

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Барсукова Марина Евгеньевна

**Флуоресцентные индикаторные системы
для определения флавоноидов и пероксидов
в фармацевтических препаратах и биологических жидкостях**

02.00.02 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Научные руководители:

Веселова Ирина Анатольевна,
доктор химических наук, доцент

Шеховцова Татьяна Николаевна,
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Ермолаева Татьяна Николаевна,
доктор химических наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Липецкий государственный
технический университет», кафедра
химии, профессор

Сахаров Иван Юрьевич,
доктор химических наук, профессор,
ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В.
Ломоносова», химический факультет,
кафедра химической энзимологии,
ведущий научный сотрудник

Эпштейн Наталья Борисовна,
доктор фармацевтических наук, доцент,
Национальный исследовательский
ядерный университет «МИФИ»,
Фармацевтический центр практического
обучения и компетенций, начальник

Защита диссертации состоится 16 октября 2019 г. в 15.00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.02.05 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, аудитория 446.

E-mail: dissovet02.00.02@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <http://istina.msu.ru/dissertations/230929356/>

Автореферат разослан «5» сентября 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



Ананьева И.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Нарушение в организме баланса между процессами образования активных форм кислорода и антиоксидантной защиты, в пользу образования свободных радикалов, называется окислительным стрессом (ОС). Образующиеся в условиях ОС активные формы кислорода (АФК): гидроксильный радикал ($\cdot\text{OH}$), супероксидный радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$), ион гипохлорита (OCl^-) и пероксид водорода – вызывают повреждения клеточных структур, нарушение транспорта ионов через мембрану, и как результат – разрушение клетки. Этим обусловлено их участие в патогенезе многих заболеваний, включая атеросклероз, гипертонию, ишемию, сахарный диабет, идиопатический легочный фиброз, болезни Паркинсона и Альцгеймера, онкологические заболевания. Продуктами окислительного стресса, образующимися в процессе свободно-радикальной деструкции, являются гидропероксиды липидов (первичные продукты перекисного окисления липидов, ПОЛ). Оценить количество и скорость образования свободных кислородных радикалов, а также утилизацию пероксидных соединений возможно с помощью маркеров антиоксидантной системы (флавоноидов, витаминов С, Е). Каждый флавоноид способен воздействовать на множество структурных и функциональных систем клетки и организма в целом. Поэтому очень важно определять, как маркеры окислительного стресса – гидропероксиды, так и компоненты антиоксидантной системы – флавоноиды. До сих пор серьезной аналитической проблемой остаются недостаточная чувствительность и селективность разработанных методик определения указанных соединений в сложных матрицах неочищенных растительных экстрактов или биологических жидкостей, продолжительность, сложность, высокая стоимость анализа. В настоящее время для преодоления указанных проблем используют предварительную, весьма трудоемкую пробоподготовку, в том числе концентрирование полифенольных веществ методами жидкость-жидкостной или твердофазной экстракции на различных сорбентах.

Многообразие и неустойчивость биологически активных веществ в живых системах в условиях развития окислительного стресса обуславливают потребность в чувствительных, но при этом простых, точных и экспрессных (длительность анализа не должна превышать 15-30 мин) методах их определения.

Цель работы состояла в создании новых флуоресцентных индикаторных систем для экспрессного, чувствительного и селективного определения маркеров окислительного стресса – пероксида водорода и органических пероксидов, и антиоксидантной системы – флавоноидов, в фармацевтических препаратах и биологических жидкостях.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи.

- Получить интенсивно флуоресцирующие производные флавоноидов с аминами различного строения в результате реакции дериватизации продуктов окисления аналитов.
- Разработать флуоресцентные экспресс-методики в планшетном варианте для определения флавоноидов в объектах с предсказуемым набором флавоноидов для быстрого скрининг-анализа.
- Адаптировать предложенную индикаторную систему для хроматографического определения флавоноидов с флуориметрическим детектированием в растительных экстрактах неизвестного состава.
- Разработать методики определения пероксидов различного строения по реакции образования ими флуоресцирующих комплексов с европием(III) и антибиотиком тетрациклинового ряда (ТЦа) в водном, водно-органических растворах и в присутствии ПАВ.
- Продемонстрировать возможность использования разработанных индикаторных систем в анализе реальных объектов различной природы – фармацевтических и лекарственных препаратов, биологических жидкостей – без предварительной (или минимальной) пробоподготовки образцов.

