

УДК 664+544.182.344

СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ В ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

А.С. Лесков, В.А. Смирнов, Е.В. Давыдова, Л.В. Галкина

ФГУП «ВНИИФТРИ», Менделеево, Московская обл.

kafed@vniiftri.ru, davydova@vniiftri.ru

В статье описываются методы изучения свободных радикалов. Рассматривается взаимодействие антиоксидантов со свободными радикалами и активными кислородными соединениями в жидких средах, сопровождающееся передачей кислорода, имеющее электрохимическую природу. Указывается целесообразность изучения взаимодействия антиоксидантов и активных кислородных соединений с помощью электрохимических методов. Сообщается о разработке во ВНИИФТРИ метода очистки и идентификации антоцианов вина и виноградных соков.

Исследования проводились с использованием спектрометра электронного парамагнитного (ЭПР).

Ключевые слова: свободные радикалы, антиоксидантные свойства, методы изучения свободных радикалов, пищевые продукты, измерения, государственные эталоны

Введение

Конец XX и начало XXI века ознаменовалось бумом в развитии рынка биологически активных добавок (БАД). Особой строкой в списке БАД стоят антиоксиданты (далее - АО). [14] Реклама позиционирует их как панацею от-всех болезней (включая сердечно-сосудистые и онкологические), от преждевременного старения и увядания кожи, от порчи пищевых продуктов и т.п. Однако не все так однозначно в этом вопросе.

Что такое свободные радикалы (далее - СР) и откуда они берутся?

В чем заключается вред СР, с которыми борются АО?

Каков химизм их взаимодействия [6]?

Первое сообщение о существовании частицы с неспаренным электроном было сделано еще в 1900 году Громбергом [17], с тех пор тема

свободных радикалов и реакционно-способных кислородсодержащих частиц продолжает привлекать повышенное внимание со стороны научного сообщества и все в большей степени заинтересовывает широкую общественность. Потребляемая нами пища и состояние окружающей среды оказывают существенное влияние на биологическое производство свободных радикалов. Высокая реакционная способность радикалов приводит в экстремально физиологических условиях организма к ускорению перекисного окисления липидов (далее - ПОЛ) [11].

Неблагоприятное воздействие факторов внешней среды, таких как избыточная инсоляция, ионизирующее излучение, воздействие ксенобиотиков, попадающих в организм с воздухом, водой, пищей, могут приводить к избыточному образованию свободных радикалов и

возникновению окислительного стресса. Окислительный стресс, в свою очередь, вносит существенный вклад в развитие ряда заболеваний и старение организма человека. В настоящее время доказано разрушительное действие свободных радикалов, поступающих из пищи, как на организм в целом, так и на кожу в частности [6].

Чтобы понять, в чем заключается польза АО, надо ответить на несколько вопросов. Что такое АО и какова их химическая природа? Для снижения интенсивности свободно-радикальных процессов и уровня окислительного стресса в живых организмах в ходе эволюции возникла особая АО система, обеспечивающая окислительный (или антиоксидантный) гомеостаз, которая состоит из низко- и высокомолекулярных соединений. К низкомолекулярным соединениям, относятся вещества, взаимодействующие с диоксидными, гидроксильными и алкилдиоксильными радикалами с образованием малоактивных продуктов. К высокомолекулярным соединениям относятся вещества, утилизирующие пероксид водорода в организме, а также некоторые белки, способные связывать ионы Fe и Cu, являющиеся катализаторами свободнорадикальных процессов. При различных отклонениях от нормального функционирования организма может развиваться дисбаланс между интенсивностью СР процессов и функциональной активностью АО системы. Указанный дисбаланс вызывает окислительное повреждение биомо-

лекул, клеток и тканей и, в конечном итоге, гибель организма, а также играет ключевую роль в развитии большого количества опасных заболеваний, включая онкологические [14].

Свободные радикалы

СР – это атомные или молекулярные частицы, способные находиться в несвязанном состоянии и содержащие один или несколько неспаренных электронов. Поскольку электрон один занимает атомную или молекулярную орбиталь, то эти соединения обладают повышенной химической активностью, т.к. им необходимо «найти» еще один электрон для восполнения равновесия. И они находят их, вырывая из органических соединений, разрушая при этом их структуру, нарушая их функции и образуя при этом множество других СР [7]. Наиболее типичные и часто встречающиеся СР представляют собой активные формы кислорода, активные формы азота, продукты окисления липидов, к которым относятся: синглетный кислород, супероксидный анион-радикал ($O_2^{\bullet-}$), гидроперекисный радикал (HO_2^{\bullet}), гидроксильный радикал (HO^{\bullet}), свободный алкильный радикал (R^{\bullet}), алкоксильный радикал (RO^{\bullet}), пероксирадикал (ROO^{\bullet}), нитроксид (NO^{\bullet}), нитроксильный радикал (NO_2^{\bullet}), пероксинитрит ($ONOO^-$), липидный алкильный радикал (L^{\bullet}), липидный алкоксильный радикал (LO^{\bullet}), липидный пероксирадикал (LOO^{\bullet}) и ряд других [8].



