

На правах рукописи

Вторушина Анна Николаевна

**Метод вольтамперометрии в определении
антиоксидантных свойств некоторых биологически
активных соединений**

02.00.02 — аналитическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Томск — 2008

Работа выполнена на кафедре физической и аналитической химии
Томского политехнического университета

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ: кандидат химических наук,
доцент Короткова Елена
Ивановна

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ: доктор химических наук,
профессор
Гунцов Александр
Владимирович

кандидат химических наук,
доцент

Мамонтова Инесса Петровна

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: НИИ безопасности
жизнедеятельности Республики
Башкортостан, (г. Уфа)

Защита диссертации состоится 19 ноября 2008 г. в 14.30 на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 212.269.04 при Томском политехническом университете по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30.

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

Автореферат разослан: « » октября 2008 г.

Ученый секретарь
совета по защите докторских
и кандидатских диссертаций,
канд. хим. наук, доцент



Гиндуллина Т.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Использование антиоксидантов (АО), веществ, прерывающих радикально-цепные процессы окисления в объектах органического и неорганического происхождения, получило широкое распространение в последнее время в различных областях химии, биологии и медицины. На основе индивидуальных АО и биологически активных веществ (БАВ) создаются новые фармацевтические препараты и биологически активные добавки (БАД), предназначенные для лечения и профилактики ряда заболеваний, нормализации обмена веществ и т.д.

Лавинообразный рост вновь синтезированных БАД, появляющихся на рынке, предъявляет все более серьезные требования к исследованию их свойств. В настоящее время не существует единой меры антиоксидантной активности (АОА) подобных препаратов, нет единой регламентированной процедуры оценки АОА БАД, а результаты, полученные методами с различными модельными системами, зачастую не сопоставимы. Необходимость введения новых показателей, методик и приборов, обеспечивающих надежные результаты по исследованию свойств и активности подобных препаратов, становится актуальной задачей, от решения которой зависит эффективность и безопасность предлагаемых на рынке БАД, продукции пищевой, косметической и фармацевтической промышленности.

В систематизированном виде информация о свойствах антиоксидантов представлена очень ограниченно. Практически полностью отсутствуют сведения об электрохимических свойствах антиоксидантов природного и растительного происхождения, их влиянии на многостадийные электродные процессы.

В данной работе в качестве метода исследования предлагается использовать простой в аппаратном оформлении, экспрессный и высокочувствительный метод вольтамперометрии, имеющий большие потенциальные возможности в области электроаналитической химии, исследования свойств БАВ, разработки методов аналитического контроля сложных объектов. Использование в качестве модельной реакции процесса ЭВ O_2 , идущего по механизму, аналогичному восстановлению кислорода в клетках организма человека и животного, тканях растений, и являющегося основным окислительным процессом во всех объектах искусственного и природного происхождения, делает данный метод еще более привлекательным.

Цель работы: Разработать методику определения суммарного количества антиоксидантов в БАД, продукции пищевой, косметической, фармацевтической промышленности на основе процесса ЭВ O_2 .

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

1. Рассмотреть закономерности процесса ЭВ O_2 в условиях линейной полубесконечной диффузии, осложненного наличием последующих химических реакций взаимодействия активных кислородных радикалов с АО.

2. Определить оптимальные концентрации и время активного действия АО на примере флавоноидов, построить математические модели процесса в области оптимума функции.

3. Исследовать АОА по отношению к процессу ЭВ O_2 ряда флавоноидов, производных кумаринов, жирорастворимых витаминов А, Е, коэнзима Q_{10} , соединений фенольной природы (агидол, фенозан, ионол, фенол), витамина С, аскорбатов Mg, Co, Fe, Ca, Li и их смесей, экстрактов растений, продукции пищевой промышленности (соки разных производителей) для определения оптимальных условий их применения.

4. Исследовать электрохимические свойства ряда флавоноидов, производных кумаринов, коэнзима Q_{10} , определить оптимальные условия получения аналитического сигнала для определения данных веществ методом циклической вольтамперометрии.

5. Выявить корреляционные зависимости между электрохимическими параметрами и антиоксидантными свойствами исследуемых соединений фенольной природы.

6. Разработать методику выполнения измерений суммарного количества антиоксидантов в БАД, продукции пищевой, фармацевтической промышленности. Провести сравнительные испытания АОА индивидуальных препаратов, используя различные методы определения. Рассчитать метрологические характеристики методики.

Научная новизна. Впервые рассмотрены закономерности процесса ЭВ O_2 в присутствии антиоксидантов в условиях как стационарной, так и нестационарной диффузии, осложненной наличием последующих химических реакций взаимодействия активных кислородных радикалов с антиоксидантами по механизму ЕС. Численным методом конечных разностей решена граничная задача для данного процесса*. Определены некоторые кинетические параметры процесса.

Впервые проведено определение АОА по отношению к процессу ЭВ O_2 ряда флавоноидов, производных кумаринов, жирорастворимых витаминов А, Е, коэнзима Q_{10} , соединений фенольной природы (агидол, фенозан, ионол, фенол), витамина С, аскорбатов Mg, Co, Fe, Ca, Li, экстрактов растений, продукции пищевой промышленности (соки разных производителей) методом катодной вольтамперометрии.

Получены линейные и квадратичные математические модели определения активности антиоксидантов в зависимости от концентрации и времени их активного действия, используя методы планирования эксперимента.

Выявлены корреляционные зависимости между электрохимическими параметрами и антиоксидантными свойствами на примере ряда флавоноидов, производных кумаринов и жирорастворимых витаминов А и Е.

Практическая значимость.

Разработана новая методика определения суммарного количества антиоксидантов в БАД, продукции пищевой, косметической, фармацевтической промышленности с помощью метода катодной вольтамперометрии и процесса

* Результаты поставленной задачи, получены при непосредственном участии доцента каф. общей физики Томского государственного педагогического университета, к.ф.-м.н. Катаева Сергея Григорьевича

ЭВ O_2 , отличающаяся чувствительностью, простотой в исполнении, экспрессностью, универсальностью.

На основе методики разработан новый анализатор «АОА». Прибор прошел государственные испытания с целью утверждения типа средства измерения (СИ), по результатам которых ему присвоен тип СИ – «Анализатор АОА» с присвоенными 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 государственный реестр СИ под номером 35466-07.

