

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

В.А. Смирнов, В.В. Смирнова

ФГУП «ВНИИФТРИ», Менделеево, Московская обл.

В работе приводится описание и даётся анализ методов и модификаций методов определения антиоксидантной активности. Делаются выводы о применимости методов для определения антиоксидантной активности в продуктах биотехнологий.

Ключевые слова: биологические объекты, антиоксидантная активность, методы измерений, свободнорадикальные реакции, биотехнологии

Введение

Создание комплексной системы оценки антиоксидантной активности биологических объектов предполагает разработку стандартных количественных аналитических методов, с помощью которых можно получить всю необходимую информацию о структуре и свойствах этих веществ. Одной из важнейших характеристик биологических объектов является его антирадикальная активность, то есть способность молекулы биоантиоксиданта (и продуктов его превращения) связывать активные свободные радикалы и тем самым ингибировать процесс разрушения биологической среды.

В научной практике широко распространен подход, в соответствии с которым оценка антирадикальной активности биоантиоксидантов проводится в ходе исследования процесса ингибированного окисления какого-либо модельного субстрата. Такой подход представляется, безусловно, правильным, поскольку, с одной стороны, процессы

цепного окисления органических веществ достаточно хорошо изучены, а с другой, - разрушение биологической среды часто непосредственно связано с процессами окисления, протекающими в этой среде.

Объективной трудностью в реализации данного подхода является сложность исследуемого процесса: в зависимости от условий механизм ингибированного окисления углеводородного субстрата может включать в себя десятки разнообразных реакций, детальное исследование которых практически невозможно.

В последнее десятилетие проявляется большой интерес к определению антиоксидантной активности лекарственных препаратов, биологически активных веществ, пищевых продуктов и напитков. В настоящее время научно установлена прямая связь между ростом содержания свободных радикалов и возникновением наиболее опасных заболеваний. Концентрация свободных радикалов (супероксидный радикал,

пероксид водорода, гидроксил радикал и др.) возрастает из-за снижения активности естественной антиоксидантной системы человека, связанной с воздействием радиации, УФ облучения, курения, алкоголизма, постоянных стрессов, инфекционных болезней, некачественного питания. Это состояние называется окислительным стрессом. За счет вредных воздействий свободных радикалов повреждаются стенки сосудов, мембраны, окисляются липиды. Наибольшую опасность представляет цепное окисление полиненасыщенных жирных кислот (перекисное окисление липидов), при этом образуются гидроперекиси, обладающие высокой реакционной способностью и повреждающим действием. Все эти нарушения приводят к серьезным патологическим изменениям, в частности, к сердечно-сосудистым, онкологическим заболеваниям, астме, артритам, диабету, катаракте, болезням Альцгеймера и Паркинсона, а также к преждевременному старению. В настоящее время более 100 опасных болезней связывают с окислительным стрессом.

Воздействие на организм свободных радикалов можно уменьшить за счет систематического употребления некоторых лекарственных растительных препаратов, биологически активных добавок, продуктов питания и напитков, обладающих высокой антиоксидантной активностью.

Создание комплексной системы оценки антиоксидантной активности биологических объектов предполагает разработку стандартных количественных аналитических методов, с помощью которых можно получить всю необходимую информацию о структуре и свойствах этих веществ. Одной из важнейших характеристик биологических объектов является его антирадикальная активность, то есть способность молекулы биоантиоксиданта (и продуктов его превращения) связывать активные свободные радикалы и тем самым ингибировать процесс разрушения биологической среды.

В научной практике широко распространен подход, в соответствии с которым оценка антирадикальной активности биоантиоксидантов проводится в ходе исследования процесса ингибированного окисления какого-либо модельного субстрата. Такой подход представляется, безусловно, правильным, поскольку, с одной стороны, процессы цепного окисления органических веществ достаточно хорошо изучены, а с другой, - разрушение биологической среды часто непосредственно связано с процессами окисления, протекающими в этой среде.

Объективной трудностью в реализации данного подхода является сложность исследуемого процесса: в зависимости от условий механизм ингибированного окисления углеродного субстрата может включать в себя десятки разнообразных реакций, детальное исследо-

вание которых практически невозможно.

В то же время, чтобы правильно характеризовать эффективность антиоксидантов, достоверно сравнивать ее у разных веществ, надежно прогнозировать изменение при изменении условий окисления, необходимо выявить и количественно охарактеризовать все основные реакции, определяющие эффективность антиоксиданта в рассматриваемых условиях.

Таким образом, требуется создать такой метод измерения активности биоантиоксидантов, который сочетал бы в себе два противоречивых требования: полноту исследования механизма процесса, с одной стороны, и оперативность, простоту получения информации, с другой.

1. Антиоксиданты

В настоящее время уже не вызывает сомнения тот факт, что многие биохимические реакции, обеспечивающие жизнедеятельность клеток, органов и организма в целом, протекают с образованием и участием свободных радикалов. Их концентрация тонко регулируется сложными физико-химическими механизмами, нарушение которых может привести к возникновению окислительного стресса.

Окислительные изменения наиболее ярко выражены в липидном бислое клеточных мембран, поскольку по сравнению с белками и нуклеиновыми кислотами липиды окисляются намного легче.

Изучение перекисного окисления было начато более 50 лет назад школами проф. Б.Н. Тарусова на кафедре биофизики биофака и академика Н.М. Эмануэля на кафедре химической кинетики химфака МГУ им. М.В. Ломоносова.

Впервые на возможное вредное воздействие свободных радикалов в биосистемах в нашей стране обратил внимание Н.И. Эммануэль [1-3]. В настоящее время роль свободных радикалов в организме человека интенсивно изучается во многих странах, опубликованы тысячи научных работ, десятки книг [4-8]. Научные аспекты воздействия свободных радикалов исследуются в Институте биоорганической физики им. Н.И. Эмануэля под руководством Е.Б. Бурлаковой [9].

В настоящее время установлена прямая связь между ростом содержания свободных радикалов и возникновением наиболее опасных заболеваний. За счет вредных воздействий свободных радикалов повреждаются стенки сосудов, мембраны, окисляются липиды. Наибольшую опасность представляет цепное окисление полиненасыщенных жирных кислот (перекисное окисление липидов), при котором образуются гидроперекиси, обладающие высокой реакционной способностью и повреждающим действием. В связи с этим в последнее десятилетие проявляется большой интерес к определению антиоксидантной активности лекарственных препаратов, биологически активных

веществ, пищевых продуктов и напитков.

1.2 Основные типы свободных радикалов

Свободные радикалы – атомы или молекулы, имеющие на внешней оболочке один или несколько неспаренных электронов. Это делает радикалы химически, высокорекреационноспособными, т.к. радикал термодинамически выгодно или вернуть недостающий электрон или отдать лишний электрон. Наиболее активные кислородные формы: супероксид анион (O_2^{-1}), гидропероксил радикал (HO_2), пероксид водорода (H_2O_2), радикал (HO^*).

Супероксид анион образуется при захвате молекулярным кислородом дополнительного электрона:

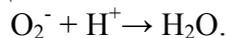


Это происходит при воздействии на кислород ионизирующей радиации. Супероксид анион образуется в ряде биохимических реакций как промежуточный продукт. В частности, при превращении ксантина в мочевую кислоту ферментом ксантиноксидазой выделяется супероксид радикал. Альдегидоксидаза также генерирует супероксид радикал. Супероксиды образуются при автоокислении гидрохинона, катехоламинов и тиолов. Следовые количества их образуются при поглощении кислорода гемоглобином и тиоглобином.

Обычно супероксид анион короткоживущий и быстро конвертируется в пероксид водорода ферментом супероксиддисмутазой и при этом устанавливается постоянная

его концентрация на уровне 1×10^{-11} М.

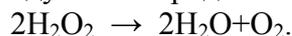
Гидропероксил радикал образуется из супероксида по следующей реакции:



Гидропероксил радикал весьма короткоживущий и самопроизвольно разлагается в пероксид водорода и кислород:



Пероксид водорода каталазой и глутатионпероксидазой превращается в воду и кислород:



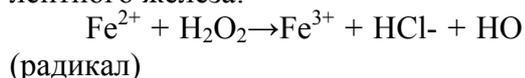
Гидропероксил можно определять количественно методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с амперометрическим детектором [10].

Гидроксил радикал *in vivo* можно измерять также методом ВЭЖХ с электрохимическим детектором (ЭХД), измеряя салицилат (ловушка гидроксил радикала) и 2,3-дигидрооксибензойную кислоту (ДНВА) с высокой чувствительностью [11].

Другим активным эндогенным свободным радикалом является оксид азота (NO^*) со временем жизни 6 с. Его не прямое определение *in vivo* возможно по анализу 3-нитротирозина или отношения 3-нитротирозина к тирозину методом ВЭЖХ с амперометрическим детектором [12].

Основные радикалы образуются под действием разных облучений, в т.ч. УФ – облучения, и в процессе метаболизма токсичных неприродных соединений (ксенобиоти-

ков), включая и некоторые лекарственные соединения. Свободные радикалы могут возникать также в результате реакций окисления или восстановления с участием ионов металлов с переменной валентностью, которые служат акцептором или донором одного электрона. Самая известная такая реакция – это реакция Фентона – взаимодействие пероксида водорода с ионом двухвалентного железа:



(неспаренный электрон в радикалах принято обозначать точкой).

Вторая известная реакция – это реакция Хабера-Вейсса – взаимодействие супероксида аниона с пероксидом водорода:



Для этой реакции тоже требуются катионы переходных металлов, такие как железо или медь.