Рис. 1. Взаимодействие радикалов-инициаторов, активных форм кислорода (O_2 , H_2O_2 , OH^{\cdot}) с различными компонентами клеток: нуклеиновыми кислотами, мембранными фосфолипидами, арахидоновой кислотой (АК), белками

Свободнорадикальное окисление

Свободнорадикальное окисление – важный и многогранный биохимический процесс превращений кислорода, липидов, нуклеиновых кислот, белков и других соединений под действием свободных радикалов, а перекисное окисление липидов (ПОЛ) – одно из его последствий. [3]

К числу первичных СР относятся супероксидный анион-радикал, окись азота, а вторичными СР являются гидроксильный радикал, синглетный кислород, перекись водорода, пероксинитрит. Образование СР тесно связано, с одной стороны, с появлением свободных электронов при нарушениях процессов окисления в дыхательной цепи, превращении ксантина, синтезе лейкотриенов и простагландинов. Эти реакции зависят от активности ксан-

тиноксидазы, дегидроротатдегидрогеназы, альдегидоксидазы, холестериноксидазы, ферментов цитохрома Р-450. Синтез супероксид-аниона инициируется ангиотензином II, который образуется из ангиотензина I под действием ангиотензин-превращающего фермента. Его активность в сосудах больных с выраженным атеросклерозом особенно высока. Причина этого явления пока неясна. Оксид азота образуется при окислении L-аргинина под действием NO-синтазы при участии кальмодулина. В литературе представлены данные о том, что синтез NO при атеросклерозе не нарушен, но его дефицит может возникать при его соединении с супероксид-анионом. Оно завершается синтезом пероксинитрита с большими патогенными потенциальными, в том числе и образованием окисленных форм ЛПНП.

С другой стороны, для синтеза вторичных СР используется водород НАДФ-Н, НАД-Н - его донаторов. Супероксид - анион может восстанавливать Fe^{3+} в Fe^{2+} , при взаимодействии которого с перекисью водорода, перекисями липидов и гипохлоритом образуются высокотоксичные вторичные радикалы. Из всех СР наибольшей активностью обладают гидроксильный радикал и пероксинитрит. [13]

Активность СР ограничивается антиоксидантами, которые разрывают цепи молекул при реакциях СРО, разрушают молекулы перекисей. К числу ферментных антиоксидантов относятся супероксиддисмутаза (СОД), глутатионпероксидаза, каталаза, находящиеся в клеточных структурах. Неферментные антиоксиданты – витамины Е, К, С, убихиноны, триптофан, фенилаланин, церулоплазмин, трансферрин, гаптоглобин, глюкоза, каротиноиды – блокируют активность СР в крови. Изменения структуры и функции субстратов, на которые действуют СР, зависит, в конечном счете, от соотношения активности СР и антиоксидантов [8].

В настоящее время существует большое количество дифференциальных и интегральных способов оценки антиоксидантных свойств как организма в целом, отдельных составляющих антиоксидантной защиты, так и АОО химических веществ, продуктов питания и биодобавок. Большинство существующих методов объединяет ряд особенностей, ограничивающих возможность

их использования рамками исследовательских лабораторий. В связи с этим поиск простого в исполнении и информативного метода определения интегральной антиоксидантной активности природных и синтетических объектов по-прежнему представляет большой интерес.

Большинство радикалов, образующихся в организме человека, можно разделить на природные и чужеродные. Природные радикалы подразделяют, в свою очередь, на первичные, вторичные (повреждающие) и третичные (радикалы антиоксидантов). Образование первичных радикалов осуществляется при участии определенных ферментных систем. Эти радикалы выполняют полезные для организма функции. Из первичного радикала - супероксида, а также в результате других реакций в организме могут образоваться весьма активные молекулярные соединения: перекись водорода, гипохлорит и гидроперекиси липидов. Под действием ионов металлов переменной валентности из этих веществ образуются вторичные свободные радикалы, такие, как радикал гидроксила и радикалы липидов, которые оказывают разрушительное действие на клеточные структуры.

В настоящее время установлено, что возникновение и развитие широкого круга воспалительных заболеваний сопровождается активацией свободнорадикальных реакций (далее - СРР) перекисного окисления липидов, денатурации белков и нуклеиновых кислот.