Определены потенциалы окисления – восстановления ряда флавоноидов, производных кумаринов, коэнзима Q_{10} методом циклической вольтамперометрии, которые могут быть использованы в качестве аналитического сигнала для разработки методик их определения в различных объектах.

По результатам определения АОА ряда флавоноидов, производных кумаринов, жирорастворимых витаминов А, Е, коэнзима Q_{10} , соединений фенольной природы (агидол, фенозан, ионол, фенол), витамина С, аскорбатов Mg, Co, Fe, Ca, Li, экстрактов растений, продукции пищевой промышленности (соки разных производителей) выявлены наиболее активные антиоксиданты, их композиции, способ фракционирования экстрактов растений и даны рекомендации для их дальнейшего использования в фитотерапии.

На защиту выносятся:

1. Новые методика и разработанный на ее основе анализатор для определения суммарного количества антиоксидантов в БАД, продукции пищевой, косметической, фармацевтической промышленности, природных объектах.

2. Результаты определения АОА по отношению к процессу ЭВ O_2 ряда флавоноидов, производных кумаринов, жирорастворимых витаминов А, Е, коэнзима Q_{10} , соединений фенольной природы (агидол, фенозан, ионол, фенол), витамина С, аскорбатов Mg, Co, Fe, Ca, Li, экстрактов растений, продукции пищевой промышленности (соки разных производителей).

3. Результаты определения электроаналитических свойств ряда флавоноидов, производных кумаринов, коэнзима Q_{10} , которые могут быть использованы в качестве аналитического сигнала для определения данных веществ в БАД.

4. Результаты сравнительных определений антиоксидантной активности некоторых БАВ, используя метод катодной вольтамперометрии и независимые аналитические методы анализа.

Апробация работы. Основные результаты работы представлены устными и стендовыми докладами на XVII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Казань, 2003), European conference on analytical chemistry «Euroanalysis XIII» (Salamanca, Испания, 2004), III Всерос. научн. конф. «Химия и химическая технология на рубеже тысячелетий» (Томск, 2004), Всерос. научн. конф. с международным участием «Электроаналитика» (Екатеринбург, 2005), International Conference «Instrumental Methods of Analysis Modern Trends and

Applications» (Iraklion, Греция, 2005), International Conference «International Congress on Analytical Sciences» (Moscow, 2006), The 13-th World Congress «Food in life» (Nantes, Франция, 2006), II Всерос. конф. по аналитической химии с международным участием «Аналитика России 2007» (Краснодар, 2007), 4th Black sea basin conference on analytical chemistry (Sunny Beach, Болгария, 2007), VII Всерос. конф. по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2008» (Уфа, 2008).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 статей и 12 тезисов докладов.

Диссертация выполнена при поддержке гранта ТПУ «на проведение молодыми учеными научных исследований в ведущих научно-педагогических коллективах» 2008г., проекта № 5.428 С.2007 Томской области в областном конкурсе научных разработок молодых ученых в 2007 году по теме «Разработка анализатора для определения антиоксидантов в различных объектах» и проекта № 5.426 С.2007 «Разработка анализатора для определения антиоксидантов в биологических объектах» в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы».

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, обсуждения результатов, выводов, списка литературы из 191 наименования и приложения. Содержит 200 страниц, 34 таблицы, 40 рисунков.

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

В первой главе приведен литературный обзор, посвященный описанию антиоксидантной защитной системы организма и роли фенольных соединений в ее составе, их распространению в природе и жизни человека; современное состояние теории и практики определения антиоксидантных и электрохимических свойств соединений фенольной природы.

Во второй главе рассмотрены теоретические закономерности процесса ЭВ O_2 в условиях стационарной и нестационарной диффузии, осложненного наличием последующих химических реакций взаимодействия активных кислородных радикалов с антиоксидантами по механизму ЕС.

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

В четвертой главе рассмотрена АОА по отношению к процессу ЭВ O_2 некоторых биологически активных соединений фенольной природы, определены их электрохимические параметры, а также показана корреляция между антиоксидантными свойствами и электрохимическими параметрами исследуемых соединений.

В пятой главе описаны метрологические аспекты методики определения суммарного количества антиоксидантов в различных объектах, рассчитаны

метрологические показатели для представленной методики. Показаны результаты сравнительных испытаний вольтамперметрического и спектрофотометрического методов определения АОА.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследования проводили на полярографе ПУ-1 с двухкоординатным самописцем ЛКД-4 и компьютеризированном вольтамперметрическом анализаторе ТА-2 («Томьаналит», г.Томск). В работе использовали метод катодной вольтамперметрии, в качестве модельной реакции рассматривали процесс ЭВ O_2 . Для оценки влияния исследуемых веществ рассматривали зависимости предельного тока первой волны ЭВ O_2 от концентрации их в объеме раствора и от времени протекания процесса ЭВ O_2 в их присутствии.

Вольтамперограммы исследуемых растворов регистрировали на стационарных электродах с линейной разверткой потенциала со скоростью 40 мВ/с. Для измерений использовали индикаторный ртутнопленочный электрод (РПЭ). В качестве электрода сравнения применяли хлоридсеребряный электрод. Вспомогательным электродом служил стеклоуглеродный электрод.

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

Объектами лекарственного растительного сырья служили сухие экстракты различных растений флоры Сибири. Индивидуальными объектами исследований были выбраны ряд флавоноидов, впервые синтезированные производные кумаринов, витамины А и Е, а также коэнзим Q_{10} и др.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Окисление кислородом и его активными радикалами является одним из основных процессов, протекающих в организме. Поэтому представляется достаточно интересным рассмотрение влияния антиоксидантов на процесс ЭВ O_2 , протекающего по механизму, аналогичному восстановлению кислорода в клетках и тканях организма. В работе рассматривается первая волна катодного ЭВ O_2 , реализующаяся на РПЭ.