Гидроксильные свободные радикалы – высокоэнергетичные, короткоживущие и токсичные. Токсичность пероксида водорода и супероксида аниона также связывают с возможностью их конверсии с образованием гидроксил радикалов. Возникновению свободных радикалов способствует длительный прием лекарств, обладающих прооксидантными свойствами, в частности, некоторых антибиотиков, препаратов железа, меди и др., а также проведение ряда лечебных процедур (кислородотерапия, УФ – облучение и др.). Считается, что активные формы кислорода в небольших количествах необходимы наше-

му организму, т.к. с их помощью происходит уничтожение вредных бактерий, отмирающих клеток, и они поддерживают клеточный гомеостаз. Однако при больших концентрациях кислородные свободные радикалы начинают повреждать липиды, мембраны, ДНК, белки и здоровые клетки в целом.

Как уже указывалось выше, наиболее чувствительны к действию свободных радикалов ненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав фосфолипидов клеточных и субклеточных мембран. Взаимодействие свободных радикалов с полиненасыщенными жирными кислотами идет по цепному механизму, часто этот процесс называют пероксидным окислением липидов. При окислении белков образуются карбонильные производные белков и другие соединения, например, из гистидина получается 2-оксогистидин, из метионина – сульфоксид метионина. 2-оксигистидин и дитиозин являются маркерами окисления белков свободными радикалами, эти соединения можно определять ВЭЖХ с АД. При воздействии свободных радикалов на ДНК, которые являются носителями генетического кода жизни, происходит в основном окисление и модификация оснований, что в конечном итоге приводит к изменению функциональности и болезням. По определению уровня 8-гидрокси-2'-деоксигуанозина (8OH2DG) 7-метилгуанозина, 5-гидрокси-2'-деоксицитидина и других производных можно судить о степени поражения ДНК. Эти анали-

зы можно также выполнять ВЭЖХ с АД [12]. Кроме оценки степени оксидантного стресса по этим маркерам можно на ранних стадиях проводить диагностику заболеваний, в частности онкологических.

1.3. Основные природные и синтетические антиоксиданты

Многие органические и неорганические вещества, находясь в атмосфере с кислородом, подвергаются окислению. Антиоксиданты – вещества, в малых концентрациях замедляющие или предотвращающие окислительные процессы [12].

Окислительные процессы могут проходить в организме человека, в растениях, пищевых жирах, в некоторых технических продуктах (полимеры, каучуки, минеральные масла и пр.). Процесс окисления приводит к преждевременному старению и болезням человека, старению полимеров и ухудшению их свойств, осмолению топлив, образованию кислот в технических маслах и т.д. Введение веществ-антиоксидантов сильно тормозит или устраняет вышеперечисленные деструктивные процессы. Добавка, например, в масло всего 0,001-0,01% антиоксидантов надолго приостанавливает процесс его окисления.

Перекисное окисление рассматривается как нормальный физиологический процесс - неотъемлемое звено существования живого организма. Оно протекает по цепному механизму на определенном стационарном уровне, который под

регуляторными системами, каждая из которых работает на присущей только ей стадии окисления. Скорость окисления пропорциональна квадрату концентрации свободных радикалов, непосредственно реагировать с которыми способны только природные антиоксиданты (АО) - ингибиторы радикальных процессов, обладающие высоким к ним сродством[13]. Основную роль в этих реакциях играет перекисный радикал RO_2 . Взаимодействуя с антиоксидантом, химически активный RO_2 , замещается малоактивным радикалом. Малоактивный радикал не способен с достаточной скоростью продолжать цепь реакций, поэтому в присутствии антиоксиданта окисление сильно замедляется, либо вообще приостанавливается.

Основными природными антиоксидантами являются полифенолы.

От избытка свободных радикалов в здоровом организме защищает естественная антиоксидантная система, которая способна полностью нейтрализовать вредное воздействие радикальных форм кислорода. Нормальное существование живых организмов в атмосфере с высоким содержанием кислорода, при ультрафиолетовом облучении солнечными лучами и в присутствии естественного радиационного фона возможно только при наличии природной антиоксидантной системы, защищающей от окислительного повреждения. Такие системы в живых организмах сформировались в результате длительной эволюции. Антиоксидантная система включает фермент-

ные и неферментные вещества [14]. В частности, фермент супероксиддисмутаза превращает супероксид в пероксид водорода ($O_2 \rightarrow H_2O_2$), а каталаза и глутатионпероксидаза превращают пероксид водорода в воду и кислород ($H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$). К неферментным относятся аскорбиновая и мочевиная кислоты, токоферол, (3-каротины, глутатион, мелатонин, убихинон, женские половые гормоны, тироксин, стероидные гормоны, тиоловые соединения гомоцистеин и др.), флавоноиды и другие полифенолы [15].

Некоторые белки с хелатирующими свойствами предотвращают катализ свободно-радикальных реакций переходными металлами (трансферрин, лактоферрин, церулоплазмин, альбумин, гантоглобин, гемопексин).

Естественно, при дисбалансе антиоксидантной системы организму необходима помощь — специальная терапия природными антиоксидантами, в частности биофлавоноидами [16].

Антиоксиданты разделяются на водорастворимые и жирорастворимые [17]. К водорастворимым антиоксидантам относятся: аскорбиновая кислота (витамин С), природные полифенольные соединения, в частности, разные флавоноиды оксиароматические кислоты, катехоламины, индоламины, производные кумаринов, тиоловые соединения (цистеин, гомоцистеин, таурин, глутатион и др.), некоторые олигопептиды (корнитин, эндорфины и др.) [18].

К жирорастворимым антиоксидантам относятся витамин Е (токоферолы и токотриенолы), каротиноиды, ретинол (провитамины и витамин А), убихинон. Жирорастворимые антиоксиданты защищают от свободных радикалов биомембраны, их липидные структуры. По механизму воздействия антиоксиданты можно разделить на три типа [19]:

Антиоксиданты – **обрывающие** цепные реакции.

Полифенолы в реакционной среде легко отдают свои электроны свободным радикалам, превращаясь в инертные молекулы, слабые феноксил-радикалы, уже не способные к продолжению цепной реакции.

Антиоксиданты – **очистители**, которые освобождают организм человека от большинства свободных радикалов, восстанавливая их до неактивных форм.

Антиоксиданты – **ловушки**, имеющие сродство только к определенным свободным радикалам, в частности, ловушки гидроксил-радикалов, синглетного кислорода и др.

При сочетании некоторых антиоксидантов с другими соединениями может наблюдаться как синергетический (усиливающийся), так и эффект ингибирования (подавления). Эти процессы весьма важны, и они требуют глубокого изучения.

Естественная антиоксидантная система тканей в первую очередь представлена ферментами супероксиддисмутазой, пероксидазой, каталазой, глутатион редуктазой. В качестве антиоксидантов служат некото-

рые белки, в частности, трансферрин, гаптоглобин, гемопексин и др., а также низкомолекулярные соединения: глутатион, тироксин, гомоцистеин и др.

В последние годы созданы синтетические антиоксиданты: ионол (2,6 –дитретбутил-4-метилфенол), фанозоны (K^+ или Li^+ соли дитретбутилфенилпропиловой кислоты), оксипиридин, мексидол. Среди структурных аналогов природных антиоксидантов можно назвать тролокс водорастворимый аналог витамина Е.

Для защиты пищевых продуктов от окисления используются синтетические фенольные антиоксиданты на основе галловой кислоты. Антиоксиданты защищают клеточные структуры от повреждения их свободными радикалами, это предохраняет организм человека от болезней.

Следует отметить, что антиоксидантный эффект при повышении некоторой пороговой величины может смениться в некоторых случаях прооксидантными [20].

Стабильные радикалы играют большую роль в химических процессах [21]. Для стабилизации полимеров, резин, технических масел широко применяются специальные синтетические антиоксиданты [22].

1.3 Методы измерения антиоксидантной активности

Свободным радикалом считается химическое соединение, имеющее один или более неспаренных электронов, образованное в результате либо потери, либо приобретения одного электрона. Неспаренным

считается электрон, занимающий в единственном числе молекулярную или атомную орбиталь. Высокая реакционная способность радикалов приводит в физиологических условиях к ускорению процессов окисления, разрушающих молекулярную основу клетки, и вызывает в результате многочисленные патологические состояния.

Соединения, способные связывать содержащие неспаренные электроны частицы с образованием менее активных или вовсе неактивных радикалов, называют антиоксидантами. Антиоксиданты играют важную роль в регуляции протекания свободнорадикальных превращений в организме, существенно влияя на его состояние, поэтому антиоксиданты и исследование антиокислительных свойств соединений в последнее время получили широкое распространение. Наиболее перспективными источниками антиоксидантов считаются растительные объекты. Методы исследования общей антиокислительной активности (АОА) различаются по типу источника окисления, окисляемого соединения и способа измерения окисленного соединения. Эти методы дают широкий набор результатов, которые нельзя использовать по отдельности, а результаты должны быть интерпретированы с осторожностью. По способам регистрации проявляемой антиокислительной активности можно разделить методы на волюмометрические [23], фотометрические [24-25], хемиллюминесцентные [26-38], флуоресцентные [40-43],

электрохимические [46-51] и ряд более специфических [51-57].

Обычно используется протекающая по радикальному механизму модельная реакция (чаще всего – окисления) какого-либо индивидуального соединения, по влиянию на протекание которой и оценивается АОА индивидуального соединения или смеси. Кинетика контролируется либо по поглощению кислорода способами измерения объема [23], либо по изменению характеристик реакционной смеси – изменению поглощения электромагнитного излучения, флуоресценции, люминесценции и т.д. В ряде случаев создаются условия для генерирования свободных радикалов с постоянной скоростью, добавлением инициаторов, либо с химической генерацией радикалов в результате протекания контролируемого химического процесса (Фентон).