Образующиеся в клетке радикалы могут инициировать вторичные свободнорадикальные реакции, вступая во взаимодействие с различными клеточными компонентами: белками, нуклеиновыми кислотами и липидами (рис.1). В результате этих СРР происходит деградация молекул-мишеней с образованием более или менее стабильных продуктов реакций, идентификация и определение количества которых может быть параметром или маркером, определяющим скорость СРР. Наиболее часто используемым маркером инициации СРР является определение продуктов перекисной деградации фосфолипидов клеточных мембран и липопротеидов плазмы крови: конъюгированных диенов и гидроперекисей ненасыщенных жирных кислот, алканов и альдегидов, в частности малонового диальдегида.

Окисление ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов называется перекисным, потому что первичным стабильным продуктом этого процесса являются гидроперекиси (ROOH). В результате происходит перекисная деградация молекул фосфолипидов, что влечёт за собой нарушение структуры клеточных мембран и липопротеидов. Рассмотрим основные принципы регуляции ПОЛ при различных воспалительных заболеваниях.

В нормальном состоянии функционирования организма скорость СРР перекисаации липидов клеточных и мембран и липопротеидов относительно мала, что обу-

словлено низким уровнем образования радикалов – инициаторов и действием сбалансированной системы антиоксидантной защиты. Однако в процессе возникновения и развития воспалительных заболеваний это равновесие нарушается, резко возрастает продукция радикалов-инициаторов и наблюдается инактивация системы антиоксидантной защиты, развивается оксидативный стресс [13].

Методы изучения свободных радикалов

Биохимические методы

СР обладают высокой реакционной способностью, и изучать их обычными химическими методами невозможно: стандартные процедуры вроде хроматографии или центрифугирования бесполезны. Важную роль при решении таких вопросов играет так называемый ингибиторный анализ. Классическим примером может служить применение фермента супероксиддисмутазы (далее – СОД). Постепенно СОД стали широко использовать во всех исследованиях, где изучают роль супероксида в том, или ином процессе, будь то индивидуальная биохимическая реакция или развитие болезни у лабораторных животных или человека. Если добавление СОД тормозит изучаемый процесс, значит, для его протекания необходим супероксид-радикал. Остается выяснить, в какой именно реакции этот радикал участвует. Ингибиторный анализ используют и для изуче-

ния реакций с участием других радикалов.

Биофизические методы

Прямой метод изучения свободных радикалов - это метод электронного парамагнитного резонанса (далее –ЭПР) . По наличию, амплитуде и форме сигналов (спектров) ЭПР можно судить о существовании непарных электронов в образце, определять их концентрацию, а иногда и выяснить, какова химическая структура радикалов, которые эти непарные электроны содержат.

Эффективным методом изучения реакций с участием радикалов оказался метод хемолюминесценции (далее – ХЛ). При взаимодействии радикалов друг с другом выделяется много энергии, которая может излучаться в виде квантов света. Интенсивность такого свечения (ХЛ) пропорциональна скорости реакции, в которой участвуют радикалы, и, следовательно, показывает изменение их концентрации по ходу реакции. Надо отметить, что чувствительности этих методов часто бывает недостаточно. В биологических системах скорости образования радикалов кислорода или липидных радикалов в мембранах невелики, зато велики скорости исчезновения этих радикалов, поэтому концентрация радикалов в каждый данный момент времени обычно мала. Выход из положения заключается в использовании так называемых спиновых ловушек в методе ЭПР и активаторов свечения в методе хемилюминесценции. В данном случае к изучаемому образцу (например, к

суспензии клеток, гомогенату ткани или раствору, где протекают реакции с участием свободных радикалов) добавляют особые вещества, называемые спиновыми ловушками. При взаимодействии ловушки с радикалом происходит присоединение радикала к ловушке с образованием нового, стабильного радикала, получившего название спинового аддукта. Сигналы ЭПР спиновых аддуктов разных радикалов слегка различаются по форме. Это позволяет идентифицировать радикалы, образующиеся в изучаемой системе. Для улавливания других радикалов используют другие ловушки [7].

Свободные радикалы и антиоксиданты

При различных отклонениях от нормального функционирования организма может развиваться дисбаланс между интенсивностью СР процессов и функциональной активностью АО системы. Указанный дисбаланс вызывает окислительное повреждение биомолекул, клеток и тканей и, в конечном итоге, гибель организма, а также играет ключевую роль в развитии большого количества опасных заболеваний, включая онкологические. Возникшая в ходе эволюции АО система, обеспечивающая окислительный гомеостаз, состоит из низко- и высокомолекулярных соединений.

Гомеостаз – это окислительно-восстановительное равновесное состояние между внешним напором кислорода и других окислителей (в

т.ч. и СР) и барьером, состоящим из большого набора АО. СР проникают в клетки организма, разрушают органические вещества, образуя при этом множество других СР. Если этот процесс пошел, то его практически невозможно остановить, можно лишь замедлить [2].

В настоящее время, ведется активный поиск и исследование веществ с антиоксидантным действием, богатейшим источником которых оказались растения [15].