В различных литературных источниках активно обсуждается вопрос влияния последующей химической реакции на электродный процесс. В настоящей работе была предложена схема процесса ЭВ O_2 осложненного последующими химическими реакциями в условиях стационарной и нестационарной диффузии

Процесс ЭВ O_2 , осложненный наличием последующей химической реакции в условиях стационарной и нестационарной диффузии

Общая схема электродного процесса с последующими химическими реакциями взаимодействия антиоксидантов с активными кислородными радикалами будет выглядеть следующим образом:

$$\frac{I_k}{I_d} = 1 - \frac{(k'_1 + k'_2 K_2)}{2k'_d K_2 K_3 [H^+]} C_{AO} \quad (5)$$

В данном случае полученное уравнение не дает возможности рассчитать кинетические параметры процесса, но объясняет наличие линейной зависимости изменения тока ЭВ O_2 от концентрации АО в растворе. При этом понижение предельного тока ЭВ O_2 в присутствии АО будет наблюдаться при соотношении: $(k'_1 + k'_2 K_2) C_{AO} < 2k'_d K_2 K_3 [H^+]$ (6)

Если выражения будут равны друг другу, мы не будем наблюдать изменения сигнала ЭВ O_2 в присутствии АО: $I_k = 0 : (k'_1 + k'_2 K_2) C_{AO} = 2k'_d K_2 K_3 [H^+]$ (7)

Если $(k'_1 + k'_2 K_2) C_{AO} > 2k'_d K_2 K_3 [H^+]$ (8)

мы будем наблюдать повышение тока ЭВ O_2 в присутствии АО.

Для определения границ применимости данной модели и расчета некоторых кинетических параметров процесса была поставлена граничная задача квазиобратимого электродного процесса ЭВ O_2 в присутствии АО в условиях нестационарной диффузии. За основу была взята следующая схема электродного процесса:



Принимая ряд допущений, сформулирована граничная задача для представленного процесса и поставлены граничные условия. Данная задача была решена, используя численный метод конечных разностей.

В результате решения были получены теоретические вольтамперограммы процесса ЭВ O_2 в присутствии аскорбиновой кислоты для разных значений скоростей развертки потенциала: 0.02 В/с, 0.08 В/с и 0.29 В/с. Полученные теоретические вольтамперограммы сравнивались с экспериментальными, расхождение между результатами незначительны, особенно в области малых скоростей развертки потенциала (рис. 1).

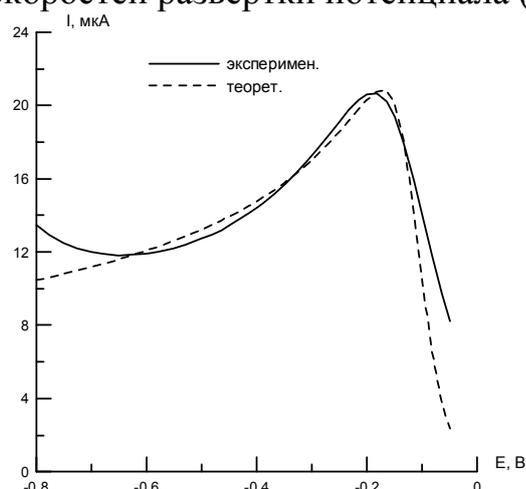


Рис. 1. Экспериментальная и теоретическая вольтамперограммы тока ЭВ O_2 в присутствии аскорбиновой к-ты ($C=2.7 \cdot 10^{-3}$ моль/л) на РПЭ в фосфатном буфере (рН 6.86), $W=20$ мВ/с

Корреляцию между экспериментальными и теоретическими вольтамперограммами оценивали при помощи коэффициента детерминации, рассчитываемого по формуле:

$$D = 1 - \frac{\sum_{i=1}^N (y_{\text{exp}} - y_{\text{teor}})^2}{\sum_{i=1}^N (y_{\text{exp}} - y_{\text{teor}})^2 + \sum_{i=1}^N (\bar{y}_{\text{exp}} - y_{\text{teor}})^2}$$

где y_{exp} – значение функции отклика в N-й точке на экспериментальной кривой, y_{teor} – значение функции отклика в N-й точке на теоретически полученной кривой, N – количество точек на рассматриваемых кривых.

Также были рассчитаны значения среднеквадратического отклонения (СКО)

между теоретическими и экспериментальными значениями тока на вольтамперных кривых для разных скоростей развертки потенциала (табл. 2).

В ходе решения были определены некоторые кинетические параметры процесса, представленные в таблице 2. Исходные параметры, взятые за основу в расчете, представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Исходные параметры процесса ЭВ O_2 в присутствии аскорбиновой кислоты ($C=2.7 \cdot 10^{-3}$ моль/л) на РПЭ

| $D_{ox}, \text{см}^2/\text{с}$ | $D_{red}, \text{см}^2/\text{с}$ | $C_{ox}, \text{моль/л}$ | $C_c, \text{моль/л}$ | $S, \text{см}^2$ |
|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------|----------------------|------------------|
| $1.48 \cdot 10^{-6}$ | $4.56 \cdot 10^{-8}$ | $2.56 \cdot 10^{-4}$ | $2.7 \cdot 10^{-3}$ | 0.275 |

Таблица 2.

Значения некоторых кинетических параметров процесса ЭВ O_2 в присутствии аскорбиновой кислоты по механизму ЕС

| $W, \text{мВ/с}$ | 20 | 80 | 290 |
|--|-----------|-----------|-----------|
| α | 0.5 | 0.55 | 0.5 |
| $k_s, \text{см/с}$ | 10^{-2} | 10^{-2} | 10^{-2} |
| $k_1, \text{лмоль}^{-1} \text{с}^{-1}$ | 10^{+4} | 10^{+4} | 10^{+4} |
| СКО | 1.854 | 4.494 | 9.170 |
| D | 0.964 | 0.921 | 0.917 |

Полученные теоретические вольтамперограммы при сопоставлении с экспериментальными позволили подтвердить механизм наличия последующей химической реакции и рассчитать константу скорости последующей химической реакции взаимодействия АО с активными кислородными радикалами, значение которой хорошо согласуется с литературными данными. Показано, что при малых скоростях развертки потенциала полученная математическая модель адекватно описывает процесс. Определены оптимальные условия получения аналитического сигнала.

Оценка оптимальной концентрации и времени активного действия АО фенольной природы

Для оценки оптимальной концентрации и времени активного действия АО в данной работе использовали методы планирования эксперимента. Все исследования проводились на примере ряда флавоноидов.

Для получения математической модели процесса ЭВ O_2 в присутствии АО фенольной природы использовали полный факторный эксперимент.