Электрохимические методы

Электрохимические методы оценки АОА могут быть разделены на две группы. В части методов используется только электрохимическая регистрация какого-либо соединения, изменение концентрации которого косвенно связано с протеканием процессов окисления [41-49].

Другая группа методов [50-52] основана на непосредственном измерении окислительно-восстановительных потенциалов, эти параметры в целом коррелируют с АОА и могут быть использованы для ее оценки. В разных методах определяются либо отдельные антиокислительные компоненты (например, ви-

тамин Е, аскорбиновая кислота и т.д.), либо общая антиокислительная активность (АОА). Определение концентрации отдельного соединения, обладающего свойствами антиокислителя, часто менее информативно по сравнению с определением общей антиокислительной активности.

Общая антиокислительная активность может быть установлена несколькими методами: по поглощению кислорода при перекисном липидном окислении [23], окислению кроцина [24-26], хемиллюминесценции с люминолом [37, 39, 57], окислению R-фикоэритрина [60-62], чувствительности эритроцитов к гемолизу [63], восстанавливающей железо активности [64], генерировании липидных перекисей [65-66]. В ряде методик измеряют активность антиокислительных ферментов, таких как аскорбат-пероксидаза, глутатион-редуктаза, дегидроаскорбат-редуктаза и монодегидроаскорбат-редуктаза [67]. Часто проводятся сравнительные исследования, АОА, измеренная одним из методов, сравнивается с АОА, измеренной при влиянии измеряемого соединения на протекание той или иной патологии. Так, Kinjo с соавторами [67], фракционируя компоненты зеленого чая, измеряли АОА фракций по методу DPPH, сравнивая с их влиянием на рост клеток рака желудка МК-1.

Фотометрические методы

В основе наиболее многочисленных методов и модификации методов, используется фотометриче-

ская регистрация, вероятно, как самая удобная и доступная.

Колориметрическое определение общей антиокислительной активности (ТАС) по окислению кроцина впервые был предложено Tubaro F. [24]. Кроцин - красящее вещество из плода китайского растения *Gardenia grandiflora*.

Метод с окислением кроцина заключается в сравнении оптической плотности проб с кроцином и без, после инкубации, при 450 нм. Специфическое поглощение определяется по формуле: $100 \times (D_0 - D_{AOA}) / D_0$, где D_0 – поглощение в отсутствие антиоксидантов; D_{AOA} – поглощение в присутствии антиоксидантов.

Последние усовершенствования этого метода позволяют определять антиокислительную активность плазмы человека [25]. Метод был стандартизован по индивидуальному соединению, в качестве которого был использован тролокс (Trolox) – водорастворимый аналог витамина Е (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота). В дальнейшем планируется модификация этого метода с целью дифференциации влияния эндо- и экзогенных антиоксидантов. Метод пригоден для оценки антиокислительной активности пищевых продуктов. Сделана также попытка автоматизации этого метода [26]. В 2003 году Shea T.B. с сотрудниками [27] использует этот метод для изучения АОА в тканях мозга с тролоксом в качестве эквивалента (названа ТЕАС), что является продолжением измерений, использующих в качестве

основы метода окисление кроцина.

Определение антиокислительной активности по методу ТЕАС основано на оценке общего восстановительного эффекта индивидуальных низкомолекулярных антиоксидантов как гидрофильных, так и гидрофобных, и дает информацию о типах антиоксидантов и их концентрациях без точного качественного различия. Эти методы основаны изначально на мониторинге изменения окраски, отнесенной к стандартному соединению – Trolox.

Способ с окислением дезоксирибозы в системе, генерирующей радикалы, предложен Cyung S.K. с соавторами [28]. 2-деоксирибоза окисляется гидроксильными радикалами, образуемыми в реакции Фентона, и распадается до малонового диальдегида. АОА измеряется по оптической плотности при 532 нм.

Другой фотометрический способ основан на фотоколориметрии железотиацианатных комплексов [28]. По этому способу АОА измеряют по концентрации гидропероксидов по железотиацианатному методу по оптической плотности при 500 нм. При исследовании антиокислительной активности экстрактов чеснока [29] авторы использовали сочетание методов: окисления дезоксирибозы, железотиацианатный и так называемый метод DPPH.

Одним из способов оценки АОА [30] является колориметрия свободных радикалов, основанная на реакции DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил ($C_{18}H_{12}N_5O_6$), $M =$

394,33), растворенного в метаноле, с образцом антиоксиданта (АН) по схеме: $DPPH^* + AN \rightarrow DPPH-H + A^*$. В результате восстановления DPPH антиоксидантом снижается пурпурно-синяя окраска DPPH в метаноле, а реакция контролируется по изменению оптической плотности при 514 нм обычными методами спектрофотометрии.

Buijester M. с сотрудниками [31, 9] модифицировали способ определения АОА объединением стандартной фотометрической процедуры с методом оптотермического окна (optothermal window – OW) – недорогим, нетрадиционным детектором поглощения. Оптотермическое преобразование позволяет увеличить чувствительность определений на два порядка, увеличить линейный диапазон измерений в 16 раз по сравнению с традиционными способами спектрофотометрии. Важным преимуществом оптотермического способа измерения поглощения является также то, что возможна работа с опалесцирующими образцами. Принцип оптотермического окна вкратце заключается в следующем. Излучение с длиной волны 514 нм и мощностью 10 мВт, производимое аргоновым лазером, попадает на окно, представляющее собой сапфировый диск (Al_2O_3) толщиной 300 мкм, прозрачный для электромагнитного излучения длиной 514 нм. К верхней поверхности диска приклеена фторопластовая трубка – емкость для образца, а ко дну с обратной стороны – пьезоэлектрическое кольцо, генерирующее потенциал, возникаю-

щий при облучении раствора лазером. Определение антиокислительной активности соединений на модели окисления униламелярных (одномембранных) липосом кислородом воздуха (катализируемое ионами Fe^{2+}) [32].

Другие используемые методы: по восстановлению антиоксидантами железа: (ferric reducing/antioxidant power-FRAP) [33] – позволяют прямое определение низкомолекулярных антиоксидантов. При низких pH восстановление $Fe(III)$ -трипиридилтриазинового комплекса в $Fe(II)$ -комплекс сопровождается появлением интенсивной голубой окраски. Измерения основаны на способности антиоксидантов подавлять окислительный эффект реакционных частиц, генерируемых в реакционной смеси. Этот метод отличается простотой, быстротой и небольшими затратами при исполнении.

Общая АОА нескольких популярных овощей и китайских трав оценивалась авторами [35] с использованием системы ABTS/ H_2O_2 /пероксидаза хрена на планшетном сканере. При инкубировании ABTS - 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолино-6-сульфоновая кислота) - с пероксидазой и перекисью водорода образуется относительно стабильный катион-радикал $ABTS^+$, с максимумом поглощения 414 нм в спектре электромагнитного излучения. В присутствии антиоксидантов [36] обнаруживается период индукции перед появлением окраски. Низкомолекулярные антиоксиданты задерживают образование

окраски пропорционально своему количеству. Метод быстрый, но самый дорогой из всех выше рассмотренных.

Хемилюминесцентные методы

Хемилюминесцентное детектирование перокси-радикалов и сравнение антиокислительной активности фенольных соединений описано Aejmelaeus R [37]. В методе, являющемся одним из множества модификаций методов хемилюминесцентного определения антиокислительной активности, используется способность люминола давать свечение после взаимодействия со свободными радикалами. Свободные радикалы в системе генерируются постоянно в результате иницируемого теплом распада 2,2'-азобис-(2-амидинопропан) дигидрохлорида (AAPH). Авторы исследовали кинетику хемилюминесценции свободного и ингибированного бутилированным гидрокситолуолом (BHT, 2,6-ди-трет-бутил-п-крезол) и Тролоксом распада AAPH. Кинетика изменения интенсивности люминесценции в относительных единицах – RLU. Авторы сделали предположение о том, что разные влияния на хемилюминесценцию соединений одного класса (фенолы), вызваны, по-видимому, различной степенью ионизации молекул тролокса и BHT вследствие различной кислотности их ОН-групп. Эти выводы косвенно подтверждаются зависимостями подавления люминесценции от величины рН среды при одинаковых концентрациях антиоксидантов.

Математическое моделирова-

Альманах современной метрологии, 2015, №2

ние кинетики фотохемилюминесценции (ФХЛ) с участием рибофлавина в присутствии антиоксидантов – супероксиддисмутазы и аскорбиновой кислоты были проведены Магиным Д.В.[37]. Была использована специально разработанная компьютерная программа Kinetic Analyzer, при исследовании интенсивности фотохемилюминесценции в присутствии люцигенина. Проводилось также хемилюминесцентное определение антиоксидантов с люминолом в присутствии пероксидазы хрена [39].

Флуориметрические методы

Метод определения адсорбционной емкости по отношению к кислородным радикалам («Oxygen Radical Absorption Capacity»-ORAC) [40] является одним из наиболее применяемых в настоящее время. Он был первоначально разработан доктором Гоуа Као (Dr. Guohua Cao) в Национальном институте старения (США) в 1992 г. В 1996 г. Као совместно с Рональдом Прайером (R. Prior) создали полуавтоматический метод [40]. С тех пор автоматизированный метод интенсивно применялся при исследованиях антиоксидантов и окислительного стресса [42-44]. Метод основан на измерении интенсивности флуоресценции определенного соединения и ее изменении от времени протекания реакции. В присутствии соединений, связывающих кислородные радикалы, увеличивается время флуоресценции вследствие защитного действия антиокислителей. Количественное определение антиокислительной

активности осуществляется по площади между двумя кривыми – свободной реакции и с добавлением антиоксидантов.