Флавоноиды - вторичные метаболиты растений представляют собой широкий спектр ароматических соединений, подразделяющихся на несколько групп структурно-сходных полифенолов и насчитывающих более 5000 индивидуальных веществ. Особый интерес представляют полифенолы красного винограда, обладающие наиболее высокой биологической активностью и подразделяющиеся по основным группам:

- фенолоксилоны (производные гидроксибензойной и гидроксикоричной кислот)

- флавонолы (кверцетин)

- катехины (в том числе и их полимеры - проантоцианидины, танины)

- лейкоантоцианидины

- антоцианы (п-гидроксибензойная кислота, кофейная кислота, лейкоцианидин, мальвидин-3-глюкозид, катехин, кверцетин, проантоцианидин, витамин В1).

Было доказано, что флавоноиды винограда замедляют окисление ПОЛ. Причем виноградные полифе-

нолы оказались вдвое эффективнее а-токоферола при одинаковой концентрации. Мощные антиоксиданты полифенольной структуры обнаружены во всех исследуемых сортах красного винограда, произрастающего в Калифорнии [1].

Эффект улавливания свободных радикалов *in vitro* флавоноидами может быть зарегистрирован несколькими способами, один из которых - тест с голубым п-нитро тетразолиумхлоридом. Такая оценка особенно эффективна при определении ингибирования супероксид-радикалов. В присутствии антиоксидантов захват супероксид-радикалов сопровождался восстановлением аптоцианида с образованием окраски голубого цвета, которая количественно определяется колориметрически при длине волны 560 нм.

Согласно литературным данным, исследование антиоксидантов в настоящее время проводится в двух направлениях: определение состава веществ, способных выполнять функции антиоксидантов, и определение общих антиоксидантных свойств объектов. Группа веществ, предотвращающая образование сильных окислителей *in vivo*, довольно разнообразна. К ним относятся SH-содержащая аминокислота цистеин, некоторые пептиды и белки (глутатион, альбумин), убихинон, аскорбиновая кислота, мочевая кислота, токоферолы, каротиноиды, флавоноиды и др. Определение состава антиоксидантов позволяет судить о возможной физиологической ценности продуктов, в которых они

содержатся. Однако исследование композиции веществ требует применения тех или иных процедур разделения. Кроме того, информации о составе антиоксидантов, как правило, недостаточно, чтобы судить об антиоксидантных свойствах в целом, так как в этом случае не учитываются процессы взаимного восстановления антиоксидантов и влияние матрицы исследуемого объекта.

Оценить общую антиоксидантную активность того или иного объекта можно с помощью интегральных методов. В основе методов оценки общей антиоксидантной активности, как правило, лежат реакции взаимодействия антиоксидантов со свободными радикалами, которые служат прототипом свободных радикалов, образующихся в живой клетке. Обеспечивая получение информации об АОО того или иного образца, такие методы имеют ряд особенностей, которые ограничивают возможности их применения. А именно, анализ проходит в несколько стадий и занимает довольно продолжительное время, аналитический сигнал необходимо регистрировать с помощью дорогостоящего спектрофотометрического или флуориметрического оборудования, а также требуется использование дорогостоящих реактивов.

Взаимодействие антиоксидантов с СР и активными кислородными соединениями ($O^{\cdot -}$, HO^{\cdot} , H_2O_2) в жидких средах сопровождается передачей электрона и, следовательно, имеет электрохимическую природу.

В связи с этим представляется целе-

сообразным изучать взаимодействие АО и активных кислородных соединений с использованием электрохимических методов. Электрохимические методы характеризуются высокой чувствительностью, быстротой процедуры анализа, относительно невысокой стоимостью необходимого оборудования и реактивов, а значит, и анализа в целом. В этой ситуации наиболее доступным источником информации может служить измерение электрохимических параметров системы реагент/антиоксидант, например, окислительно-восстановительного потенциала [16].

Очень интересные данные представлены в работе Лапина А.А. «Оценка антиоксидантной активности вин» В вышеуказанной работе для оценки антиоксидантной активности вин использовался кулонометрический метод анализа с помощью электрогенерированных радикалов брома на серийном кулонометре утвержденного типа. Определялась АОО различных сортов вин в мг рутина на 100 мл вина. [9] Для изучения влияния АФК на вина к ним добавлялась 3%-ая медицинская перекись водорода в соотношении 1:1 по объему. При добавлении перекиси водорода найденная АОО увеличивается по сравнению с расчетной величиной, учитывающей простое смешение реагентов. Следует, однако, отметить, что в результате взаимодействия антиоксиданта в данном случае антоцианов вина с сильным радикалом происходит нейтрализация свободного радикала

и количество антиоксиданта должно уменьшаться на долю, израсходованную в ходе реакции [10].

