперометрии и процесса ЭВ O_2 в анализе суммарной антиоксидантной активности биологических объектов на примере сыворотки крови мышей в норме и патологии. Методами планирования эксперимента определены оптимальные условия пробоподготовки биологических объектов для метода вольтамперометрии. Анализ полученных данных позволил сделать вывод о значительном уменьшении суммарной антиоксидантной активности сыворотки крови мышей в патологическом состоянии (таблица 10). Однако, для выявления закономерностей влияния патологии (в частности онкологии) на антиоксидантный статус организма требуется более обширный статистический материал.

Таблица 10.

Значения антиоксидантной активности сыворотки крови мышей, рассчитанные по критерию ORAC относительно стандартного антиоксиданта (аскорбиновой кислоты) в норме и патологии. $P=0.95$ $n=5$

Объект	Units ORAC
Сыворотка крови с карциномой Эрлиха 7-ые сутки	0.07 ± 0.03
Сыворотка крови здоровой мыши	0.32 ± 0.07
Аскорбиновая кислота	1 ± 0.02

Одним из немаловажных факторов, влияющих на антиоксидантную активность объектов, является pH среды. Особенно это важно для БАД, фито- и фарм-препаратов на основе антиоксидантов, которые употребляются с пищей, т.к. кислотная среда желудка может разрушить полезный антиоксидантный комплекс, принимаемый с пищей. Влияние данного фактора было рассмотрено на примере определения АОА токоферола моногликозида (ТМГ) – водорастворимой формы витамина Е (рис. 14). Показана не только существенная роль pH в определении АОА (таблица 11), но и характер введения препарата в организм животного (мышей). При введении ТМГ с пищей, кислотная среда желудка разрушала препарат, делала его бесполезным для организма. Только при $pH = 7.1-7.3$ (pH крови) АОА препарата была наивысшей, ТМГ защищал мышей от губительного действия радиации в экспериментальных исследованиях *in vivo* при введении препарата в кровь животных.



(1), 3.2 (2), 4.2 (3), 5.5 (4), 6.8 (5), 7.3 (6), 8.5 (7), 9.1 (8).

Рис. 14. Зависимость относительного изменения тока ЭВ O_2 от концентрации ТМГ (водорастворимая форма витамина Е) в растворах с различными значениями pH: 2.2

Таблица 11

Значения антиоксидантной активности токоферола моногликозида, рассчитанные по емкостному критерию, при разных значениях pH ($n=5$, $p=0.95$)

pH	K, мл/г	pH	K, мл/г
2.2	1.38 ± 0.07	6.8	103.94 ± 0.06
3.2	9.89 ± 0.10	7.3	253.61 ± 0.04
4.2	13.87 ± 0.11	8.5	99.22 ± 0.03
5.5	28.10 ± 0.11	9.1	65.81 ± 0.12

Исследование электрохимических свойств антиоксидантов методом циклической вольтамперметрии.

Следует отметить, что многие антиоксиданты, обладая хорошими восстановительными способностями, легко окисляются и восстанавливаются на электроде, поэтому для большинства антиоксидантов электрохимические свойства достаточно хорошо изучены. Это касается флавоноидов, большинства витаминов.

Проведение исследований электрохимических свойств антиоксидантов преследовало в данной работе две цели: 1. определение потенциалов окисления – восстановления, поиск оптимальных условий для аналитического определения некоторых вновь синтезированных антиоксидантов, таких как производные антипирина, антипириламида. 2. Выявление взаимосвязи между антиоксидантными свойствами и электрохимическими параметрами исследуемых соединений фенольной природы.

В последнее время группе антипиринов уделяется большое внимание в связи с их широким использованием в медицине как болеутоляющих и противовоспалительных средств. Особый интерес представляют галогенпроизводные антипиринов (Cl, Br, I антипирины) (рис.15).

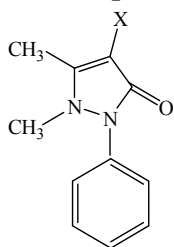


Рис. 15. Структурная формула антипирина и его галогенпроизводных, где X – H, Cl, Br, I.

Экспериментальное исследование проводилось в условиях дифференциального режима циклической вольтамперметрии. В качестве рабочего и вспомогательного электродов использовались стеклоуглеродные, а электрода сравнения – хлорид-серебряный электрод. На рис. 16, 17 представлены характерные циклические вольтамперограммы для антипирина и градуировочный график зависимости тока электроокисления антипирина (аналитический сигнал) от его концентрации в растворе в диапазоне $3 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-3}$ моль/л, достаточном для его определения в лекарственной форме.

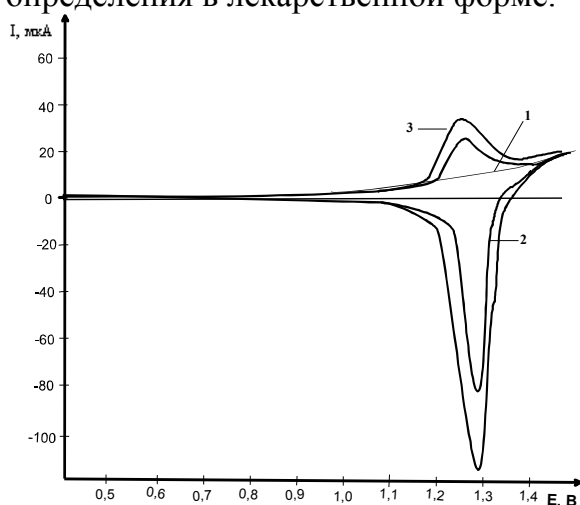


Рис.16. Циклические вольтамперограммы антипирина на СУЭ в фоновом электролите 0.1 М NaClO₄ в С₂Н₅ОН: $5.96 \cdot 10^{-4}$ моль/л (2), $8.92 \cdot 10^{-4}$ моль/л (3); 1 – фоновая кривая.