Научная новизна. Предложена индикаторная система для определения как субстратов-восстановителей (ряда флавоноидов), так и субстратов-окислителей (пероксидов различного строения) пероксидазы из корней хрена, основанная на получении интенсивно флуоресцирующих производных по реакции дериватизации с *мезо*-1,2-дифенилэтилендиамином (ДЭД) или бензиламином (БА). При определении флавоноидов эту систему можно использовать в двух вариантах: как систему для быстрого скрининг анализа объектов с предсказуемым набором флавоноидов, а также как детектирующую систему для хроматографического анализа растительных экстрактов с неизвестным составом компонентов без предварительной (или минимальной) пробоподготовки образцов.

Для селективного и экспрессного флуориметрического определения пероксида водорода на фоне органических пероксидов; а также для определения общего содержания органических пероксидов (пероксида мочевины, 2-бутанонпероксида, *трет*-бутилгидропероксида и пероксида кумола) в присутствии пероксида водорода на основе реакции образования ими тройных комплексов с {Eu(III)–ТЦа} предложен подход, основанный на направленном дизайне среды – ингибировании каталитической активности фермента каталазы в биологических объектах и использовании

различных водно-органических растворов, соответственно. Индикаторная реакция образования тройных комплексов {Eu(III)–ТЦа} с органическими пероксидами для определения 2-бутанонпероксида, *трет*-бутилгидропероксида, пероксида кумола ранее не применялась.

Практическая значимость. Разработаны методики, основанные на реакции дериватизации продуктов ферментативного окисления флавоноидов, позволяющие определять кверцетин, дигидрокверцетин и эпикатехин в диапазоне концентраций 0.1 – 5, 0.5 – 5, 1 – 10 мкМ, соответственно, кофейную кислоту – в диапазоне концентраций 0.1 – 10 мкМ.

Разработаны методики чувствительного и селективного ВЭЖХ-определения с флуориметрическим детектированием кверцетина, эпикатехина и кофейной кислоты на уровне их концентраций 0.06 – 4.2 мкМ (0.01 – 0.75 мкг/мл). Методики апробированы для определения флавоноидов в фармацевтических препаратах, экстрактах лекарственных трав, моче без подготовки (или минимальной) проб к анализу.

Показано, что предложенные индикаторные системы для определения общего содержания пероксидов в присутствии пероксида водорода в водно-органической среде (вода-ацетон) и селективного определения пероксида водорода на фоне органических пероксидов в условиях окислительного стресса в водной среде при ингибировании каталитической активности каталазы в биологических объектах, основанные на образовании тройного комплекса {Eu(III)–ТЦа–пероксид}, применимы для анализа плазмы крови и фолликулярной жидкости.

Автор выносит на защиту:

- индикаторные системы, включающие взаимодействие продуктов каталитического окисления флавоноидов (катализатор – пероксидаза, тирозиназа, Fe(III)-тетрамидомикроциклический лиганд ТАМЛ) с ароматическими аминами (*мезо*-1,2-дифенилэтилен-диамином, бензиламином) для определения самих флавоноидов
- сравнительные данные о кинетике окисления флавоноидов, катализируемого пероксидазой и тирозиназой;
- данные об особенностях отделения фермента от реакционной среды и проведения реакции в водно-органической среде при использовании индикаторной системы в качестве детектирующей для ВЭЖХ разделения и определения флавоноидов;
- индикаторную систему, основанную на реакции образования тройного комплекса {Eu(III)–ТЦа–пероксид} для определения пероксидов различного строения; данные о влиянии на чувствительность и

селективность разработанных методик природы антибиотика тетрациклинового ряда, органических растворителей и мицеллярных сред, а также ингибитора каталазной активности в биологических объектах – азида натрия;

- методики определения антиоксидантов (флавоноидов) и маркеров окислительного стресса (пероксида водорода и органических пероксидов) в фармацевтических препаратах и биологических жидкостях, в том числе позволяющие анализировать одновременно до 20 проб в течение 30 мин без предварительной (или минимальной) пробоподготовки).

Степень достоверности. Достоверность результатов обеспечена использованием комплекса современных инструментальных методов анализа, статистической оценкой погрешностей измерений, а также хорошей воспроизводимостью полученных результатов и их согласованностью для различных методов.