В настоящее время во ФГУП «ВНИИФТРИ» ведется разработка метода очистки и идентификации антоцианов вина и виноградных соков, а также выявление нового критерия для показателя «общей антиоксидантной активности» - радикальной характеристики, которой не могут обладать вышеупомянутые органические соединения, искусственно повышающие «общую антиоксидантную активность» вин и соков.

Для выявления индивидуальных природных антоцианов их необходимо выделить в чистом виде из состава вин и соков, так как химический состав винограда и продуктов его переработки (вина, соки) включает соединения различных классов: углеводы, органические кислоты, фенольные, азотистые, минеральные и др [13].

На первом этапе работы, в связи с ростом тенденции использования физико-химических методов анализа, проведено исследование на радикальную активность образца нектара яблочно-вишневого осветленного стерилизованного (производство г. Воронеж) с помощью спектрометра электронного парамагнитного резонанса утвержденного типа с метрологическими характеристиками, которые удовлетворяют условиям достижения поставленной задачи. Так как ЭПР определяет свободные радикалы в твердом веществе, было решено нанести образ-

цы вина на Whatman (специальная хроматографическая бумага высокого качества), используемый для хроматографии и использовать их для измерений [4].

Процесс выделения антоцианов из вина, соков и определения их радикальной активности состоял из следующих стадий:

- упаривание образца вина или сока для удаления спирта;
- разбавление дистиллированной водой;
- смешивание с порошком талька;
- перенесение суспензии на фильтр Шота;
- элюирование дистиллированной водой для удаления примесей;
- элюирование антоцианов подкисленным этанолом;
- упаривание антоцианов;
- хроматографическое разделение антоцианов на бумаге;
- определение радикальной активности индивидуальных антоцианов.

На втором этапе проделанной работы была создана кристаллическая решетка MgO/Mn^{2+} , которая наносится на хроматографический ватман. При отсутствии гостированной методики определения свободных радикалов в жидких средах с использованием спектрометра ЭПР нами была разработана следующая методика, при разработке которой необходимо было:

- выбрать тип подложки, не содержащей свободных радикалов;
- нанести на подложку сигнальный образец;

- определить количество наносимого образца.

Экспериментальная часть

Материалы и методика

Материалы: нектар яблочно-вишневый осветленный стерилизованный (производство г.Воронеж).

Методика: исследование радикальной активности нектара проводилось на спектрометре электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) утвержденного типа с метрологическими характеристиками, которые удовлетворяют условиям достижения поставленной задачи. Спектрометр ЭПР определяет свободные радикалы в сухом веществе, в связи с чем было принято решение перевести пробу нектара в воздушно-сухое состояние.

Полоска хроматографической бумаги для измерения готовилась следующим образом: полоски нарезались, взвешивались, на полоски с одинаковой массой, равной 27 мг, наносилось MgO/Mn^{2+} (содержащий 2мг MgO), высушивали при температуре 60 °С до постоянного веса в термостате.

Проба в количестве 400 микролитров наносилась на полоску (в дальнейшем подложку) хроматографической бумаги типа Whatman. (Whatman - специальная хроматографическая бумага высокого качества, применяемая в хроматографии) [4].

Подложку с нанесенной пробой высушивали при температуре 60 °С до постоянного веса.

При нанесении исследуемых образцов на Whatman с содержа-

ем 2мг MgO рН образца становится равен 10. При этом содержащиеся в образце нектара «яблоко-вишня» полифенолы меняют цвет с вишневого на зелёный. Измерения образцов проводилось дважды: 1) сразу же после продувки молекулярным кислородом, 2) через 6 дней после продувки молекулярным кислородом.

Исследовалось три типа проб:

1 проба – нативный нектар;

2 проба – нектар продутый

90% кислородом;

3 проба – нектар обработанный.

Результаты измерений

В результате измерения ЭПР было выявлено наличие свободных радикалов в исходном образце нектара (рис.2). При измерении ЭПР образца нектара, продутого кислородом, не было выявлено существенных отличий от исходного образца (рис. 3), т.е. продувание молекулярным кислородом не приводит к окислению наиболее химически активных веществ (в т.ч. образующих радикалы), т.к. большая часть веществ уже окислилась в процессе изготовления нектара. Следующие измерения производились через 6 дней после изготовления образцов. Сравнение результатов, полученных в первый и шестой дни эксперимента, показало отсутствие видимых различий между исходным и прокаченным кислородом образцом (рис. 4 и 5).

Анализ полученных результатов и сравнение их с результатами, описанными ранее Лапиным А.А.,

позволили нам усложнить ход эксперимента. Было принято решение, добавить в нектар пероксид водорода (3 мл 30% H_2O_2 на 20 мл нектара). Измерение ЭПР полученного образца показало отсутствие радикальной

активности, т.е. антоциан радикала (рис. 6). Таким образом, слабый радикал (антоциан радикал) окисляется сильным радикалом H_2O_2 .