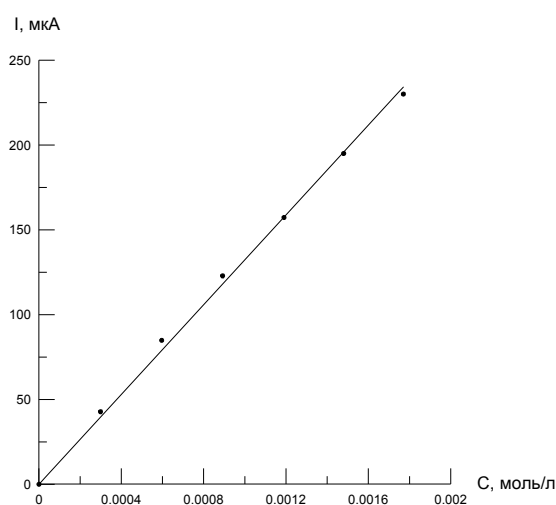


Рис.17. Градуировочная зависимость тока электроокисления от концентрации антипирина на СУЭ в фоновом электролите 0.1 М NaClO₄ в С₂Н₅ОН.

Подобные зависимости были получены для всех исследуемых антипиринов. Следует отметить, что форма циклических вольтамперных кривых и разность потенциалов анодных и катодных пиков, удовлетворяет условию при $n=1$:

$$E_a - E_c = 2.22 \frac{RT}{nF} = \frac{0.058}{n}, \quad (36)$$

что, говорят об обратимости процесса окисления и восстановления антипирина и его галогенпроизводных.

В таблице 12 приведены значения потенциалов окисления – восстановления галоген производных антипирина, из которых видно, что легче всего окислению подвергается антипирин, затем йод-, бром- и хлор- производные, что согласуется с литературными данными.

Таблица 12

Потенциалы пиков окисления и восстановления антипирина и его галогенпроизводных

Название	$E_{ок}, В$	$E_{вос}, В$
антипирин	$+1.29 \pm 0.01$	$+1.25 \pm 0.01$
Cl-антипирин	$+1.39 \pm 0.02$	$+1.34 \pm 0.02$
Br-антипирин	$+1.39 \pm 0.03$	$+1.33 \pm 0.03$
I-антипирин	$+1.31 \pm 0.01$	$+1.25 \pm 0.01$

Наличие взаимосвязи между антиоксидантной активностью (АОА) и потенциалами окисления веществ было оценено на примере ряда флавоноидов (катехин, рутин, кверцетин и дигидрокверцетин). Электрохимические свойства флавоноидов были изучены с помощью метода циклической вольтамперометрии. Исследование проводилось в условиях дифференциального режима на стеклоуглеродном электроде (СУЭ). В таблице 13 приведены значения потенциалов окисления и восстановления веществ. На рис. 18. представлена зависимость между потенциалами окисления исследованных флавоноидов и значениями их АОА.

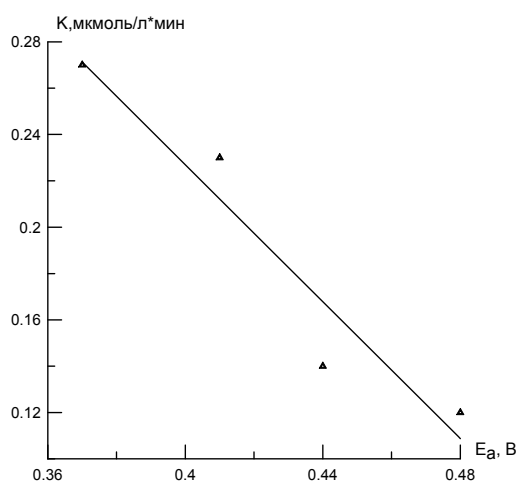


Рис. 18. Зависимость между значениями АОА, рассчитанными по кинетическому критерию и потенциалами окисления флавоноидов. $r = 0.96$.
Уравнение регрессионной зависимости:

$$K = 0.82 - 1.48 \cdot E_{ок}$$

Рассмотрев несколько групп сходных по структуре соединений, можно с уверенностью говорить, что наблюдается взаимосвязь между потенциалами окисления веществ и их АОА по отношению к процессу ЭВ O_2 . Чем легче окисляется вещество, т.е. чем меньше его потенциал окисления, тем больше его АОА по отношению к процессу ЭВ O_2 .

Таблица 13.