Степень уменьшения флуоресценции есть мера степени деградации флуоресцирующего соединения под воздействием кислородных радикалов. Первоначально в качестве флуоресцирующего вещества применялся белок В-фикоэритрин. Однако оказалось, что он вступает в реакцию с фенольными соединениями, являющимися главными антиоксидантами растительного происхождения, что приводило к систематически заниженным результатам определения АОА, поэтому более стабильное, флуоресцирующее соединение – флуоресцеин. Метод, основанный на поглощении кислородных радикалов (ORAC), – относительно простой и чувствительный, но длительный по времени (около 95 мин на определение) и требует наличия флуоресцентного детектора. В этой системе 2,2'-азо-бис-(2-амидинопропан) дигидрохлорид (AAPH) используется в качестве источника перекисных радикалов.

Утверждается, что существует шесть наиболее вредных кислородных реакционноспособных частиц: пероксидные (ROO) и гидроксильный (HO) радикалы, супероксид-ион (O_2^-), синглетный кислород (1O_2), перекись водорода H_2O_2 и пероксинитрит (OONO-).

Метод ORAC измеряет только антиоксидительную активность против пероксидного и гидроксильного радикалов. Методом (ORAC) может

быть определена антиоксидительная активность как водорастворимых, так и жирорастворимых объектов, таких как пищевые продукты, напитки, химикаты, добавки, плазма и сыворотка крови, моча и т.д. Тем не менее анализ одного образца занимает более 1,5 ч. В качестве стандартных соединений применяются тролокс (определение пероксидов) и галловая кислота (определение гидроксил-радикалы). Соответственно, единицей измерения в методе ORAC является микроль стандарта на единицу массы или объема.

Метод Гуо и Янга [44] основан на определении антиоксидительной активности соединений по их способности связывать гидроксил-радикалы HO, которые, как полагают, являются наиболее реакционноспособными в физиологических условиях и ответственными за множество нежелательных в организме последствий, таких как онкогенез, атеросклероз и мутации ДНК. В модельной системе, предложенной авторами, генерация гидроксил-ионов протекает из кислорода при участии комплексов железа с этилендиаминтетрауксусной кислотой (EDTA).

Реакция такова, что наблюдается прямая и пропорциональная корреляция между количеством добавленного антиоксиданта и отношением интенсивностей флуоресценции в свободной системе и в присутствии антиоксиданта. Длина волны возбуждения составляла 326 нм, а испускания – 432 нм.

Электрохимические методы

Схема вольтамперометрического определения антиокислительной активности фенолкарбоновых кислот растительного происхождения на ДНК-модифицированном углеродном трафаретном электроде предложена Kinjo J и др. [67]. Схема основана на известном способе количественного определения нативной двунитевой ДНК с использованием комплекса $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ в качестве электрохимического маркера. Количество $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$, связанного со слоем ДНК, снижается по мере разрушения последней в результате реакции расщепления.

Использовался компьютеризованный вольтамперометрический анализатор ECA pol 110 (Istran, Словакия) с двухэлектродной системой (FACH, Словакия), включающей рабочий электрод поверхностью 25 мм² вместе с лорсеребряным электродом сравнения и отдельным платиновым электродом, использованным для дифференциальной пульсирующей вольтамперометрии. Измерения проводили в стеклянной вольтамперометрической ячейке (10 мл) при температуре 22°C. УФ-видимый спектрофотометр UV-1601 (Shimadzu, Япония) использовался для оптических измерений радикалов по методу DPPH. ВЭЖХ анализы выполняли на приборе HP 1100 (Hewlett-Packard, Германия). Комплексное соединение $[\text{Co}(\text{phen})_3](\text{ClO}_4)_3$ синтезировали согласно [24].

Вольтамперометрическое определение активности антиоксидантов на основе измерения вольтампе-

рометрической характеристики катодного восстановления кислорода в апротонных растворителях предложено авторами [25–26]. Определены коэффициенты активности для восьми антиоксидантов. Простой электрохимический способ определения антиокислительной активности флавоноидов, основанный на измерении потенциала полувольны окисления на проточном колоночном электроде, предложен авторами [27]. Сообщается, что электрохимическая активность соединений коррелирует со способностью подавлять перекисное окисление липидов. Антиокислительная емкость плазмы измерялась циклической вольтамперометрией [28] на приборе Potentiostat Galvanostat Model 273, EG & G (Princeton Applied Research, США). Была использована трехэлектродная система. В качестве рабочего электрода применялся дисковый стеклоуглеродный электрод (Laboratory Instruments, Чехия) диаметром 2 мм. Перед каждым определением электрод полировали. Платиновая проволока служила вспомогательным электродом, а насыщенный каломельный электрод являлся электродом сравнения. Метод подходит для контроля низкомолекулярных антиоксидантов в пищевых продуктах.

Методы, использующие биологические маркеры. Проведен анализ [52] восстанавливающей способности и количественной антиокислительной активности *in vitro* гидроксида кремния и семи коммерчески доступных водорастворимых антиокси-

дантов. Эксперимент включает определение окислительно-восстановительных потенциалов, рН и клеточную фотосенсибилизацию методом спектрофотометрии, что позволило объективно оценить антиокислительную эффективность соединений. Для оценки абсолютной восстановительной способности антиоксидантов было использовано модифицированное Кларком уравнение Нернста, связывающее парциальное давление водорода и восстановительный потенциал в единицах.

Окислительное повреждение ДНК радикалами [56], образующимися в реакции Фентона, с последующим анализом продуктов окисления использовано для оценки хемопротекторной и антиокислительной активности соединений. 250 мкг ДНК инкубируется в присутствии (500–600 мкМ) или без антиоксидантов в растворе диметилсульфоксида (<5%) в трис-буфере при 37°C в течение 15 мин. Затем добавляются реагенты Фентона (25 мкМ CuSO₄; 0,1–3 мМ H₂O₂; 100 мкМ NTA; 100 мкМ аскорбиновой кислоты), продуцирующие гидроксил-радикалы и смесь инкубируется еще 45 мин при той же температуре. После инкубации ДНК осаждается этанолом с хлористым натрием. ДНК, содержащая образованные 8-оксопроизводные гуанозина, радиоактивный P32, [56]. Антиокислительная активность кверцетина в лизосомальных фракциях печени мыши [57] исследовалась с использованием гидрофильного генератора радикалов 2,2'-азо-бис-(2-амидинопропан)-дигидрохло-

рида (AAPH) и гидрофобного генератора радикалов 2,2'-азо-бис-(2,4-диметилвалеронитрила) (AMVN). Ингибируемое кверцетином лизосомальное пероксиокисление липидов измерялось по методу TBARS с реакционными частицами тиобарбитуровой кислоты [68].

Необходимо отметить объективную невозможность существования не то что единого метода для оценки антиокислительной активности соединений, но даже возможности сравнения результатов, полученных разными методами. И связано это, очевидно, с многообразием протекающих в природе радикальных процессов. Одно дело, когда определяется антиокислительная активность соединения (или группы соединений), применяемого для стабилизации химических продуктов и полимеров, и совсем другое – влияние антиоксидантов на процессы, протекающие в живой клетке. В результате каждый исследователь выбирает готовый, создает новый или модифицирует уже известный метод, исходя из своих целей и возможностей. В анализе методов измерения АОА не рассматривались стандартизованные инструментальные способы (ВЭЖХ, ГЖХ) определения индивидуальных антиоксидантов, поскольку эти методы имеют частные приложения и едва ли применимы к задачам определения АОА сложных смесей и биологических объектов.

Как видно из приведенного выше, за прошедшее десятилетие предложен существенный ряд методов и модификаций методов

определения антиоксидантной активности, предложены новые реагенты, модельные системы и приборы. Для измерения антиоксидантной активности (АОА) используют разные химические и физико-химические методы. В основе методов чаще всего прямое или косвенное измерение скорости или полноты реакции, т.е. они основаны на следующих трех типах реакций:

потребления кислорода;
образования продуктов окисления;
поглощения (или связывания) свободных радикалов.

В первом и втором случаях АОА определяется на основе ингибирования скорости окисления или скорости потребления реактивов и образования продуктов.

Анализируя сложившуюся в области измерения АОА ситуацию, необходимо отметить, что методы измерения должны удовлетворять следующим общим требованиям:

1. Параметр должен обладать очевидным физическим смыслом, количественно определяющим АОА.

2. Воспроизводимость результатов определения количества АОА не только в рамках отдельной работы, но и в любой другой лаборатории.

3. Должны быть стандартные образцы для проведения операций по сличению результатов измерений.

4. Метод должен позволять осуществление непрерывного мониторинга с возможностью автоматизации процесса измерения.

5. Высокая производительность процесса, что особенно важно для рутинных определений.

6. Относительная простота используемых процедур.

В этой связи все методы определения АОА могут быть разделены на две группы: прямые методы, которыми определяется собственно АОА, и непрямые методы, которые используются для измерения параметров, лишь косвенно связанных с АОА. При прочих равных условиях прямые методы более предпочтительны. Непрямые методы могут быть признаны приемлемыми при условии, что результаты определения скоррелированы с результатами определения прямыми методами.

Прямые методы чаще всего основаны на изучении кинетики цепного окисления липидов или модельных углеводов. В большинстве работ АОА характеризуется либо периодом индукции ($t_{инд}$), либо концентрацией антиоксиданта (тестируемой композиции), которая снижает скорость (глубину) окисления на 50% (C50). В работе [23] показано, что как $t_{инд}$, так и C50, как правило, не воспроизводимы, если не приняты специальные меры. Прямые методы могут быть основаны на одном из двух режимах окисления, автоокисления и инициированного окисления. Режим инициированного окисления более предпочтителен, поскольку режим автоокисления в принципе не может дать воспроизводимых результатов. К прямым методам определения АОА относится также группа методов, основанных

на конкуренции тестируемого и стандартного антиоксидантов.