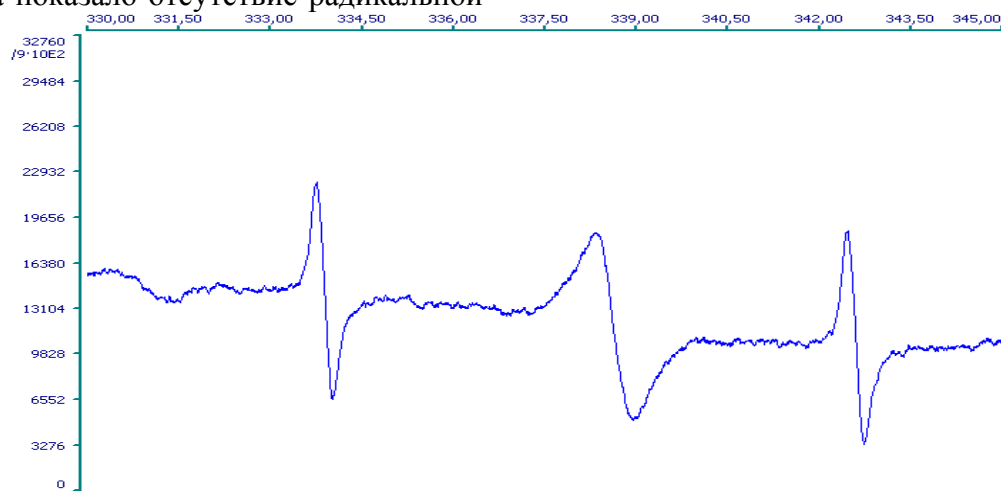


Рис. 2. Спектрограмма ЭПР исходного образца нектара «яблоко-вишня»

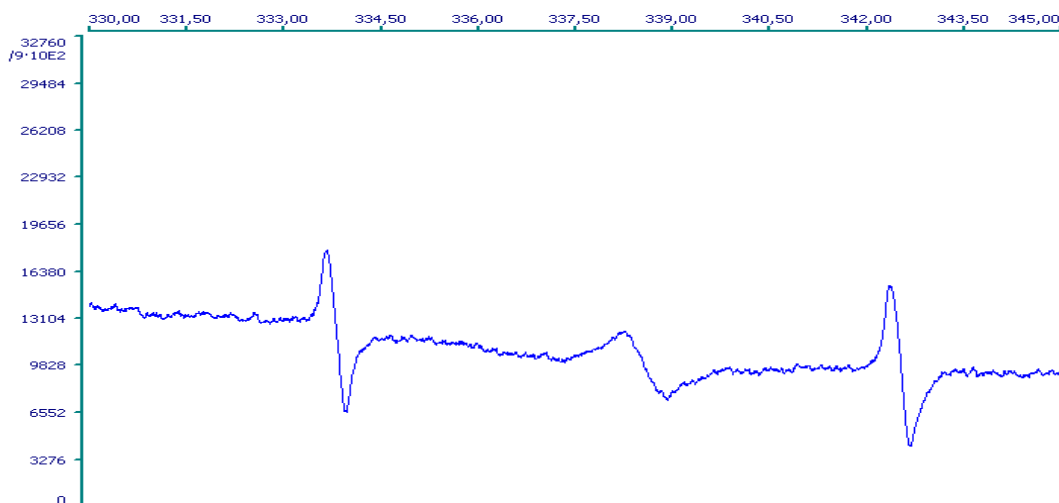


Рис. 3. Спектрограмма ЭПР образца нектара «яблоко-вишня», продутого 90% кислорода