Варьируемыми факторами служили концентрация АО и время его взаимодействия с активными кислородными радикалами. В качестве функции отклика использовали относительное изменение тока ЭВ O_2 (I/I_0) в присутствии АО. Для всех исследуемых веществ получены адекватные математические модели процесса:

| | |
|------------------|--|
| Рутин | $y=0.0083+0.0023x_1+0.0038x_2$ |
| Кверцетин | $y=0.0479+0.0038x_1-0.010x_2-0.0645x_1x_2$ |
| Дигидрокверцетин | $y=0.0140+0.0045x_1+0.0099x_2$ |
| Катехин | $y=0.0330+0.0021x_1+0.0036x_2$ |

Для оптимизации условий осуществили поиск точки оптимума движением по градиенту функции отклика согласно уравнению регрессии, используя метод крутого восхождения. Полученные оптимальные условия были взяты за основу при описании области оптимума планами второго порядка методом центрального ортогонального композиционного планирования (ЦОКП). Для исследуемых флавоноидов получены следующие математические модели второго порядка:

Рутин: $y=0.0699+0.0212x_1-0.0112x_2+0.0078x_1^2$

Кверцетин: $y=0.1504-0.0373x_2-0.0112x_1x_2-0.0731x_1^2+0.0250x_2^2$

Дигидрокверцетин: $y=0.0859-0.029x_1-0.0134x_2-0.0116x_1x_2+0.125x_1^2$

Катехин: $y=0.0275+0.0083x_1+0.0090x_2+0.0030x_1x_2-0.0104x_1^2-0.0144x_2^2$

Показано, что относительное изменение предельного тока кислорода в присутствии АО зависит как от концентрации АО фенольной природы, так и от времени его взаимодействия с активными кислородными формами (АФК). Следует заметить, что основным значимым фактором в полученных математических моделях являлось время взаимодействия АО с АФК для всех исследуемых веществ. На основании полученных результатов, согласно методике определения АОА вольтамперометрическим методом, было предложено два эмпирических критерия оценки АОА: концентрационный и кинетический критерии.

1. Концентрационный критерий – отражает степень изменения концентрации кислорода и его активных радикалов в зависимости от концентрации АО в растворе. Размерность: мл/г.

$$k_{\text{конц}} = \frac{I_i}{I_o} \cdot \frac{1}{C_{\text{АО}}} \quad (10)$$

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

2. Кинетический критерий - отражает количество активных кислородных форм, прореагировавших с АО (или суммарным содержанием АО) за минуту времени. Размерность: мкмоль/л·мин.

$$k_{\text{кинет.}} = \left(1 - \frac{I_i}{I_o}\right) \cdot \frac{C_{O_2}^o}{t} \quad (11)$$

где I_i – ток ЭВ O_2 в присутствии АО в растворе, мкА, I_o – ток ЭВ O_2 в отсутствии АО в растворе, мкА; $C_{O_2}^o$ – исходная концентрация кислорода в растворе, мкмоль/л, t – время реакции взаимодействия антиоксиданта с активными кислородными формами, мин.

Особенности процесса электровосстановления кислорода в присутствии индивидуальных антиоксидантов фенольной природы

Для оценки влияния на процесс ЭВ O_2 индивидуальных АО фенольной природы были рассмотрены зависимости предельного тока ЭВ O_2 от времени активного действия и концентрации некоторых флавоноидов в объеме раствора. При добавлении исследуемых образцов наблюдалось уменьшение величины катодного тока и смещение потенциала волны ЭВ O_2 в положительную область (рис. 2.).

По результатам полученных вольтамперограмм строились зависимости относительного уменьшения тока ЭВ O_2 от времени протекания процесса в присутствии исследуемых флавоноидов (рис. 3).

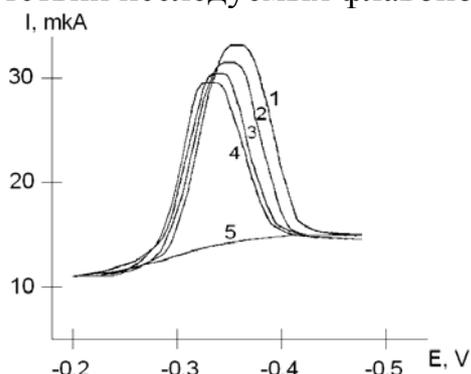


Рис. 2. Вольтамперограммы тока ЭВ O_2 на РПЭ в фосфатном буфере (рН 6.86) в отсутствие (1) и в присутствии $0.27 \cdot 10^{-3}$ моль/л дигидрокверцетина в зависимости от времени протекания процесса: $t=10$ мин (2), 20 мин (3), 30 мин (4), (5) – остаточный ток фонового электролита в отсутствии O_2 и вещества в растворе. Скорость развертки потенциала 40 мВ/с

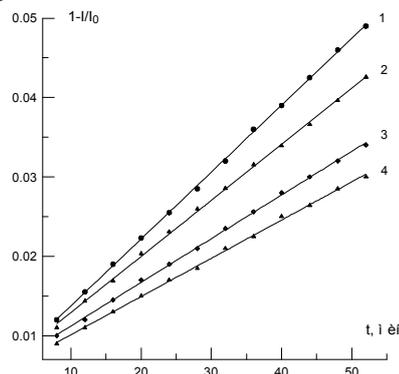


Рис. 3. Линейная часть зависимости относительного изменения предельного тока ЭВ O_2 от времени протекания процесса в присутствии $0.27 \cdot 10^{-3}$ моль/л: кверцетина (1), катехина (2), дигидрокверцетина (3), рутина (4)

Антиоксидантная активность объектов определялась по относительному уменьшению тока ЭВ O_2 , используя кинетический критерий (11).

Используя методы планирования эксперимента, были построены двухфакторные поверхности отклика для рассматриваемых флавоноидов, из которых определены оптимальные интервалы концентраций и время активного действия (табл. 3).

Таблица 3.

Антиоксидантная активность образцов по отношению к процессу ЭВ O_2 при эффективных значениях концентрации и времени взаимодействия ($p=0.95$, $n=5$)

| Флавоноид | $C_{эф.} \cdot 10^6$, 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 |

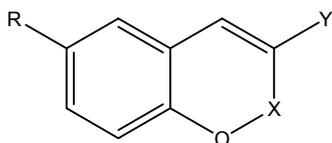
Аналогичным образом были рассмотрены антиоксидантные свойства некоторых впервые синтезированных производных кумаринов.