Среди непрямых методов наиболее популярны методы, основанные на реакции тестируемого образца со стабильными радикалами (ДФПГ, катион-радикалы ABTS, соль Fremy), на восстановлении $Fe^{(3+)}$, а также на хемилюминесценции люминола. Следует упомянуть также ряд методов, которые не используются непосредственно для определения АОА, но могут быть полезными для оценки АОА сложных композиций: HPLC, определение «общих фенолов» методом Folin-Ciocalteu, ряд электрохимических методов (циклическая вольтамперометрия, полярография и другие).

Основные методы:

ORAC - oxygen radical absorbance capacity; [69].

TRAP - total radical trapping antioxidant parameter; [70].

FRAP не прямой - ferric reducing antioxidant power; [71].

TEAC -[Randox] -trolox equivalent antioxidant capacity; [72].

ABTS не прямой -2,2 - azinobis (3-ethylbenzthiazoline) -6-sulfonic acid; [76].

TBARS - thiobarbituric acid reactive substance; [77].

В этих методах измерения, АОА – функция многих параметров, в частности времени, температуры, природы вещества, концентрации антиоксиданта и других соединений и др., вследствие чего данные, полученные с использованием одних методов, не коррелируют с данными,

полученными с использованием других методов. Среди электрохимических методов и устройств следует выделить вольтамперометрический (режим постоянно-токовой вольтамперометрии или катодной вольтамперометрии) с ртутнопленочным рабочим электродом, реализованный в вольтамперометрическом анализаторе ТА-2 («Техномет», Томск). Под руководством Х.З. Брайниной разработан малогабаритный антиоксидантный тестер с пределом обнаружения 10-6М антиоксиданта [79]. В США для оценки антиоксидантной активности плазмы крови с диагностическими целями разработан тестер Electro-Ox [80], также на электрохимическом принципе. В работе [62] предложен метод одновременного определения общего полифенольного индекса и общего антоцианового индекса с использованием инжекционно-проточной установки и спектрофотометрическим детектированием на двух длинах волн 280 и 520 нм. Аппаратура для жидкостной хроматографии использована для определения антиоксидантов с двумя детекторами: со спектрофотометрическим на диодной матрице и хемилюминесцентным [63]. Определение антиоксидантной активности фенольных соединений (оксикислот, флавоноидов, токоферолов) методом ВЭЖХ с кулонометрическим детектором приведены в работе [83], авторами показано, что чем меньше потенциал окисления фенольных соединений, тем больше его антиоксидантная активность.

1.4 Свободнорадикальные реакции основной механизм регуляции гомеостаза

В ходе эволюции у живых организмов выработались защитные механизмы [85-88], контролирующие протекание свободнорадикальных реакций. Любой организм - будь то растение, животное или отдельная клетка - можно рассматривать как образец работы сбалансированной и отлаженной антиоксидантной системы [86-89]. Подчеркиваем, именно системы, состоящей из многих компонентов - это и витамины (С, Е, Р), и ферменты (глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза), и микроэлементы (селен, цинк), полифенольные соединения (флавоноиды), и серосодержащие аминокислоты (цистеин, метионин), а также трипептид глутатион. Мы перечислили только некоторые соединения, обладающие антиоксидантным действием. Химическая природа этих соединений разнообразна, среди них есть как водорастворимые, так и жирорастворимые компоненты. Основным принципом, на котором строится действие антиоксидантной системы живого организма, - это синергизм. Он заключается в том, что компоненты системы работают сообща, восстанавливая друг друга и усиливая эффективность действия. В настоящее время установлены закономерности активации и ингибирования антиоксидантных и ДНК-репарационных систем клеток растений, их роль в изменениях устойчивости в продуктивности организмов в зависимости от химической

природы и концентрации экзогенных токсикантов - катионов свинца, фенола и его пара-производных (п-амино-, п-нитро- и п-хлорфенола), а также изменений активности антиоксидантных защитных систем безъядерных клеток эритроцитов в ответ на повышение концентрации активных форм кислорода. Выявлены закономерности изменения функциональной активности и устойчивости генома организмов растений в ответ на действие химических раздражителей: катионов свинца, фенола и его парапроизводных, нитрат и нитрит-ионов, а также низкофонового ионизирующего излучений и температурного фактора. Суммируя все вышесказанное, нетрудно прийти к выводу, что любое изменение факторов внешней среды на живой организм моментально опосредуется его сигнальными системами, что в свою очередь включает запуск механизма регуляции свободнорадикальных реакций, направленных на установление нового равновесного состояния, организма и среды. В случае, когда воздействие факторов не превышает норму реакции организма, изменения затрагивают только физиолого-биохимические и фенотипические параметры. Превышение факторами внешней среды нормы реакции организма приводит к изменению наследственной информации, а именно к рекомбинации, поли- и анеуплоидии, мутации и т.д. Изменения генотипа и фенотипа как следствие ведет к изменению свободнорадикальных реакций регуляции гомеостаза. Изме-

нения свободнорадикальных реакций регуляции гомеостаза в свою очередь приводит к изменению баланса «свободные радикалы – антиоксиданты». Следовательно, измеряя количество антиоксидантов в «субоптимальном и стрессе» можно судить о генотипических характеристиках организма.

Принимая во внимание тот факт, что трансгенное растение это растение с измененной генетической структурой, легко можно прийти к выводу, что это - растение с измененным по отношению к «дикому» типу метаболизмом.

Изменение генотипа приводит к изменению свободнорадикальной реакции регуляции гомеостаза, что в свою очередь приводит к изменению баланса «свободные радикалы – антиоксиданты».

Измерив содержание антиоксидантов в стрессе и норме, мы сможем определить или, другими словами, - генотипировать организм, т. е., идентифицировать вид, сорт, генетическую модификацию организма.

Экспериментальная часть

В качестве материала был использован картофель сорт Чугунка1, содержащий большое количество флавоноидов, являющихся антиокислителями и экстрагирующиеся водно-спиртовыми растворами. Кроме того, были исследованы некоторые сорта картофеля, районированные в России, которые предоставил Институт картофелеводства им. Лорха. Список сортов представлен в табл. № 1.

Таблица 1

Сорта и гибриды

	Селек. номер	Происхождение	Окраска		Цвет мякоти
			клубня	глазка	
1	1356-3	Кардинал х Конкорд	с/жёлтая	белая	с/жёлтая
2		Кардинал	красная	красная	с/жёлтая
3		Конкорд	с/жёлтая	белая	жёлтая
4	1313-103	Удача х Рокко	розовая	розовая	кремовая
5		Удача	белая	белая	кремовая
6		Рокко	красная	красная	кремовая
7	1385-1	Накра х Нида	розовая	розовая	жёлтая
8		Накра	красная	красная	с/жёлтая
9		Нида	с/жёлтая	белая	с/жёлтая
10	1396-1	Удача х Шурминский-	с/розовая	розовая	кремовая
11		Шурминский-2	с/жёлтая	белая	с/жёлтая

Методики: определение массовой концентрации водорастворимых антиоксидантов проводили по ГОСТ Р 54036-2010 «Продукты пищевые. Определение содержания водорастворимых антиоксидантов в клубнях картофеля амперометрическим методом»

Отбор проб выполняли по ГОСТ 51808 Картофель свежий продовольственный, реализуемый в розничной торговой сети. Технические условия.

Подготовка проб. В эксперименты отбирали ровные клубни, средней величины. От каждого сорта по 10 шт., при посемейном анализе использовали все стандартные клубни семьи.

Клубни тщательно отмывали от пыли и остатков почвы, ополаскивали дистиллятом и высушивали при комнатной температуре. Каждому клубню присваивали двухзначный номер: первая цифра – номер сорта, 2 – номер клубня.

Из отобранных клубней производили отбор навесок массой в 1 грамм.

Отобранные навески измельчали и гомогенизировали в 20 % этиловом спирте в соотношении 1: 10.

Гомогенат центрифугировали при трех тысячах оборотах в течение 15 минут, надосадочную жидкость сливали и разводили элюентом в соотношении 1:10.

Проба готова для анализа, (из полученного объема готовили необходимое количество параллельных проб).

Анализ гетерогенности тканей клубня картофеля по содержанию водорастворимых антиоксидантов. Клубни характерны для немногих растений. Подземные побеги, на верхушках которых развиваются клубни, отрастают от оснований надземных стеблей; эти побеги называются столонами. Клубни – это верхушечные утолщения столонов. Клубень имеет короткие междоузлия; хлорофилла он не содержит, но, выставленный на свет, может зеленеть. На его поверхности в углублениях по 2-3 расположены почки, или глазки. Глазков больше на той части клубня, которую называют верхушкой. Противоположной стороной – основанием – клубень соединен со столоном.

За внешней гомогенностью клубня скрывается довольно разнообразная морфологическая и анатомическая структура. Стандартный клубень состоит из верхушки и основания. Клубень покрыт первичной и вторичной покровными тканями, в углублениях расположены глазки – чечевички, причем на верхушке клубня их гораздо больше.

Основная масса клубня состоит из внутренней флоэмы, сердцевинной или центральной зоны. На тонком поперечном срезе клубня четко различимы слои: - кора, - древесина, - сердцевина. Рост клубня в толщину происходит за счет роста клеток камбия.

Анатомо-морфологическим разнообразием тканей клубня обусловлены их функции, а значит, и физиолого-биохимические характеристики, в

связи с чем необходимо было выявить часть клубня, наиболее репрезентативную по общему содержанию антиоксидантов.

Клубни для анализа готовились по ранее приведенной методике.

Результаты анализа суммарного содержания антиоксидантов представлены в табл. 2.