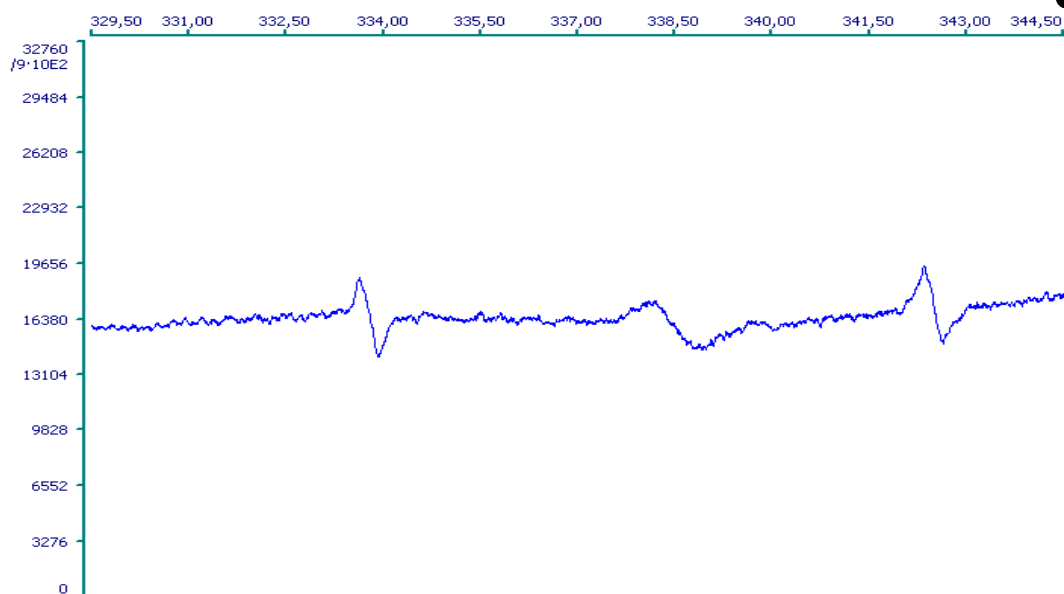


Рис. 4. Спектрограмма ЭПР исходного образца нектара «яблоко-вишня» (измерения на 6 день)

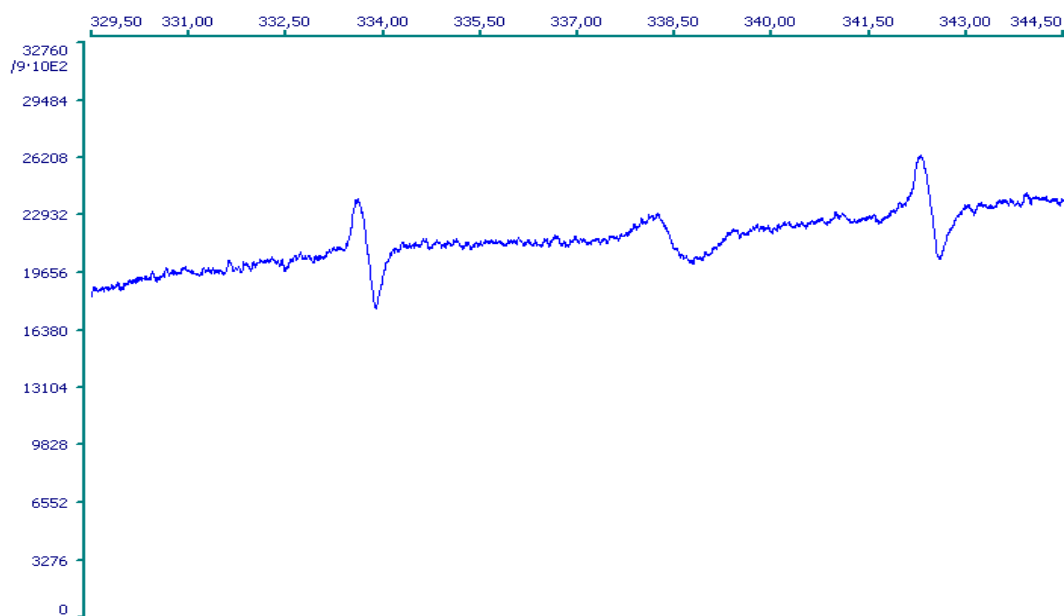


Рис. 5. Спектрограмма ЭПР образца нектара «яблоко-вишня», продутого 90% кислорода (измерения на 6 день)