Потенциалы пиков окисления - восстановления исследуемых флавоноидов и значение кинетического критерия их АОА по отношению к процессу ЭВ O_2 ($n=5$, $p=0.95$)

Флавоноид	$E_{ок}, В$	$E_{вос}, В$	$K, мкмоль/(л \cdot мин)$
Рутин	0.48 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.12 ± 0.05
Дигидрокверцетин	0.44 ± 0.04	0.24 ± 0.02	0.14 ± 0.04
Катехин	0.41 ± 0.04	0.20 ± 0.03	0.23 ± 0.02
Кверцетин	0.37 ± 0.03	0.14 ± 0.02	0.27 ± 0.03

Сравнительные испытания определения антиоксидантной активности объектов с использованием разных методов

На сегодняшний день спектр методов определения суммарной антиоксидантной активности веществ весьма разнообразен. Однако зачастую сравнивать данные, полученные разными методами, не представляется возможным, поскольку методы основаны на различных принципах измерения, модельных системах, имеют разную размерность показателя АОА. Иногда сравнивать численные значения нецелесообразно, но можно провести корреляцию между результатами, полученными разными методами.

В первом случае в качестве метода сравнения был выбран спектрофотометрический метод с ферментативной системой генерации кислородных радикалов.

Спектрофотометрическая методика (СФМ) определения антиоксидантной активности основывалась на способности антиоксидантов конкурировать с нитросиним тетразолием (НСТ) за супероксидные анион радикалы, образующиеся в результате аэробного взаимодействия восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида (НАД•Н) и феназинметасульфата (ФМС). В результате этой реакции НСТ восстанавливается с образованием формазана (синего цвета). В присутствии антиоксидантов процент восстановления НСТ уменьшается.

Сравнение результатов определения АОА разными методами было проведено на примере определения АОА ряда флавоноидов с использованием критерия IC_{50} , показывающего концентрацию антиоксиданта при ингибировании модельного сигнала на 50% (таблица 14).

Таблица 14.

Значения критерия IC_{50} , определенные спектрофотометрическим и вольтамперометрическими методами, для ряда флавоноидов ($p=0.95$, $n=5$)

Название вещества	Спектрофотометрический метод, $IC_{50}^* \times 10^2 (M)$	Вольтамперометрический метод, $IC_{50} \times 10^2 (M)$
Рутин	0.13 ± 0.02	0.82 ± 0.04
Дигидрокверцетин	0.53 ± 0.04	1.03 ± 0.05
Бензойная кислота	3.55 ± 0.03	4.19 ± 0.05
Аскорбиновая к-та	3.72 ± 0.03	4.87 ± 0.03
Кверцетин	5.17 ± 0.02	5.89 ± 0.03
Катехин	7.92 ± 0.04	8.22 ± 0.04

Из данных таблицы 14 видно, что численного совпадения результатов нет, что и было ожидаемо, поскольку модельные реакции методов различны. Однако

можно говорить о корреляции результатов полученных двумя разными методами, что является косвенным доказательством правильности представленных результатов. Оба метода были поставлены в одной лаборатории на одних и тех же образцах.

Подобные исследования были проведены на комплексах меди с органическими лигандами. Кроме ферментативной системы в данном случае использовалась еще и ферментативная ксантин / ксантиноксидазная система генерации супероксид анион радикалов. Результаты сравнительных испытаний представлены в таблице 15.

Как видно из представленных данных, большая сходимость результатов наблюдается между СФМ с ферментативной системой и вольтамперометрическим методом.

Таблица 15.

Значения антиоксидантной активности синтезированных комплексов меди, измеренная тремя различными способами ($p=0.95$, $n=5$)

Соединение	Спектрофотометрический метод		с Вольтамперометрический метод, IC ₅₀ , μM	Δ, % методы а,с
	а Ксантин оксидазная система IC ₅₀ , μM	б PMS/NADH система, IC ₅₀ , μM		
CuL ₁ (NO ₃) ₂	0.79 ± 0.03	0.45 ± 0.05	0.85 ± 0.09	7.31
[CuL ₃ (NO ₃) ₂]· 2H ₂ O	2.14 ± 0.05	0.79 ± 0.04	1.95 ± 0.04	-9.31
Cu(NO ₃) ₂	2.33 ± 0.06	1.10 ± 0.02	2.35 ± 0.02	0.85

Для достоверности результатов в работе было проведено сравнение трех методов: флуориметрического, амперометрического с использованием биосенсора на основе супероксидсмутазы (СОД) и вышеописанного вольтамперометрического. определения АОА производных ацетилсалициловой кислоты (табл. 16).

Таблица 16.

Значения антиоксидантной активности производных ацетилсалициловой кислоты, измеренные 3-мя методами.

№ обра зца	а	б	с	Δ, % $\frac{(c-a)}{c}$	Δ, % $\frac{(c-b)}{c}$
	Метод биосенсоров (ORAC units)	Метод вольтамперо- метрии (ORAC units)	Флуориметри- ческий метод (ORAC units)		
1	93.7	96.3	96.3	+2.6	0.0
2	92.2	95.7	94.1	+2.0	-1.7
3	86.3	78.7	82.1	-5.1	+4.1
4	83.3	76.8	80.2	-3.8	+4.2
5	81.8	74.2	75.9	-7.7	+2.2
6	66.9	72.5	70.0	+4.4	-3.5
7	62.4	71.5	69.3	+9.9	-3.1

Все методы были воспроизведены и выполнены в одной лаборатории (Rome University Italia). За основной метод был взят флуориметрический метод, по отношению к нему считались погрешности методов. Показатель АОА определялся с помощью критерия, выраженного в единицах ORAC, по формуле (32)

По результатам, представленным в таблице 16 видно, что полученные данные хорошо коррелируют между собой. А погрешность метода вольтамперометрии относительно метода флуориметрии имеет как положительные, так и отрицательные значения, в результате чего можно говорить, что имеет место случайная составляющая погрешности в пределах 10 %.