Таблица 2

Уровень АОА различных тканей клубня с. Кардинал

Наименование/№,	АОА в мг/кг									
	1/1	1/2	1/3	1/4	1/5	1/6	1/7	1/8	1/9	1/10
Кожура уч.1	280	255	260	290	300	350	215	320	415	220
Кожура уч.2	210	271	300	287	270	335	317	250	288	305
Кожура уч.3	305	222	320	300	229	301	232	305	237	324
Кожура уч.4	400	342	297	321	402	325	349	370	279	292
Чечевички	510	498	470	403	450	503	410	390	415	310
Сердцевина	343	338	3339	341	340	339	340	344	340	340

Данные, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что антиоксидантная активность различных частей одного клубня, одного сорта различна. Так, антиоксидантная активность кожуры различных участков клубня одного сорта достоверно отличается, необходимо отметить аналогичные отличия наблюдаются между одинаковыми участками разных клубней одного сорта, что, по-видимому, можно объяснить влиянием на метаболические процессы клубней различных условий хранения, в частности температуры, влажности, освещенности. Как видно из данных, представленных в табл. 3, различия в уровне антиоксидантной активности сердце-

винной паренхимы различных клубней одного сорта не превышает уровень достоверности в 5%. На основании вышеизложенного можно сделать следующие выводы:

1. Исследованные сорта картофеля достоверно различаются по антиоксидантной активности различных частей покровных тканей, взятых с разных участков одного клубня.

2. Отсутствуют достоверные отличия антиоксидантной активности сердцевиной паренхимы различных клубней одного сорта.

3. Высока активность чечевичек и тканей прилегающей к ним паренхимы, что, очевидно, обусловле-

но морфофизиологическими особенностями покоящихся точек роста.

4. Пробы картофеля на определение содержания необходимо отбирать из сердцевинной паренхимы клубня.

Анализ содержания антиоксидантов у различных сортов картофеля. На данном этапе исследова-

ния было проведено изучение массовой концентрации водорастворимых антиоксидантов в различных сортах картофеля. Полученные данные представлены в табл. 3. Как видно из табл. 3, проведенные исследования позволили обнаружить сортовые различия в содержании антиоксидантов.

Таблица 3

Характеристика сортов объединенная

№п/	Название сорта	Окраска			S м.а	АОА
		клубня	глазка	мякоти		
	1	2	3	4	5	6
1	Агніка	с/жёлтая	белая	жёлтая	1300	4.750
2	Ароза	красная	белая	с/жёлтая	985	3.175
3	Астерикс	красная	красная	жёлтая	932	2.900
4	Атлант	с/жёлтая	белая	жёлтая	1091	3.700
5	Аусония	с/жёлтая	белая	с/жёлтая	1431	5.400
6	Барака	с/жёлтая	белая	жёлтая	1310	4.800
7	Баритон	розовая	красная	кремовая	1258	4.550
8	Бронницкий	с/жёлтая	белая	с/жёлтая	1046	3.500
9	Жеран	красная	красная	кремовая	915	2.820
10	Журавинка	красная	красная	жёлтая	981	3.120
11	Загадка Питера	розовая	красная	кремовая	1008	3.280
12	Зарафшан	с/розовая	розовая	жёлтая	-----	-----
13	Зарево	красная	красная	кремовая	1463	5.570
14	Калорит	с/жёлтая	белая	жёлтая	1302	4.750
15	Кардинал	красная	красная	с/жёлтая	883	2.650
16	Конкорд	с/жёлтая	белая	жёлтая	952	3.000
17	Криница	белая	белая	кремовая	1238	4.400
18	Купалинка	красная	красная	с/жёлтая	1004	3.250
19	Лыковский	белая	белая	кремовая	1048	3.500
20	Накра	красная	красная	с/жёлтая	773	2.125
21	Невский	с/жёлтая	белая	кремовая	1764	7.075
22	Нида	с/жёлтая	белая	с/жёлтая	1539	5.950

Продолжение таблицы 3

23	Никулинский	белая	белая	кремовая	1652	6.500
24	Пикассо	с/жёлтая	красная	с/жёлтая	1516	5.820
25	Раја	красная	красная	жёлтая	841	2.450
26	Рокко	красная	красная	кремовая	1056	3.500
27	Рубин	красная	красная	жёлтая	3051	13.500
28	Светлячок	красная	красная	кремовая	2601	11.250
29	Свитанок киевский	розовая	красная	с/жёлтая	1647	6.500
30	Скарлетт	красная	красная	жёлтая	1086	3.680
31	Снегирь	красная	красная	кремовая	1581	6.150
32	Тетерев	красная	красная	кремовая	866	2.570
33	Тирас	розовая	красная	кремовая	1004	3.250
34	Удача	белая	белая	кремовая	1815	7.320
35	Украинский розовый	розовая	красная	жёлтая	1976	8.150
36	Холмогорский	с/розовая	красная	жёлтая	932	2.900
37	Чифтейн	красная	красная	с/жёлтая	1786	7.075
38	угунка	фиолетовая	фиолетовая	Фиолетовая	2930	13.150
39	Чугунка-2	фиолетовая	фиолетовая	Кремовая	809	2.300
40	Шурминский-2	с/жёлтая	белая	с/жёлтая	1621	6.350
41	Ягодка	розовая	красная	кремовая	1827	7.370
42	81.14/61	белая	белая	кремовая	1025	3.370
43	89.58/1	фиолетовая	фиолетовая	кремовая	2074	8.620
44	90.30/3	красная	красная	кремовая	1410	5.300
45	128-6	с/жёлтая	белая	кремовая	1229	4.400
46	807-11	красная	красная	жёлтая	542	1.000
47	Зарница				670	1.600
48	Кондор				551	1.000

ГИБРИДЫ

	1	2	3		4	5	6
51	1276-22	Весна х Баракат	красная	красная	Жёлтая	1650	6.500
52	1293-3	Кардиналх Лыковский	белая	белая	кремовая	2250	9.500
53	1310-4	Гранола х Пикассо	с/жёлтая,	красная	кремовая	3463	15.500
54	1313-103	Удача х Романо	розовая	розовая	кремовая	1184	4.150

Продолжение таблицы 3

55	1327-1	Ли́ра х Ра́ја	белая	белая	кремовая	1534	5.950
56	1332-12	Сви́танок киев. х Ау́сония	красная	красная	жёлтая	1682	6.600
57	1332-13	Сви́танок киев. х Ау́сония	с/жёлтая	белая	с/жёлтая	3168	14.100
58	1334-1	Жуков ран. х Конкорд	с/жёлтая	белая	жёлтая	1037	3.400
59	1336-10 1	Ли́ра х Ни́да	с/жёлтая	белая	жёлтая	2251	9.500
60	1338-13	90.30/3 х Ни́да	красная	красная	кремовая	397 ?	0.250
61	1341-7	128-6 х Пика́ссо	с/жёлтая	белая	с/жёлтая	1998	8.250
62	1356-3	Кардина́л х Конкорд	с/жёлтая	белая	с/жёлтая	1093	3.750
63	1360-1	Чи́фтейн х Ни́да	красная	красная	жёлтая	1429	5.270
64	1370-33	Ли́ра х Ау́сония	белая	белая	кремовая	1771	6.850
65	1381-5	81.14/61 х Кардина́л	с/жёлтая	белая	жёлтая	2175	9.125
66	1385-1	Накра х Ни́да	розовая	розовая	жёлтая	1176	4.125
67	1387-4	90.30/3 х Ни́да	красная	красная	кремовая	1330	4.875
68	1387-5	-П-	красная	красная	кремовая	1283	4.650
69	1387-8	-П-	язовая	красная	кремовая	3142	13.900
70	1387-9	-П-	красная	красная	кремовая	894	2.750
71	1387-11	-П-	красная	красная	жёлтая	1196	4.250
72	1390-1	Сви́танок кие х Рома́но	белая	белая	кремовая	706	1.750
73	1396-1	Уда́ча х Шу́рминский-2	с/розовая	розовая	кремовая	3335	16.000
74	1400-20	Никули́нский х Черниговский	с/жёлтая	белая	с/жёлтая	2932	12.900
75	1401-7	81.14/61 х Черниговский	с/жёлтая	белая	с/жёлтая	-----	-----
76	1404-2	Агми́ках 807-11	с/жёлтая	белая	с/жёлтая	1098	3.750

Продолжение таблицы 3

77	1406-5	81.14/61x807-11	с/жёлтая	розовая	кремовая	1002	3.250
78	20ЯБ	88.16/20 х	красная	красная	кремовая	2532	10.900
79	014А-14	Ceres х Барака	с/жёлтая	красная	с/жёлтая	1581	6.150
80	014-23	-П-	красная	красная	белая	1615	6.300
81	014Л-23	-П-	с/жёлтая	красная	кремовая	1866	7.600
82	1Л-6	Атланта х Гитте	белая	белая	кремовая	2033	8.400

Анализ содержания антиоксидантов у гибридов и родительских пар. На данном этапе исследования было проведено изучение массовой концентрации водорастворимых антиоксидантов в сортах и гибридах картофеля. Анализ данных, представленные в табл. №4, показал, что для каждого сорта характерно

своё специфичное содержание антиоксидантов, гибриды наследуют данный признак по-разному, что обусловлено различным состоянием аллелей родительских пар, а в результате различными фенотипами, что и отражается физико-химическими характеристиками клубней в данном случае АОА.