Таблица 4.

Антиоксидантная активность образцов по отношению к процессу ЭВ O_2 ($p=0.95$, $n=5$)

| № | X | Y | R | k , мкмоль/(л·мин) | k , мл/г |
|---|-----------|------------------------|------|----------------------|-------------------|
| 1 | C=O | P(O)(OEt) ₂ | H | 0.113 ± 0.002 | 0.201 ± 0.005 |
| 2 | P(O)(OEt) | C(O)OEt | H | 0.099 ± 0.008 | 0.194 ± 0.003 |
| 3 | C=O | P(O)(OEt)(OH) | H | 0.087 ± 0.007 | 0.135 ± 0.006 |
| 4 | C=O | P(O)(OEt) ₂ | 6-Br | 0.128 ± 0.004 | 0.208 ± 0.002 |

| | | | | | |
|---|-----|------------------------|----------------------|---------------|---------------|
| 5 | C=O | P(O)(OEt) ₂ | 6-Cl | 0.169 ± 0.006 | 0.264 ± 0.004 |
| 6 | C=O | P(O)(OEt) ₂ | 7-N(Et) ₂ | 0.532 ± 0.005 | 0.363 ± 0.004 |



где X, Y, R – заместители в структуре исследуемых кумаринов

Из таблицы 4 можно видеть корреляцию между значениями концентрационного и кинетического критериев, что говорит об активном влиянии на процесс ЭВ O₂ обоих факторов времени и концентрации исследуемых производных кумаринов в растворе. Показано, что вновь синтезированные производные кумаринов обладают неплохой АОА по отношению к процессу ЭВ O₂, не уступающей по своим показателям природным аналогам, извлечение которых из растительного сырья достаточно трудоемкий и долговременный процесс.

Исследованы антиоксидантные свойства ряда аскорбатов металлов. Большинство комплексов металлов и аскорбиновой кислоты проявили большую активность (табл.5), чем сама аскорбиновая кислота, считающаяся несомненным антиоксидантом и синергетиком в процессах прерывания цепных радикальных реакций.

Таблица 5.

Антиоксидантная активность образцов ($c = 10^{-4}$ г/мл) по отношению к процессу ЭВ O₂ ($p=0.95, n=5$)

| Название | k , мкмоль/(л·мин) | Название | k , мкмоль/(л·мин) |
|----------|----------------------|-------------------|----------------------|
| Asc Mg | 2.125 ± 0.053 | Asc Fe | – |
| Asc Li | 1.714 ± 0.024 | Аскорбиновая к-та | 1.165 ± 0.053 |
| Asc Ca | 1.550 ± 0.042 | Глюкоза | 0.169 ± 0.037 |
| Asc Co | 0.879 ± 0.027 | Дигидрокверцетин | 0.140 ± 0.060 |

Рассмотрено влияние смеси компонентов на процесс ЭВ O₂ на примере смесей известных антиоксидантов и рассматриваемых аскорбатов. Установлено, что в смесях с Asc Mg и количеством компонентов не более 3-х наблюдается эффект синергизма. На основании полученных данных можно рекомендовать создание фармакологических препаратов на основе Asc Mg в смесях с небольшим количеством компонентов для более активного воздействия на организм.

Исследование суммарной антиоксидантной активности

растительного сырья

Для изучения антиоксидантных свойств растительного сырья было проведено исследование активности экстрактов некоторых растений из флоры западной и восточной Сибири. В частности была определена суммарная АОА экстрактов лабазника по относительному уменьшению тока ЭВ O₂, используя выражение (11) (таблица 6).

Таблица 6.

Суммарная АОА экстрактов надземной части лабазника вязолистного и лабазника обыкновенного по отношению к процессу ЭВ O₂ ($p=0.95$, $n=5$)

| Образец | Кинетический критерий антиоксидантной активности k , мкмоль/(л·мин) | |
|-------------------------|---|-----------------------|
| | Лабазник вязолистный | Лабазник обыкновенный |
| Водный экстракт | 0.607 ± 0.036 | 0.325 ± 0.042 |
| Экстракт на 40% этаноле | 0.783 ± 0.043 | 0.365 ± 0.044 |
| Экстракт на 70% этаноле | 0.953 ± 0.045 | 0.429 ± 0.050 |
| Экстракт на 95% этаноле | 1.170 ± 0.051 | 0.928 ± 0.034 |

Установлено, что наибольшей активностью обладают экстракты на 70 % и 95 % этаноле, что свидетельствует о наиболее полном извлечении БАВ при экстрагировании более концентрированными водно-спиртовыми растворами.

Аналогичным образом была определена суммарная АОА экстрактов альфредии поникшей (таблица 7).

Таблица 7.

Суммарная антиоксидантная активность экстрактов надземной части *Alfredia cernua* по отношению к процессу ЭВ O₂ ($p=0.95$, $n=5$)

| Экстракт (выход, %) | k , мкмоль/(л мин) |
|--------------------------------|----------------------|
| Водный экстракт (24.4) | 0.28 ± 0.06 |
| Экстракт на 40% этаноле (24.6) | 0.35 ± 0.03 |
| Экстракт на 70% этаноле (24.5) | 0.50 ± 0.05 |
| Экстракт на 95% этаноле (14.7) | 0.38 ± 0.05 |

С целью изучения компонентного состава экстракта альфредии поникшей, полученного обработкой 70 % этанолом, проводили его фракционирование рядом растворителей с увеличивающейся полярностью.

Для установления природы веществ, ответственных за проявление антиоксидантных свойств, изучали активность фракций экстракта альфредии поникшей (табл. 8.). Показано, что липофильные фракции экстракта в наибольшей степени проявляют антиоксидантные свойства. Наиболее выраженную активность показала этилацетатная фракция, содержащая более полный комплекс фенольных компонентов, что согласуется с результатами исследований других растений.

Таблица 8.

АОА фракций экстракта надземной части *Alfredia cernua*, полученного обработкой 70% этанолом, по отношению к процессу ЭВ O₂ ($p=0.95$, $n=5$)

| Фракция | Выход, % | Кинетический критерий АОА (k), мкмоль/(л·мин) |
|---------------|----------|---|
| Хлороформная | 5.2 | 0.57 ± 0.03 |
| Этилацетатная | 5.8 | 0.65 ± 0.04 |
| Бутанольная | 12 | 0.56 ± 0.06 |

| | | |
|----------------|----|-----------------|
| Водный остаток | 62 | 0.16 ± 0.05 |
|----------------|----|-----------------|

Аналогичным образом были рассмотрены АО свойства экстрактов и фракций на их основе черники обыкновенной.