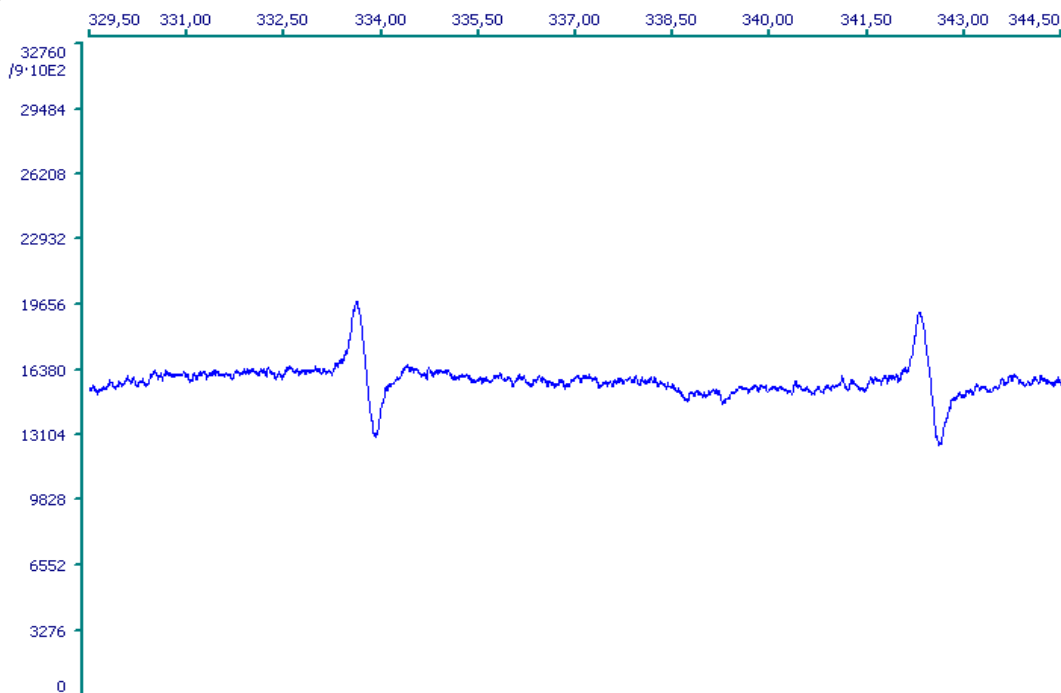


Рис. 6. Спектрограмма ЭПР образца нектара «яблоко-вишня», обработанного пероксидом водорода (измерения на 6 день)

На основе проведенных измерений сделаны следующие выводы:

продувка активными формами кислорода не приводит к увеличению количества свободных радикалов;

обработка нектара перекисью водорода приводит к нейтрализации антоциан-радикала.

Принимая во внимание вышесказанное, целесообразно проведение одномоментного анализа как антиоксидантной, так и свободнорадикальной активности.

Данная работа продолжается совместными усилиями двух НИО с применением двух государственных первичных эталонов, а именно Государственного первичного эталона единицы дифференциальной резо-

нансной парамагнитной восприимчивости и Государственного первичного эталона единицы концентрации растворенного кислорода и водорода в жидких средах. Спектральный неразрушающий метод позволит, по нашему прогнозу, в сочетании с некоторыми традиционными методами физической химии разработать метрологически обеспеченные методы определения качества вина и соков, а также других органических веществ и продуктов, представляющих интерес с точки зрения их безопасности хранения в государственных резервах [5]. Метод с применением ЭПР и растворенного кислорода разрабатывается впервые.

Литература

1. Блажей А.С., Шутый Л.П. Фенольные соединения растительного происхождения. М.: Мир, 1997.
2. Василькевич И. Оценка антиоксидантной активности фруктовых соков // «Индустрия напитков № 5», 2007, с. 20-23
3. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов биологических мембран. М. Наука. 1972.
4. Галкина Л.В. Разработка метода очистки антоциана вина и виноградных соков с целью определения натуральности. «Метрология в 21 веке». Доклады научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов и специалистов, 2014.
5. Давыдова Е.В., Лесков А.С., Смирнов В.А., Балаханов Д.М. Эталонная база метрологического обеспечения пищевой промышленности // Альманах современной метрологии, 2014. №1, с. 239-246.
6. Диплок Э. Антиоксиданты, питание и здоровье. Пища и пищевые добавки. Роль БАД в профилактике заболеваний. Под ред. Дж. Ренсли, Дж. Доннелли, Н. Рида. М.: «Мир», 2004, 312 с.
7. Клебанов Г.И., Бабенкова И.В., Теселкин Ю.О. Оценка антиокислительных свойств плазмы крови с применением желточных липо-протеидов // Лабораторное дело, 1988, №3, с. 59-62.
8. Клебанов Г.И. Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Любичкий О.Б., Владимиров Ю.А. Антиоксидантная активность сыворотки крови // Вестн. Росс. Акад. мед. наук, 1999. №2, с. 15-22.
9. Лапин А.А. Антиоксидантные свойства растительных полсахаридов / Лапин А.А., Зеленков В.Н. VII Международная конференция «Биоантиоксидант». Тезисы докладов 25-26 октября 2006 года. М. 2006, с. 175-177.
10. Лапин А.А. Оценка антиоксидантной активности вин // Индустрия напитков 2008, №5, с. 118-122.
11. Меньшикова Е.Б. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов Е.Б. Меньшикова, Н.К. Зенков // Успехи соврем. биологии, 1993, Т. 113, вып. 4, с. 442-455.
12. Осипов А.Н., Азизова О.А., Владимиров Ю.В. Активные формы кислорода и их роль в организме. // Успехи биол. химии, 1990, т. 31, вып. 5, с.180-207.
13. Птицын А.В., Каплун А.П. и др. Выделение и очистка антоциана винограда *Vitis Vinifera* С. Сорты «Изабелла» // Биотехнология, № 2, 2007.
14. Рациональное питание. Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ. МР 2.3.1.1915-04.
15. Танчев С.С. Антоцианы в плодах и овощах. М.: Пищевая промышленность, 1980, 304 с.
16. Яшин, Я.И. Проблема определения содержания антиоксидантов / Я.И. Яшин, А.Я. Яшин // Метрология, 2009, № 8 (69), -с. 50-53.
17. Greenberg A., Liebman J Energetics of Free Radicals, Blackie Academic and Professional, New York, 1996.