Таблица 4

Содержания антиоксидантов у гибридов и родительских пар

	Селек. номер	Происхождение	Окраска		Цвет	АОА	СКО
			клубня	глазка			
1	1356-3	Кардинал х Конкорд	с/жёлтая	белая	с/жёлтая	340	0.37
2	мать	Кардинал	красная	красная	с/жёлтая	280	0.52
3	отец	Конкорд	с/жёлтая	белая	жёлтая	240	0.43
4	1313-103	Удача х Рокко	розовая	розовая	кремовая	332	0.74
5	мать	Удача	белая	белая	кремовая	600	0.56
6	отец	Рокко	красная	красная	кремовая	280	0.36
7	1385-1	Накра х Нида	розовая	розовая	жёлтая	300	0.26
8	мать	Накра	красная	красная	с/жёлтая	250	0.37
9	отец	Нида	с/жёлтая	белая	с/жёлтая	480	0.37
10	1396-1	Удача х Шурминский-2	с/розовая	розовая	кремовая	960	0.32
11	отец	Шурминский-2	с/жёлтая	белая	с/жёлтая	580	0.39

Выводы

1. Амперометрический метод может быть применен для определения суммарной антиоксидантной

активности в продуктах биотехнологий.

2. Амперометрический метод не может быть использован при селективной оценке определенного

антиоксиданта в суммарной пробе антиоксидантов.

3. Амперометрический метод может быть использован для определения генотипический различий микроклубней биотехнологического картофеля по их сортовой принадлежности, так как массовая концентрация антиоксидантов специфична для каждого сорта.

4. Предлагаемый метод измерения позволяет с высокой степенью достоверности различать сорта и гибриды картофеля, а также продукты, полученные биотехнологическим путем, а именно микроклубни картофеля, полученные *in vitro*.

5. Предлагаемый метод измерения может быть использован для проведения диагностики продуктов биотехнологии картофеля с целью сортовой идентификации.

6. Предлагаемый метод может быть использован для отбора сортов картофеля с высоким АОО.

7. Предлагаемый метод может быть использован для оценки состояния картофеля (сохранность, болезни и т.д.) и его пищевой ценности в период длительного хранения и возможности использования в пищу.

8. Массовая концентрация антиоксидантов коррелирует с устойчивостью картофеля к биотическим и абиотическим факторам.

Литература

1. Эмануэль Н.М. в кн. «Фенольные соединения и их биологические функции», М., 1967, 311 с.

2. Эмануэль Н.М.// Известия АН СССР, сер. Биол., 1974, 773 с.

3. Свободные радикалы в биологии. Часть 1. Под редакцией акад. Н.М.Эмануэля. М.: Мир, 1979, 308 с.

4. Дюмаев К.М., Воронина Т.А., Смирнов Л.Д. Антиоксиданты в профилактике и терапии патологий ЦНС. Изд-во биомедицинской химии РАМН, 1995, 271 с.

5. Зозуля Ю.А., Борабой В.А., Сутковой Д.А. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная защита при патологии головного мозга. М.: «Знание-М», 2000, 344 с.

6. Acworth I.N., Boiley B. The handbook of oxidative metabolism, ESA Inc., 1995.

7. Flohe I., Beckman R. In: Oxidative stress academic press, London, 1985, p.403.

8. Free radicals in molecular biology, aging and disease, D.Armstrong (Ed) Raven Press, New York, 1984.

9. Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты// Усп. Химии, 1985, т.15, №2 с. 137-167.

10. Hansley K. Определение окислительного стресса ВЭЖХ с электрохимическим детектором. J. High Resolut. Chromat. 1999, v 22, p 429-437.

11. Govanni A. e.a., J. Neurochemistry, 1995, v.64, p. 1819-1825.

12. Schulz J e.a. J. Neurochem. 1995, v. 64, p.936-939.

13. Храпова Н.Г. Жидкофазное окисление органических веществ и ингибиторов свободнорадикальных реакций. Научно-практический семинар. Сб. докл., М., 2004.

14. Болдырев А.А., Куклей М.Л. Свободные радикалы в нормальном и ишемическом мозге// *Нейрохимия*, 1996, т. 13, №4, с. 271-278.
15. Бурлакова Е.Б. Молекулярные аспекты действия антиоксидантов при лечении сердечно-сосудистых заболеваний// *Кардиология*, 1980, №8 с. 48-51.
16. Бурлакова Е.Б. Биоантиоксидант. Тез. докл. IV конф.: М., 1993 с. 1-5.
17. Бурлакова Е.Б. Биоантиоксиданты вчера, сегодня, завтра. Биоантиоксидантдез. Докл. 5 Междунар. конф., Москва. 1998, с. 1-2.
18. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972, 252 с.
19. Гаврилов Б.Б., Мишкорудная М.И. Содержание ациегидроперекисей в плазме крови// *Лаб. дело*, 1983, №3. с. 33-35.
20. Голощанов А.Н., Кислова И.В., Бурлакова Е.Б. Влияние сверхмалых доз антиоксидантов на состояние биологических мембран. Биоантиоксидант: Тез. докл. 5. Междун. конф., Москва, 1998, с. 205.
21. Григлевски Р.Е. Участие свободных радикалов в преобразованиях эндотелиального простаглицлина и окиси азота// *Новости фармации и медицины*, 1997, №1-2, с. 2-7.
22. Дубинина Е.Е. Активные формы кислорода и их роль в развитии оксидативного стресса. // *Фундаментальные и прикладные аспекты современной биохимии. Труды Науч. конф.*, Санкт-Петербург, 1998, *Альманах современной метрологии*, 2015, №2 т. 2, с. 386-398.
23. Wayner D.D., Burton G.W., Ingold K.U., Locke S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins // *FEBS Letters*. 1985, v. 187, p. 33-37.
24. Tubaro F., Ghiselli A., Rapuzzi P., Maiorino M., Ursini F.: Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics // *Free Radicals in Biology and Medicine*, 1998, v. 24, p. 1228-1234.
25. Lussignoli S., Fraccaroli M., Andrioli G., Brocco G., Bellavite P. A microplate-based colorimetric assay of the total peroxy radical trapping capability of human plasma // *Analytical Biochemistry*, 1999, № 269, p. 38-44.
26. Kampa M., Nistikaki A., Tsaousis V., Maliaraki N., Notas G., Castanas E. A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay // *BMC Clinical Pathology*, 2002, v. 2.
27. Shea T.B., Rogers E., Ashline D., Ortiz D., Sheu M.-S. Quantification of antioxidant activity in brain tissue homogenates using the 'total equivalent antioxidant capacity' // *Journal of Neuroscience Methods*, 2003, v. 125, p. 55-64.
28. Chung S.-K., Osawa T. Hydroxy radical scavengers from white mustard (*Sinapis alba*) // *Food Science and Biotechnology*, 1998, v. 7, №4, p. 209-213.

29. Kim M.-Y., Choi S.-W., Chung S.-K. Antioxidative Flavonoids from the Garlic (*Allium sativum* L.) Shoot // *Food Science and Biotechnology*, 2000, v. 9, №4, p. 199–203. 308.
30. Blois M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical // *Nature*, 1958. v. 26, p. 1198–1200.
31. Buijnsters M., Bicanic D., Mihai Chirtoc M., Nicoli M.C., Min-Kuo Y. Evaluation of Antioxidative Activity of Some Antioxidants by Means of a Combined Optothermal Window and a DPPH* Free Radical Colorimetry // *Analytical Sciences (Japan)*. Special Issue, 2001, v. 17, p. 544–546.
32. Alvik A.C., Lovaas E. A high throughput assay for screening of antioxidants. Institute of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Tromso, Norway. 2001.
33. Benzie I.F., Strain J.J.: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: the FRAP assay // *Analytical Biochemistry*, 1996, v. 239, p. 70–76.
34. Chen I.C., Chang H.C., Yang H.W., Chen G.L. Evaluation of Total Antioxidant Activity of Several Popular Vegetables and Chinese Herbs: A Fast Approach with ABTS/H₂O₂/HRP System in Microplates // *Journal of Food and Drug Analysis*, 2004, v. 12, №1, p. 29–33.
35. Arnao M. B., Cano A., Hernandez-Ruiz J., Garcia-Canovas F., Acosta M. Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase: a new approach for determining total antioxidant status of foods // *Analytical Biochemistry*, 1996, v. 236, p. 255–261.
36. Krasovska A., Rosiak D., Czkapiak K., Lukaszewicz M. Chemiluminescence detection of peroxy radicals and comparison of antioxidant activity of phenolic compounds // *Current topics in Biophysics*, 2000, v. 24, p. 89–95.
37. Магин Д.В., Измайлов Д.Ю., Попов И.Н., Левин Г., Владимиров Ю.А. Фотохемилюминесценция как метод изучения антиоксидантной активности в биологических системах. Математическое моделирование // *Вопросы медицинской химии*, 2000, т. 4, с. 65–68.
38. Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V.M., Azzolini A., Forseka M.J. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method // *AAPS Pharm Sci*, 2003, v. 5(2), DOI: 10.1208/ps050220.
39. Cao G. H., Alessio H. M., Cutler R. G. Oxygen Radical Absorbency Capacity Assay for Antioxidants // *Free Radicals In Biology And Medicine*, 1993, v. 3, №14, p. 303–311.
40. Cao G., Verdon C.P., Wu A.H.B., Wang H., Prior R.L. Automated-Assay of Oxygen Radical Absorbency Capacity with the Cobas Fara-Ii // *Clinical Chemistry*, 1995, v. 41. p. 1738–1744.
41. Ehlenfeldt M.K., Prior R.L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry // *Journal of Ag-*