Рассмотрев ряд растительных объектов, можно говорить, о возможности применения метода катодной вольтамперометрии для определения суммарной АОА растительного сырья, выявления и выделения наиболее перспективных источников БАВ. А также возможность выявления экстрагентов, наиболее полно извлекающих БАВ из растительного сырья, с целью их концентрирования и создания фармакологических препаратов на их основе.

Корреляция между антиоксидантными свойствами и электрохимическими параметрами исследуемых соединений фенольной природы

Наличие корреляционной связи между АОА и электрохимическими параметрами веществ было оценено на примере ряда флавоноидов (катехин, рутин, кверцетин и дигидрокверцетин). АОА исследуемых флавоноидов определялась, используя метод катодной вольтамперометрии (процесс ЭВ O_2).

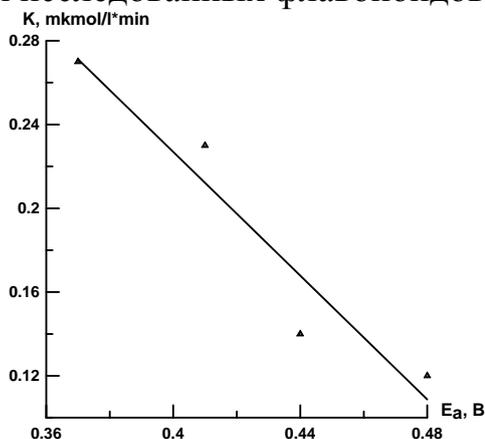
Электрохимические свойства флавоноидов были изучены с помощью метода циклической вольтамперометрии. Исследование проводилось в условиях дифференциального режима постоянно-токовой вольтамперометрии на СУЭ. В таблице 9 приведены значения потенциалов окисления и восстановления веществ.

Таблица 9.

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_a, V | E_k, V | $k, \text{мкмоль}/(\text{л} \cdot \text{мин})$ |
|------------------|-----------------|-----------------|--|
| Рутин | 0.48 ± 0.02 | 0.31 ± 0.03 | 0.12 ± 0.09 |
| Дигидрокверцетин | 0.44 ± 0.04 | 0.24 ± 0.02 | 0.14 ± 0.06 |
| Катехин | 0.41 ± 0.04 | 0.20 ± 0.03 | 0.23 ± 0.05 |
| Кверцетин | 0.37 ± 0.03 | 0.14 ± 0.02 | 0.27 ± 0.03 |

На рис. 4. представлена корреляционная зависимость между потенциалами окисления исследованных флавоноидов и значениями их АОА.



Уравнение корреляционной зависимости:

$$K = 0.82 - 1.48 E_a$$

Данное уравнение позволяет прогнозировать значения потенциалов окисления флавоноидов по известным данным их АОА и наоборот.

Рис. 4. Корреляционная зависимость между потенциалами окисления флавоноидов и значениями АОА, рассчитанными по кинетическому критерию ($r = 0.96$)

Аналогичным образом рассмотрена корреляционная зависимость между электрохимическими параметрами (потенциалами окисления – восстановления) и антиоксидантными свойствами синтезированных производных кумаринов.

Наличие корреляционной зависимости рассматривалось также на примере жирорастворимых витаминов А и Е (табл.10).

Таблица 10.
Значения кинетического критерия АОА ($p=0.95, n=5$)

| Название витамина | $k, \text{мкмоль} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ | | $E_a, \text{В}$ |
|----------------------|--|-------------------------|-----------------|
| | $C=0.599 \text{ мг/мл}$ | $C=1.195 \text{ мг/мл}$ | |
| Витамин А | 10.01 ± 0.07 | 12.91 ± 0.03 | $+1.1 \pm 0.05$ |
| Витамин Е | 9.26 ± 0.04 | 11.29 ± 0.08 | $+1.8 \pm 0.04$ |

Наблюдался аналогичный эффект как и в случае с водорастворимыми АО.

Рассмотрев несколько групп сходных по структуре соединений, можно с уверенностью говорить, что наблюдается корреляционная зависимость 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 .

Метрологические аспекты методики определения суммарного количества антиоксидантов в объектах

На данный момент существует ряд методик определения как АОА так и суммарного количества антиоксидантов в различных объектах. Однако ни один из существующих методов не аттестован. 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 было предложено оценивать суммарное количество антиоксидантов в БАД по отношению к процессу ЭВ O_2 в пересчете на концентрацию аскорбиновой кислоты.

Для определения суммарного количества антиоксидантов в исследуемом объекте строится градуировочная зависимость относительного изменения тока ЭВ O_2 от концентрации аскорбиновой кислоты в растворе. Далее из данной зависимости по величине относительного изменения тока ЭВ O_2 в присутствии исследуемого объекта определяется суммарное количество антиоксидантов в пересчете на концентрацию аскорбиновой кислоты (рис. 5).

Используя данный прием, были решены отмеченные выше проблемы, возникающие при аттестации методики определения АОА различных объектов.

Разработку методики проводили на примере ряда соков с содержанием аскорбиновой кислоты не менее 0.2 мг/мл.

По результатам зарегистрированных вольтамперограмм тока ЭВ O_2 в присутствии аскорбиновой кислоты строился градуировочный график.

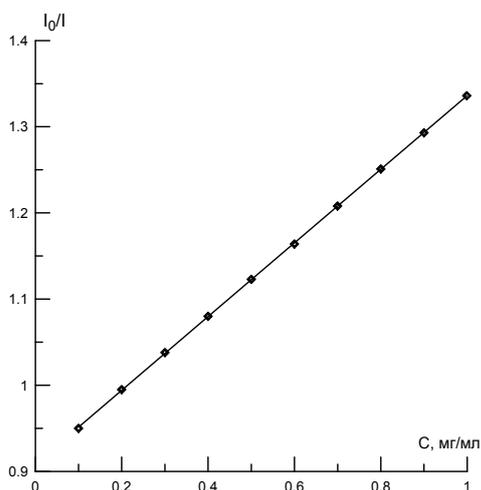


Рис. 5. Зависимость относительного изменения тока ЭВ O₂ от концентрации аскорбиновой кислоты на РПЭ в фоновом электролите 0.025 М фосфатном буфере (рН = 6.86)

На основании полученных данных выведено уравнение регрессии зависимости относительного изменения тока ЭВ O₂ от концентрации аскорбиновой кислоты в растворе фонового электролита в диапазоне концентраций C = 0–1 мг/мл:

$$I_0/I = 0.910 + 0.427C$$

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 11.