Методика определения антиоксидантной активности объектов искусственного и природного происхождения.

На данный момент существует ряд методик определения как антиоксидантной активности, так и суммарного количества антиоксидантов в различных объектах. Однако достаточно мало методик, прошедших метрологическую аттестацию. Этот факт связан с множеством проблем:

- нет стандартных образцов антиоксидантов;
- методы основаны на различных принципах и модельных реакциях, поэтому результаты измерений, полученные разными методами, имеют разную размерность и практически несопоставимы друг с другом;
- нет единой размерности и нормированного показателя АОА.

Для выхода из сложившейся ситуации и успешной аттестации методики было предложено оценивать показатель антиоксидантной активности в объектах искусственного и природного происхождения в пересчете на концентрацию аскорбиновой кислоты по градуировочному графику относительного изменения тока электровосстановления кислорода от ее концентрации в растворе (рис. 19)

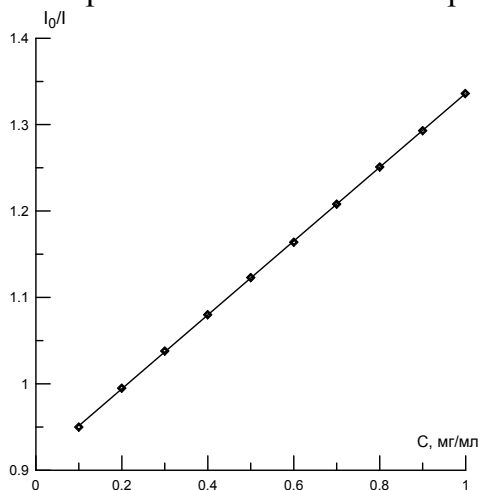


Рис. 19. Зависимость относительного изменения тока ЭВ O_2 от концентрации аскорбиновой кислоты на РПЭ в фоновом электролите 0.025 М фосфатном буфере (pH = 6.86)

Далее из данной зависимости по величине относительного изменения тока ЭВ O_2 в присутствии исследуемого объекта определяется показатель антиоксидантной активности исследуемых объектов. На основании полученных данных выведено уравнение регрессии зависимости относительного изменения тока ЭВ O_2 от концентрации аскорбиновой кислоты в растворе фонового электролита в диапазоне концентраций $C = 0 \div 1$ мг/мл:

$$I_0/I = 0.910 + 0.427 \times C \quad (36)$$

Проведена проверка гипотезы линейности данного градуировочного графика. Оценена адекватность математической модели по критерию Фишера. В представленном диапазоне концентраций модель адекватна.

Для подготовки методики к метрологической аттестации были определены метрологические характеристики методики, представленные в таблице 17. По полученным метрологическим показателям для рассматриваемых поддиапазонов концентрации аскорбиновой кислоты принято решение приписать наибольшую погрешность (23%) для всей области концентраций линейного участка градуировочной характеристики.

Таблица 17.

Метрологические характеристики методики определения показателя антиоксидантной активности по отношению к процессу ЭВ O_2 в пересчете на концентрацию аскорбиновой кислоты при $p = 0.95$, $n=3$, $l=10$

Измеряемая концентрация, C_x (мг/мл)	0.100	0.500	0.999
Показатель повторяемости S_{rm} (мг/мл)	0.0045	0.0476	0.0719
Показатель внутрилабораторной прецизионности, S_{Rm} мг/мл	0.0119	0.0549	0.0852
Показатель точности, Δ_m	0.0232	0.1078	0.1669
ε , %	22.9%	21.5%	16.7%

Вольтамперометрический анализатор «Антиоксидант»

На основании предложенной методики был разработан вольтамперометрический анализатор «Антиоксидант» для определения показателя АОА в различных объектах. Внешний вид анализатора представлен на рис. 20. Анализатор представляет собой настольный лабораторный прибор.

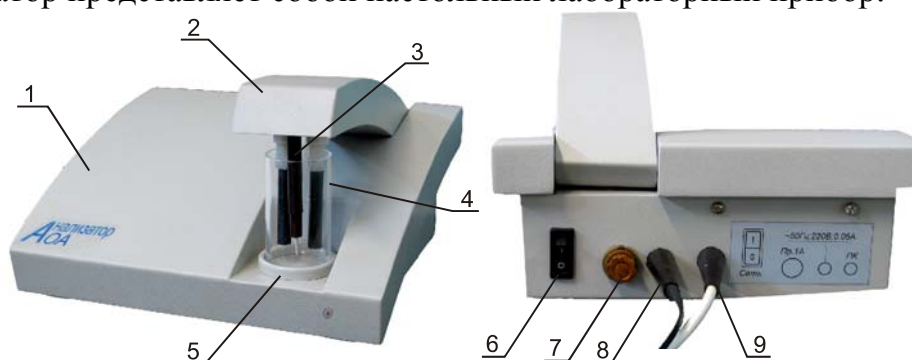


Рис.1

Рис. 20. 1. Корпус, 2. Держатель электродов, 3. Разъемы для фиксации электродов, 4. Стаканчик с анализируемым раствором, 5. Магнитная мешалка, 6. Выключатель питания, 7. Держатель предохранителя, 8. Ввод сетевого кабеля, 9. Ввод кабеля связи с ПК.