- ricultural and Food Chemistry, 2001, v. 49, p. 2222–2227.
- 42 Cao G., Sanchez-Moreno C., Prior R.L. Procyanidins, anthocyanins and antioxidant capacity in wines // *Food Journal*, 2000, v. 14, p. A564–A564.
- 43 Cao G.H., Shukitt-Hale B., Bickford P.C., Joseph J.A., McEwen J., Prior R.L. Hyperoxia-induced changes in antioxidant capacity and the effect of dietary antioxidants // *Journal of Applied Physiology*, 1999, v. 86, p. 1817–1822.
44. Yang X.F., Guo X.Q. Fe(II)-EDTA Chelate-Induced Aromatic Hydroxylation of Terephthalate as a New Method for the Evaluation of Hydroxyl Radical-Scavenging Ability// *The Analyst*, 2001, №126, p. 928-932.
45. Labuda J., Bučková M., Heilerová L., Čaniová-Žiaková A., Brandšteterová E., Mattusch J., Wennrich R. Detection of Antioxidative Activity of Plant Extracts at the DNA-Modified Screen-Printed Electrode// *Sensors*, 2002, v. 2, p. 1-10.
46. Korbut O., Bučkova M., Tarapčik P., Labuda J., Gründler P.// *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2001, v. 506, p. 143.
47. Короткова Е.И. Новый способ определения активности антиоксидантов// *Журнал физической химии*, 2000, т. 74, №9, с. 1544-1546.
48. Korotkova E.I., Karbainov Y.A., Shevchuk A.V. Study of antioxidant properties by voltammetry// *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2002, v. 518, №1, p. 56-60.
49. Yang B., Kotani A., Arai K., Kusu F. Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials// *Analytical Sciences (Japan)*, 2001, v. 17, p. 599-604.
50. Psotová J., Zahálková J., Hrbáč J., Šimánek V., Bartek J. Determination of total antioxidant capacity in plasma by cyclic voltammetry. Two case reports// *Biomedical Papers*, 2001, v. 145, №2, p. 81-83.
51. Stephanson C.J., Stephanson A.M., Flanagan G.P. Antioxidant capability and efficacy of Mega-H silica hydride and antioxidant dietary supplement, by in vitro cellular analysis using photosensitization and fluorescence detection// *Journal of Medicinal Food*, 2002, №5, p. 9-16.
52. Hayes A.W. (ed.) *Principles and Methods of Toxicology*. Raven Press, 1994.
53. Hodder P.S., Beeson C., Ruzicka J. Equilibrium and Kinetic Measurements of Muscarinic Receptor Antagonism on Living Cells Using Bead Injection Spectroscopy// *Analytical Chemistry*, 2000, v. 72, p. 3109-3115.
54. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples// *Drug Metabolism Reviews*, 2000, v. 32, №3-4, p. 307-326.
55. Srinivasan P., Vadhanam M.V., Arif J.M., Gupta R.C. A rapid screening assay for antioxidant potential of natural and synthetic agents in vitro// *International Journal of Oncology*, 2002, v. 20, p. 983-986.
56. Devaboyina U., Gupta R.C. Sensitive detection of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in DNA by ³²P-postlabeling assay and the basal levels

- in rat tissues// *Carcinogenesis*. 1996, v. 17, p. 917-924.
57. Nakagawa K., Kawagoe M., Yoshimura M., Arata H., Minamikawa T., Nakamura M., Matsumoto A. Differential Effects of Flavonoid Quercetin on Oxidative Damages Induced by Hydrophilic and lipophilic Radical Generators in Hepatic Lysosomal Fraction of Mice// *Journal of Health Science*, 2000, v. 46, №6, p. 509-512.
58. Aejmelaes R., Ketela T.M., Pirttila T., Hervonen A., Alho H. Unidentified antioxidant defenses of human plasma in immobilized patients: a possible relation to basic metabolic rate// *Free Radicals Research*, 1997, v. 26, p. 335-341.
59. Ghiselli A., Serafini M., Miani G., Azzini E., Ferro-Luzzi A. A fluorescence- based method for measuring total plasma antioxidant capability// *Free Radicals In Biology and Medicine*, 1995, v. 18, p. 29-36.
60. Delange R.J., Glazer A.N. Phycoerythrin fluorescence-based assay for peroxy radicals: a screen for biologically relevant protective agents//*Analytical Biochemistry*, 1989, v. 177, p. 300-306.
61. Glazer A.N. Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species//*Methods of Enzymology*, 1990, v. 186, p. 161-168.
62. Abella A., Messaoudi C., Laurent D., Marot D., Chalas J., Breux J., Claise C., Lindenbaum A. A method for simultaneous determination of plasma and erythrocyte antioxidant status. Evaluation of the antioxidant activity of vitamin E in healthy volunteers// *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1996, v. 42, p. 737-741.
63. Benzie I.F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: the FRAP assay// *Analytical Biochemistry*, 1996, v. 239, p. 70-76.
64. Dasgupta A., Malhotra D., Levy H., Marcadis D., Blackwell W., Jonston D. Decreased total antioxidant capacity but normal lipid hydroperoxide concentrations in sera of critically ill patients// *Life Sciences*, 1997, v. 60, p. 335-340.
65. Dasgupta A., Zdunek T. In vitro lipid peroxidation of human serum catalyzed by cupric ion: antioxidant rather than prooxidant role of ascorbate// *Life Sciences*, 1992, v. 50, p. 875-882.
66. Dat J.F., Foyer C.H., Scott I.M. Changes in Salicylic Acid and Antioxidants during Induced Thermotolerance in Mustard Seedlings // *Plant Physiology*, 1998, v. 118, p. 1455–1461.
67. Kinjo J., Nagao T., Tanaka T., Nonaka G., Okawa M., Nohara T., Okabe H. Activity-Guided Fractionation of Green Tea Extract with Antiproliferative Activity against Human Stomach Cancer Cells// *Biol.Pharm.Bull. (Pharmaceutical Society of Japan)*. 2002, v. 25, №9, p. 1238-1240.
68. Balthazary S.T., Sallman H.-P., Fuhrmann H. The determination of TBA-Reactive substances and alkenals in the presence of antioxidants// *Acta Veterinaria Hungarica*, 2000, v. 47, №2, p. 155-159.

69. Giovanni A. e.a// J. Neurochemistry, 1995, v. 64, p. 1819-1825.
70. Schulz J. e.a// Neurochem, 1995, v. 64, p. 936-939.
71. Madhavi D.L. e.a// Food antioxidants: technological, toxicological and health perspective, Marcel Dekker, New York, 1996.
72. Ding M., Yang H. et al. (Rapid, direct determination of polyphenols in tea by reversed-phase column liquid chromatograph// J Chromatogr, 1999, A 849(2): p 637-640.
73. Re R., Pellegrini N. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, 1999, Free Radic Biol Med 26(9-10), p. 1231-1237.
74. ÓGara C. et al.// A sensitive electrochemical method for quantitative hydroperoxide determination.
75. Короткова Е.И., Корбаинов Ю.А., Аврамчик О.А. Новый вольт-амперометрический способ определения активности антиоксидантов. Тезисы докладов VI Международной конференции «Биоантиоксидант», Москва, 16-19 апреля 2002 г., с. 298-299.
76. Gonzalez-Rodriguez J., Perez-Juan P., Luque de Castro M.D. Method for the simultaneous determination of total polyphenol and anthocyan indexes in red wines using a flow injection approach Talanta, 2002, v. 56, p. 53-59.
77. Dapkevicius A., Van Beek T.A., Niederlander H.A.G. Evaluation and, comparison of two improved techniques for the on-line detection of antioxidants in liquid chromatography eluates //J. Chromatog, 2001, v. 912, p. 73-82.
78. Peyrat-Maillaed M.N., Bonnelly S., Berset C. Talanta. 2000, v. 51, p. 709-716. Halvorsen B.L., Holte K., Myhrstad M.C.W. e.a.// A systematic screening of Total Antioxidants in dietary plants// J. Nutr, 2002, v. 132, p. 461-471.
79. Mannino S., Brenna O., Burratti S., Cosio M.S. A new method for the evaluation of the «antioxidant power» of wines// Electroanalysis, 1998, v. 10, p. 908-912.
80. Владимиров Ю.А. Изменение уровня свободных радикалов липидов в тканях животных при гипоксии и оксидативном стрессе, регистрируемое методом прижизненного измерения хемилюминесценции в присутствии селективных активаторов свечения (03-04-49267). Москва: НИИФХМ МЗ РФ.
81. Глотов Н.В. Онтогенетический гомеостаз у позвоночных животных в экологически контрастных условиях: эколого-генетические аспекты (03-04-49776). Екатеринбург: ИЭРиЖ УрО РАН.
82. Глухов В.В. Многоуровневый анализ антиоксидантной системы при формировании иммунного ответа насекомых (03-04-48310). Новосибирск: ИсиЭЖ СО РАН.
83. Гусаковская М.А. Пространственно-временное распределение свободных и связанных форм фитогормонов в завязях амфикиктических и апомикиктических видов цветковых в период от активизации яйцеклетки до начала её деления

(03-04-48045). М.: МГУ, Биологический ф-т.

84. Журавлёв Ю.Н. Изучение механизмов активации синтеза вторичных метаболитов в клеточных культурах растений (03-04-48102). Владивосток: БПИ ДВО РАН.

85. Жученко А.А. Использование трансгенеза для увеличения генетической изменчивости (03-04-48878). Москва: ВНИИ СБ РАСХН.

86. Балнокин Ю.В. Ионный гомеостаз и осморегуляция у галотолерантных микроводорослей// Физиология растений, 1993, т. 40, вып. 4, с. 567-576.

87. Косулина Л.Г., Луценко Э.К., Аксенова В.А. Физиология устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды. Ростов-на-Дону: 1993, 240 с.

88. Мерзляк М.Н. Активированный кислород и жизнедеятельность растений// Соросовский образовательный журнал, 1999, №9, с. 20-26.

89. Туманов И.И. Физиология закаливания и морозостойкости растений. М.: Наука, 1979. 350 с.