Таблица 11.

Метрологические характеристики методики определения суммарного количества антиоксидантов по отношению к процессу ЭВ O₂ в пересчете на концентрацию аскорбиновой кислоты при $p = 0.95$, $n=3$, $l=10$

| Измеряемая концентрация, C, (мг/мл) | 0.1 | 0.5 | 0.999 |
|---|----------|---------|---------|
| Показатель повторяемости S _{гм} , (мг/мл) | 0.00446 | 0.04756 | 0.07186 |
| Показатель внутрилабораторной прецизионности, S _{гм} , (мг/мл) | 0.011889 | 0.05495 | 0.08525 |
| Показатель точности, Δ | 0.02325 | 0.10779 | 0.16697 |
| ε, % | 22.9% | 21.5% | 16.7% |

По полученным метрологическим показателям для рассматриваемых поддиапазонов концентрации аскорбиновой кислоты принято решение приписать наибольшую погрешность (23%) для всей области концентраций линейного участка градуировочной характеристики.

В соответствии с регламентированной процедурой аттестации МВИ определения суммарного количества антиоксидантов в объектах в пересчете на аскорбиновую кислоту, отработаны оптимальные условия получения аналитического сигнала предельного тока ЭВ O₂ в присутствии АО, используя метод вольтамперометрии; проверена гипотеза линейности градуировочной характеристики и оценена адекватность полученной математической модели. Рассчитаны основные метрологические характеристики анализа (показатель повторяемости, точности, внутрилабораторной прецизионности). Проведена оценка правильности методики определения суммарного количества антиоксидантов в пересчете на аскорбиновую кислоту методом «введено-

найдено» по критерию Стьюдента. Все процедуры расчетов проводились в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-2002, действующего на территории РФ.

Спектрофотометрический и вольтамперометрический методы определения АОА. Сравнительные определения

На сегодняшний день спектр методов определения суммарной антиоксидантной активности веществ очень 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. Таким образом, сравнивать численные значения нецелесообразно, но можно провести корреляцию между результатами, полученными разными методами.

В качестве метода сравнения был выбран спектрофотометрический метод с ферментативной системой генерации кислородных радикалов. 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 12.

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

| Название вещества | Спектрофотометрический метод, $IC_{50}^* \cdot 10^2$ (М) | Вольтамперометрический метод, $IC_{50} \cdot 10^2$ (М) |
|-------------------|---|---|
| Рутин | 0.13 ± 0.02 | 0.82 ± 0.04 |
| Дигидрокверцетин | 0.53 ± 0.04 | 1.03 ± 0.05 |
| Бензойная кислота | 0.55 ± 0.03 | 4.19 ± 0.05 |
| Аскорбиновая к-та | 0.72 ± 0.03 | 4.87 ± 0.03 |
| Кверцетин | 1.17 ± 0.02 | 5.89 ± 0.03 |
| Катехин | 3.92 ± 0.04 | 8.22 ± 0.04 |

Из представленных данных видно, что численного совпадения результатов определения нет, что и было ожидаемо, поскольку модельные реакции методов различны. Однако можно говорить о корреляции результатов полученных СФ-им и вольтамперометрическим методами, что является косвенным доказательством правильности представленной в данной работе вольтамперометрической методики определения АОА различных объектов. Оба метода были поставлены в одной лаборатории на одних и тех же образцах.

Утверждение типа вольтамперометрического анализатора по определению АОА биологически активных веществ

Разработанная вольтамперометрическая методика определения суммарной антиоксидантной активности БАВ или суммарного количества антиоксидантов нашла широкое применение в исследовании антиоксидантных свойств различных веществ, продукции пищевой, косметической и фармацевтической промышленности. На основе данной методики совместно с ООО НПП «Томьаналит» был разработан вольтамперометрический анализатор

«Антиоксидант» для определения суммарной АОА и суммарного количества антиоксидантов в различных объектах.

Прибор прошел государственные испытания с целью утверждения типа СИ, по результатам которых ему присвоен тип СИ – «Анализатор АОА» с присписанными метрологическими и техническими характеристиками. Разработанный анализатор может использоваться как в аккредитованных аналитических лабораториях по контролю качества, так и в научно-исследовательских лабораториях для оценки суммарного содержания антиоксидантов или суммарной антиоксидантной активности различных объектов.

ВЫВОДЫ

1. Рассмотрены закономерности процесса ЭВ O_2 в условиях как стационарной, так и нестационарной диффузии, осложненного наличием последующих химических реакций взаимодействия активных кислородных радикалов с антиоксидантами по механизму ЕС. Определены некоторые кинетические параметры процесса.

2. Определены оптимальные концентрации и время активного действия флавоноидов, построены математические модели процесса в области оптимума функции, используя методы планирования эксперимента.

3. Исследована антиоксидантная активность по отношению к процессу ЭВ O_2 ряда флавоноидов, производных кумаринов, жирорастворимых витаминов А, Е, коэнзима Q_{10} , соединений фенольной природы (агидол, фенозан, ионол, фенол), витамина С, аскорбатов Mg, Co, Fe, Ca, Li, экстрактов растений, продукции пищевой промышленности (соки разных производителей).

4. Рассмотрено влияние смеси компонентов на основе аскорбатов металлов на процесс ЭВ O_2 и определена суммарная антиоксидантная активность смесей по отношению к данному процессу. Проведена оценка взаимного влияния компонентов в смеси. Показано, что с увеличением числа компонентов в смеси ее суммарная активность уменьшается.

5. Исследованы электрохимические свойства ряда флавоноидов, производных кумаринов, коэнзима Q_{10} , найдены потенциалы окисления – восстановления данных веществ. Определены оптимальные условия получения аналитического сигнала данных веществ методом циклической вольтамперометрии.