Прибор прошел государственные испытания с целью утверждения типа СИ, по результатам которых ему присвоен тип средства измерения – «Анализатор АОА» с приписанными метрологическими и техническими характеристиками. Анализатор сертифицирован Федеральным агентством по техническому

регулированию и метрологии РФ (Сертификат RU.C.31.113.A № 28715) и внесен в единый ГОСреестр СИ под номером 35466-07. В настоящее время анализатор прошел международную сертификацию в Чехии (г. Прага) и допущен к применению в аналитических и научно-исследовательских лабораториях Европы и Америки.

Анализатор «АОА» и вольтамперометрическая методика определения суммарной антиоксидантной активности объектов нашли широкое применение в аналитических и научно-исследовательских лабораториях России и за рубежом.

Основные результаты и выводы

1. Предложен и обоснован новый подход на основе метода вольтамперометрии и модельной системы: кислород, активные формы кислорода – антиоксидант для оценки суммарной антиоксидантной активности объектов искусственного и природного происхождения. На основе исследования влияния различных факторов: материала электрода, рН среды, природы растворителя, концентрации молекулярного кислорода, на процесс электровосстановления кислорода показана возможность использования относительного изменения тока электровосстановления кислорода в присутствии антиоксидантов на ртутно – пленочном электроде как средство измерения антиоксидантной активности объектов искусственного и природного происхождения.
2. Проведены и обобщены исследования по влиянию поверхностно активных веществ, сопутствующих антиоксидантам в различных объектах, на процесс электровосстановления кислорода. Показан неоднозначный характер данного влияния, зависящий от материала электрода, рН среды, типа ПАВ. Показано, что только на платиновых металлах в кислых средах наблюдается пропорциональное уменьшение тока ЭВ O_2 в присутствии ПАВ. На ртутно - пленочном электроде подобной закономерности не обнаружено, что дает возможность использовать данный процесс для определения антиоксидантной активности в присутствии поверхностно активных веществ.
3. Изучены физико-химические закономерности процесса электровосстановления кислорода в присутствии антиоксидантов различной природы. Предложены преимущественные механизмы взаимодействия антиоксидантов с кислородом и его активными формами. Установлено, что для каталазы, как фермента антиоксидантной природы, характерен механизм с последующей химической реакцией диспропорционирования и частичной регенерацией деполяризатора. В присутствии антиоксидантов фенольной природы наблюдается преимущественное протекание электродного процесса восстановления кислорода с последующими химическими реакциями взаимодействия антиоксидантов с активными кислородными радикалами. Для N, S и Se содержащих антиоксидантов характерен механизм с преимущественным протеканием предшествующей химической реакцией взаимодействия с молекулярным кислородом.
4. Установлены два новых количественных критерия для определения антиоксидантной активности объектов: емкостный $(\text{мг/л})^{-1}$ критерий, отражающий степень изменения тока электровосстановления кислорода в зависимости от концентрации антиоксиданта в растворе; кинетический критерий (мкмоль/л мин), показывающий концентрацию кислорода и его активных форм, прореагировавших с антиоксидантом за минуту времени. Данные критерии

освобождали от необходимости использовать стандартный антиоксидант и использовались в работе наряду с общеизвестными критериями *ORAC*, отражающему способность поглощать кислородные радикалы, отнесенному к стандартному антиоксиданту (безразмерная величина), критерием IC_{50} , моль/л, показывающему концентрацию антиоксиданта при ингибировании модельного сигнала на 50%, критерием суммарной антиоксидантной активности, моль/л, рассчитанному по градуировочному графику в пересчете на концентрацию стандартного антиоксиданта.

5. Проведена оценка антиоксидантной активности по отношению к процессу электровосстановления кислорода индивидуальных антиоксидантов различной природы: каталазы, гуминовых кислот, фталоцианинов металлов, ряда флавоноидов, производных кумарина, витаминов E, A, C, группы B₆, аскорбатов металлов, коэнзима Q₁₀, соединений фенольной природы (агидол, фенозан, ионол, фенол), селенсодержащих БАД, производных антипирина, антипириламида, бенздиазепина, имеющих фармацевтическое значение. Показано, что большую активность из этого ряда проявляют кверцетин, рутин, витамины C, A, E, аскорбаты кальция и магния. Показано, что антиоксидантная активность объектов зависит от концентрации антиоксидантов, времени их взаимодействия с кислородом и его активными радикалами, рН среды, совместимости компонентов в смесях антиоксидантов и их соотношении.
6. Проведена оценка суммарной антиоксидантной активности объектов искусственного (продукция пищевой, косметической, фармацевтической промышленности) и природного (экстракты растений) происхождения. Выявлено значительное влияние ряда факторов (рН среды, природы растворителя при выделении компонентов растительного сырья, совместимости компонентов в смесях) на антиоксидантные свойства объектов. На примере токоферола моногликозида показано, что данный антиоксидант наиболее активен в нейтральной области рН (7.1 – 7.3). При фракционировании экстрактов растений выявлена наиболее активная этилацетатная фракция, которая рекомендована для наиболее полного извлечения биологически – активных веществ из растительного сырья. При оценке совместимости компонентов в смесях антиоксидантов показано, что при увеличении числа компонентов (больше 2) их суммарная антиоксидантная активность падает, при этом аддитивности сигнала не наблюдается. На основе данных исследований предложена наиболее эффективная композиция из исследованных антиоксидантов (аскорбиновая кислота, дигидрокверцетин (1:1)). На примере косметической продукции показано, что введение смеси экстрактов растений (солодка, люцерна, хмель, клевер) увеличивает суммарную антиоксидантную активность продукции.
7. Получены математические модели первого и второго порядков для определения активности антиоксидантов на примере флавоноидов в зависимости от концентрации и времени их взаимодействия с кислородом и его активными формами. Полученные уравнения позволяют оценивать эффективные концентрации и время активного действия антиоксидантов по отношению к процессу электровосстановления кислорода.
8. Проведены исследования электрохимических свойств ряда антиоксидантов. Особое внимание уделено впервые синтезированным соединениям с антиоксидантными свойствами, таким, как производные антипирина, антипириламида, кумарина. Установлены механизмы протекания электродных

процессов окисления – восстановления исследованных веществ, показан обратимый характер протекания процессов. Методом циклической вольтамперометрии найдены потенциалы окисления – восстановления данных веществ, определены оптимальные условия получения аналитического сигнала, построены градуировочные зависимости, определен диапазон определяемых концентраций: $3 \cdot 10^{-4}$ – $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л, достаточный для их определения в лекарственной форме

9. Установлена взаимосвязь между значениями потенциалов окисления – восстановления веществ и их антиоксидантной активностью по отношению к процессу электровосстановления кислорода на примере ряда флавоноидов и витаминов.
10. Разработана методика выполнения измерений (МВИ) показателя антиоксидантной активности объектов искусственного и природного происхождения на основе полученных закономерностей. В соответствии с регламентированной процедурой аттестации МВИ рассчитаны основные метрологические характеристики анализа (показатель повторяемости, точности, внутрिलाбораторной прецизионности. Проведены сравнительные испытания методики с другими, уже зарекомендовавшими себя методами определения антиоксидантной активности, в частности, методом спектрофотометрии с двумя разными системами генерации кислородных радикалов: ферментативной на основе ксантин/ксантиноксидазной системы и неферментативной PMS/NADH системой, флуориметрическим, амперометрическим на основе биосенсора с СОД, кинетическим методами. Полученные данные показали хорошую сходимость результатов, расхождение между которыми для большинства методов не превышает 10%.
11. Разработан новый вольтамперометрический анализатор «Антиоксидант» для определения показателя антиоксидантной активности объектов искусственного и природного происхождения. Прибор прошел государственные испытания с целью утверждения типа СИ, по результатам которых ему присвоен тип средства измерения – «Анализатор АОА» с приписанными метрологическими и техническими характеристиками. Анализатор сертифицирован Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии РФ (Сертификат RU.C.31.113.A № 28715) и внесен в единый ГОСреестр СИ под номером 35466-07. В настоящее время анализатор прошел международную сертификацию в Чехии (г. Прага) и допущен к применению в аналитических и научно-исследовательских лабораториях Европы и Америки.

Основное содержание диссертации опубликовано в следующих работах:

1. Ю. А. Карбаинов, Е. И. Короткова. Влияние различных факторов на ток электровосстановления кислорода в вольтамперометрии на электродах ограниченного объема // **Журн. Аналит. химии, 1991, т.46, № 2, С. 328-333.**
2. Ю. А. Карбаинов, Е. И. Короткова. Влияние состава водно-спиртовых смесей и адсорбции ПАВ на величину ост. тока в ИВ. // **Изв. ВУЗов. Химия и хим. технология, 1990, № 3, С.139-143.**
3. Е. И. Короткова. Вольтамперометрический способ определения активности антиоксидантов // **Журн. физич. химии, 2000, Т. 74, № 9. С. 1704—1706.**
4. Е. И. Короткова. Влияние антиоксидантов на процесс электровосстановления кислорода. // **Теория электроаналитической химии и метод ИВ. Материалы симпозиума, Томск, 28 сентября – октября 2000г. Томск: Изд-во ТПУ, 200, С. 242—244.**
5. E. I. Korotkova, Yu. A. Karbainov, A. V. Shevchuk. Study of antioxidant properties by voltammetry. // **J. Electroanal. Chem. 2002. V. 508. № 1. 56-60.**
6. Е. И. Короткова, Ю. А. Карбаинов, О. А. Аврамчик. Вольтамперометрическое определение антиоксидантной активности растительного сырья и некоторых продуктов питания // **Изв. вузов. Химия и хим. технология. 2002.т.45 № 3, с. 110-112.**
7. Н. В. Юдина, А. В. Зверева, Е. И. Короткова, О. А. Аврамчик. Гуминовые кислоты в процессе электровосстановления кислорода. // **Изв. вузов. Химия и хим. технология. 2002. Т.45, № 3, с. 106-108.**
8. В. Д. Филимонов, Ю. А. Карбаинов, Е.И. Короткова, Н.В. Башкатова, В. В. Воловоденко. Исследование связи между электрохимическими параметрами ряда производных карбазола и антипирина и их квантово-химическими характеристиками. // **Изв. вузов. Химия и хим. технология. 2002. № 3, с. 75-79.**
9. E.I. Korotkova, Y.A. Karbainov, O.A. Avramchik. Investigation of antioxidant and catalytic properties of some biologically active substances by voltammetry. // **Anal and Bioanal Chem, 2003, v. 375, N 1-3, 465-468.**
10. О.А. Аврамчик, Е.И. Короткова, Н.И. Белоусова, Е.В. Белоусов, А.Э. Куценко, Г.Ц. Дамбаев. Применение оксигенированных инфузионных растворов в лечении больных бронхиальной астмы. // **Бюллетень сибирской медицины, 2003, т.2, №1, с. 78-83.**
11. Е.И. Короткова, Н.В. Башкатова, Ю.А. Карбаинов. Физико-химические закономерности электродных процессов в инверсионной вольтамперометрии органических соединений с предшествующей реакцией протонизации. // **Изв. Вузов. Серия «Химия и химич. Технология», 2003, т. 46, № 3, с. 115-118.**
12. E.I. Korotkova, O.A. Avramchik, Y.A. Karbainov, K.M. Kostyrev. Investigation of antioxidant properties of some foodstuff by voltammetry // **Book Proceed Int. Conf. Euro Food Chem XII. Brugge, Belgium, 24-26 September 2003., v.1, p. 199-202**
13. Е.И. Короткова, О.А. Аврамчик, М.С. Юсубов, М.В. Белоусов, Т.И. Андреева. Определение антиоксидантной активности экстрактов растительного сырья методом катодной вольтамперометрии // **Химико – фармацевтический журнал, т. 37, №9, 2003, с. 55-57.**