6. Выявлены корреляционные зависимости между электрохимическими параметрами (потенциалами окисления – восстановления веществ) и антиоксидантными свойствами на примере ряда флавоноидов и производных кумаринов.

7. Разработана методика определения суммарного количества антиоксидантов в БАД, продукции пищевой, косметической, фармацевтической промышленности. Проведены сравнительные испытания АОА некоторых БАВ, используя различные методы определения. Оценены метрологические характеристики методики.

8. Разработан новый анализатор «Антиоксидант». Проведены государственные испытания с целью утверждения типа СИ, по результатам

которых 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 государственный реестр СИ под номером 35466-07.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Korotkova E.I., Lukina A.N. (Vtorushina), Karbainov Y.A. Voltammetric sensor for antioxidant activity determination // Book of abstr. European conference on analytical chemistry "Euroanalysis XIII". Salamanca. 2004. P.32.
2. Короткова Е.И., Лукина А.Н. (Вторушина), Гончаров Л.А., Мисин В.М. Вольтамперометрический способ определения суммарной антиоксидантной активности объектов // Материалы научно-практического семинара «Методы оценки антиоксидантной активности биологически активных веществ лечебного и профилактического назначения». Москва. 2004. С.182-194.
3. Короткова Е.И., Карбаинов Ю.А., Лукина А.Н. Исследование антиоксидантных свойств биологически активных веществ методом вольтамперометрии // Тез. докл. III Всерос. научн. конф. «Химия и химическая технология на рубеже тысячелетий». Томск. 2004. С.203.
4. Короткова Е.И., Лукина А.Н. Исследование электрохимических свойств дигидрокверцетина методом вольтамперометрии // Тез. докл. Всерос. науч. конф. с международным участием «Электроаналитика». Екатеринбург. 2005. С.102, 252.
5. Lukina A.N., Avramchik O.A., Korotkova E.I., Karbainov Y.A. Investigation of electrochemical and antioxidant properties of some flavonoids by voltammetry // Book of abstr. Int. Conf. «Instrumental Methods of Analysis Modern Trends and Applications». Iraklion. 2005. P.496.
6. Короткова Е.И., Лукина А.Н., Гончаров Л.А., Мисин В.М. Анализатор для определения суммарной антиоксидантной активности объектов // Материалы 8-го Междунар. семинара-презентации инновационных научно-технических проектов «Биотехнология – 2005». Пущино. 2005. С.163-168.
7. Lukina A.N., Avramchik O.A., Korotkova E.I., Karbainov Y.A. Study of antioxidant properties derivatives of coumarin by voltammetry // Abstr. Int. Conf. International Congress on Analytical Sciences. Moscow. 2006. P.255.
8. А.Н. Лукина, Е.И. Короткова, Ю.А. Карбаинов Исследование антиоксидантных свойств некоторых аскорбатов и смесей на их основе // Материалы Международной научн. конф. «Химия и химическая технология на рубеже тысячелетий». Томск, 2006. С.91–93.
9. O. Lipskikh, A. Lukina, E. Korotkova Investigation of antioxidant properties of some flavonoids by voltammetric and spectrophotometric methods // Book of abstracts V International Conference on Instrumental Methods of Analysis Modern Trends and Applications. Greece. 2007. P.135.
10. Lukina A.N., Avramchik O.A., Korotkova E.I. A new analyzer for antioxidant activity determination of biological-active substances // Book of abstr. 4th Black sea basin conference on analytical chemistry. Sunny Beach. 2007. P.65.

11. Короткова Е.И., Аврамчик О.А., Лукина А.Н., Витюк О.Ю. Анализатор по определению суммарной антиоксидантной активности биологически активных добавок // Материалы II Всерос. конф. по аналитической химии с международным участием «Аналитика России 2007». Краснодар. 2007. С.439.
12. Короткова Е.И., Вторушина А.Н., Липских О.И. Исследование антиоксидантных свойств некоторых флавоноидов методом вольтамперометрии // Материалы VII Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2008». Уфа. 2008. С.24.
13. Короткова Е.И., Аврамчик О.А., Каморзина И.Г., Карбаинов Ю.А., Лукина А.Н. Новый вольтамперометрический метод определения антиоксидантной активности косметической продукции // Заводская лаборатория. 2004. Т.70. №8. С.13-17.
14. Avramchik O.A., Korotkova E.I., Plotnikov E.V., Lukina A.N., Karbainov Y.A. Investigation of antioxidant properties of some complex compounds of lithium// J. Pharm. Biomed. Anal. 2005. V.37. P.1149–1154.
15. I. Schepetkin, A. Potapov, A. Khlebnikov, A. Lukina Decomposition of reactive oxygen species by copper(II) bis(1-pyrazolyl)methane complexes // J. Biol. Inorg. Chem. 2006. V.11. P.499–513.
16. Шилова И.В., Краснов Е.А., Короткова Е.И., Нагаев М.Г., Лукина А.Н. Антиоксидантная активность экстрактов надземной части лабазника вязолистного // Химико-фармацевтический журнал. 2006. Т.40. №12. С.22–24.
17. Короткова Е.И., Лукина А.Н., Драчева Л.В. Исследование антиоксидантной активности биокомпозиций на основе пробиотиков // Пищевая промышленность. № 3. 2007. С.14-15.
18. Шилова И.В., Вторушина А.Н., Короткова Е.И. Черника обыкновенная – источник биологически активных веществ с антиоксидантными свойствами // Сборник статей «Здоровое питание – основа жизнедеятельности человека». 2008. С.250–254.
19. Шилова И.В., Кувачева Н.В., Короткова Е.И., Краснов Е.А., Лукина А. Н. и др. Антиоксидантные свойства биологически активных веществ *Alfredia Cernua* и *Alfredia Nivea* // Растительные ресурсы. 2008. №1. С.114–121.

Автор считает своим долгом выразить искреннюю признательность научному консультанту – к.х.н., доценту Коротковой Елене Ивановне за помощь при подготовке и написании диссертационной работы; а также к.ф.н., ст. преподавателю кафедры фармацевтической химии СибГМУ Шиловой Инессе Владимировне; сотруднику НИИ Фармакологии ТНЦ СО РАН Плотникову Владимиру Михайловичу; Розите Николовой и Невене Петковой (Sofia, Bulgaria) за проявленный интерес к работе и плодотворное сотрудничество.