14. E.I. Korotkova, Karbainov, Y.A., Avramchik, O.A., Bakibaev, A.A. New electrochemical sensor for antioxidant activity determination. // In book "Instrumental Methods of Analysis. Modern Trends and Applications. Conference Proceedings of 3-rd International conference". ZITI, Greece, 2003, P.707-710.
15. Н.В. Юдина, А.В. Савельев, А.А. Иванов, Е.И. Короткова, О.И. Ломовский. Каталитические свойства механоактивированных гуминовых препаратов в процессе электровосстановления кислорода.// **Журнал прикладной химии т. 77, №1, 2004.С. 48-53**
16. Е.И. Короткова, Е.А. Мамаева, Н.В. Башкатова, А.А. Бакибаев. Электрохимическое определение антиоксидантных свойств 1,4 – бенздиазепинов.// **Химико-фармацевтический журнал, №3, 2004, с. 52-54**
17. Korotkova E.I., O.A. Avramchik, Karbainov Y.A., Kagiya T. V., Tcherdyntseva N.V. Study of antioxidant properties of a water-soluble vitamin E derivative - Tocopherol monoglucoside (TMG) by differential pulse voltammetry // **Talanta, V.63 (3), 2004, pp. 729-734.**
18. Е.И. Короткова, О.А. Аврамчик, И.Г. Каморзина, Ю.А.Карбаинов, А.Н.Лукина. Новый вольтамперометрический метод определения антиоксидантной активности косметической продукции // **Заводская лаборатория. Диагностика материалов. №8, 2004, с13-17**
19. Т.И. Андреева, Е.И. Комарова, М.С. Юсубов, Е.И. Короткова. Антиоксидантная активность коры калины обыкновенной. // **Химико – фармацевтический журнал, 2004, т.38, №10. с. 26-29.**
20. Ю.А. Карбаинов, Е.И. Короткова, Н.В. Башкатова, Г.Б. Слепченко. Необратимые электродные процессы в катодной вольтамперометрии органических соединений с предшествующей химической реакцией протонизации. // **Изв. ВУЗов. Серия Химия и химическая технология, 2004, т.47, вып. 9, стр. 116-119**
21. O.A. Avramchik, E.I. Korotkova, E.V. Plotnikov, A.N. Lukina, Y.A. Karbainov. Antioxidant and electrochemical properties of calcium and lithium ascorbates.// **J. Pharmaceutical and biomedical analysis, v.37, 2005, p. 1149-1154.**
22. N.V. Bashkatova, E.I. Korotkova, Yu.A. Karbainov, A.Yu. Yagovkin, A.A. Bakibaev. Electrochemical, quantum- chemical and antioxidant properties of antipyrine and its derivatives. // **J. Pharmaceutical and biomedical analysis, v.37, 2005, p. 1143-1147.**
23. Е.И. Короткова, В.И. Чернов, А.Н. Лукина, Л.А. Гончаров. Прибор и метод определения суммарной антиоксидантной активности пищевых добавок.// **Материалы научно - практ. конф, «Технологии и продукты здорового питания». г. Москва. 6-8 июня 2005г. с. 102-109.**
24. Е.В. Дорожко, Е.И. Короткова, Ю.А. Карбаинов. Исследование антиоксидантных свойств глутатиона методом вольтамперометрии.// **Материалы Международ. симпозиума «Молекулярные механизмы регуляции функции клетки». г. Тюмень. 12-16 сентября 2005г. с.53-55.**
25. E.I. Korotkova, O.A. Avramchik, T.M. Angelov, Y.A. Karbainov. Investigation of antioxidant activity and lipophilicity parameters of some preservatives.// **Electrochim. Acta. v.51. N 2. 2005. 324-332**
26. Е.И. Короткова, А.Н. Лукина, Л.А. Гончаров, В.М. Мисин. Анализатор для определения суммарной антиоксидантной активности объектов. // **8-ой Международный семинар-презентация инновационных научно-технических**

- проектов «Биотехнология-2005». 18-19 ноября 2005г. Пушино. - Материалы научно - практич. конференции, Пушино, 2005, с. 163-168.
27. Schepetkin I., Potapov A., Khlebnikov A., Korotkova E., Lukina A., Malovichko G., Kirpotina L., Quinn MT. Decomposition of reactive oxygen species by copper(II) bis(1-pyrazolyl)methane complexes. // **J. Biol. Inorg. Chem.** **2006; v.11, N 4, p. 499-513.**
 28. А.Н. Лукина, Е.И. Короткова, Ю.А. Карбаинов. Исследование антиоксидантных свойств некоторых аскорбатов и смесей на их основе.// Материалы Междун. Научн. конф. «Химия, химическая технология и биотехнология на рубеже тысячелетий», Томск 11-16 сентября 2006г.- Томск, т.2, с.91- 93.
 29. Ю.А. Карбаинов, Е.И. Короткова. Вопросы теории вольтамперометрии антиоксидантов. // Материалы Междун. Научн. конф. «Химия, химическая технология и биотехнология на рубеже тысячелетий», Томск 11-16 сентября 2006г.- Томск, т.2, с.248-249.
 30. А.С. Боев, Е.И. Короткова, А.А. Бакибаев. Voltammetric method of B6 vitamin determination. // Inter. conf. “Chemistry, Chemical engineering and Biotechnology”, Tomsk, 11 – 16 September 2006.- Book of abstracts v.2. p. 165-166.
 31. И.В. Шилова, Е.А. Краснов, Е.И. Короткова, М.Г. Нагаев, А.Н. Лукина. Антиоксидантная активность экстрактов наземной части лабазника вязолистного. // **Химико – фармацевтический журнал.** т. **40**, № **12**. **2006г.** с. **22-24.**
 32. Л.И. Драчева, Е.И. Короткова, А.Н. Лукина, Антиоксидантные свойства пробиотиков // **Ж. Молочной промышленности.** № **12** **2006г.** с. **62-63**
 33. Л.В. Драчева, Е.И. Короткова, А.Н. Лукина. Исследование антиоксидантной активности биокомпозиций на основе пробиотиков // **Пищевая промышленность,** № **3**, **2007г.** с.14 – 15.
 34. А.А. Ivanov, N.V. Yudina, E.I. Korotkova, O.I. Lomovsky. Antioxidants in the Water-Soluble Carbohydrate Fractions of the Moss *Sphagnum Fuscum* and *Sphagnum Peat*. // **Solid Fuel Chemistry, v.42, N 2, 2008, p.68-73.**
 35. И.В. Шилова, Н.В. Кувачева, Е.И. Короткова, Е.А. Краснов, О.В. Никитина, А.Н. Лукина, Н.А. Некратова, А.И. Пяк. Антиоксидантные свойства биологически активных веществ ALFREDIA CERNUA и A. NIVEA (ASTERACEAE). // **Растительные ресурсы, вып. 1, 2008, с. 114-121.**
 36. Л.В. Драчева, Е.И. Короткова, Е.В. Дорошко. Применение вольтамперометрического метода при изучении биоантиоксидантов. // **Пищевая промышленность.** № **4**, **2008,** с. **28-29.**
 37. И.В. Шилова, А.Н. Вторушина, Е.И. Короткова. Черника обыкновенная – источник биологически активных веществ с антиоксидантными свойствами. // Сб. статей Всероссийской научно-практической конференции «Здоровое питание – основа жизнедеятельности человека», Красноярск, 2008, с.250 – 254.
 38. А.А. Бакибаев, Е.И. Короткова, О.И. Липских. Метод вольтамперометрии в исследовании каталитических свойств каталазы и супероксиддисмутазы. // **Изв. ВУЗов. Серия Химия и химич. технология, т.51, №5, 2008, С. 48 –50.**
 39. А.А. Бакибаев, А.С. Боев, Е.И. Короткова. Вольтамперометрическое определение пиридоксина (витамина В6) на модифицированном платиновом

электроде. // **Изв. ВУЗов. Серия Химия и химич. технология, т.51, №5, 2008, С. 21 –24.**

40. Е. И. Короткова. Калькулятор для антиоксидантов. // **Инновации. Регионы. Бизнес. Аналитика, №2, 2008, с. 23-27**
41. И. Короткова, В.И. Чернов, А.А. Бакибаев, А.Н. Мержа. Анализатор для определения суммарной антиоксидантной активности объектов. **Патент РФ № 2005138705/22(043204) от 12.12.2005.**
42. Короткова Е.И., Карбаинов Ю.А.. Вольтамперометрический способ определения активности антиоксидантов. // **Патент РФ № 2224997 от 6.06.2002г.**
43. Е.И. Короткова, Ю.А. Карбаинов, Т.И. Хаханина. Вольтамперометрический способ определения ПАВ в жидких средах. **Патент РФ № 2001395 (РФ). 1993г.**
44. Боев А.С., Короткова Е.И., Бакибаев А.А., Медведев Д.М. Способ определения витамина В₆ в биологически активных добавках. **Патент на изобретение РФ № 2006104582/28(004965) от 14.02.2006г.**