Апробация работы. Основные результаты работы доложены на Международном молодежном научном форуме «Ломоносов–2015», (Москва, 2015), II Всероссийской конференции по аналитической спектроскопии с международным участием (Туапсе, 2015), IV Международной конференции по биосенсорным технологиям «Biosensing Technology» (Лиссабон, Португалия, 2015), XI Международном симпозиуме по полиэлектролитам «ISP – 2016» (Москва, 2016), Международном конгрессе по биотехнологиям «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни» (Москва, 2019 г.), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов–2019» (Москва, 2019), Международной конференции «Euroanalysis 2019» (Стамбул, Турция 2019).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 4 статьи в рецензируемых научных журналах и 6 тезисов докладов.

Личный вклад автора. В основу диссертации положены результаты научных исследований, выполненных непосредственно автором или в сотрудничестве с коллегами. Личный вклад соискателя состоял в поиске и систематизации данных литературы по теме работы, постановке и осуществлении экспериментов, обработке и интерпретации полученных данных, публикации результатов исследований.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, двух глав обзора литературы, пяти глав, представляющих результаты исследований и их обсуждение, выводов, списка литературы (251 наименований) и приложения. Работа изложена на 183 страницах печатного текста, содержит 67 рисунков и 33 таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационной работы, сформулированы цель и поставленные задачи, показаны научная новизна работы и ее практическая значимость.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В первой главе обзора литературы рассмотрены и систематизированы сведения о ферментативных реакциях окисления флавоноидов, об основных методах подготовки проб реальных объектов, содержащих флавоноиды, а также методы определения флавоноидов и оценки по их содержанию фитотерапевтической или антиоксидантной активности различных объектов. Примеры и особенности определения флавоноидов методом ВЭЖХ систематизированы в таблицах.

Во второй главе описана роль органических пероксидов и пероксида водорода в живых организмах, а также обобщены и систематизированы сведения, в основном, за последние 15 лет, характеризующие достоинства, ограничения и перспективы развития современных методов и подходов к их определению, как маркеров окислительного стресса в биологических жидкостях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В третьей главе перечислены материалы и реагенты, использованные в работе, описана техника эксперимента в 18 методиках. Объектами исследования служили ряд флавоноидов (кверцетин, дигидрокверцетин, рутин, эпикатехин, кофейная кислота) и пероксиды различного строения (пероксид водорода, пероксид мочевины, 2-бутанонпероксид, *трет*-бутилгидропероксид, пероксид кумола).

Интенсивность флуоресценции и спектры испускания регистрировали на спектрофлуориметре Cary Eclipse («Agilent Technologies», США). Для измерений в растворе использовали 96-луночный полистирольный планшет («Costar», США). Хроматографический анализ проводили на системе Agilent 1100, снабженной бинарным насосом, он-лайн дегазатором подвижной фазы, автоматическим устройством ввода пробы, термостатом колонок, диодно-матричным детектором и флуориметрическим детектором (Agilent Technologies, США). В ходе работы использовали хроматографическую колонку: Synergi Hydro (150 мм × 4.6 мм, размер частиц – 4 мкм, размер пор – 120 Å) и Synergi Hydro (250 мм × 4.6 мм, размер частиц – 4 мкм, размер пор – 120 Å), («Phenomenex», США).

Основные результаты и их обсуждение представлены в главах 4 – 8.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выбор индикаторной системы для определения флавоноидов.
В качестве аналитов в работе использовали флавоноиды различного строения: кверцетин, дигидрокверцетин, рутин, эпикатехин и кофейную кислоту, поскольку именно эти соединения являются наиболее распространенными маркерами антиоксидантной активности. Кроме того, существует потребность в разработке чувствительных, селективных и экспрессных методик совместного и индивидуального определения перечисленных соединений в растительном сырье и фармацевтических препаратах.

Одним из перспективных подходов, способных обеспечить высокую чувствительность определения указанных соединений и не требующих сложной и длительной предварительной подготовки пробы, является дериватизация продуктов ферментативного окисления аналитов с ароматическими аминами с образованием интенсивно флуоресцирующих производных. В результате масс-спектрометрического анализа смеси в реакции дериватизации продукта пероксидазного окисления *кверцетина с ДЭД* установили, что основным продуктом дериватизации является соединение с молекулярной массой 494, тогда как молекулярная масса исходного кверцетина – 302. На основании этого может быть предложена следующая схема дериватизации (рис. 1).

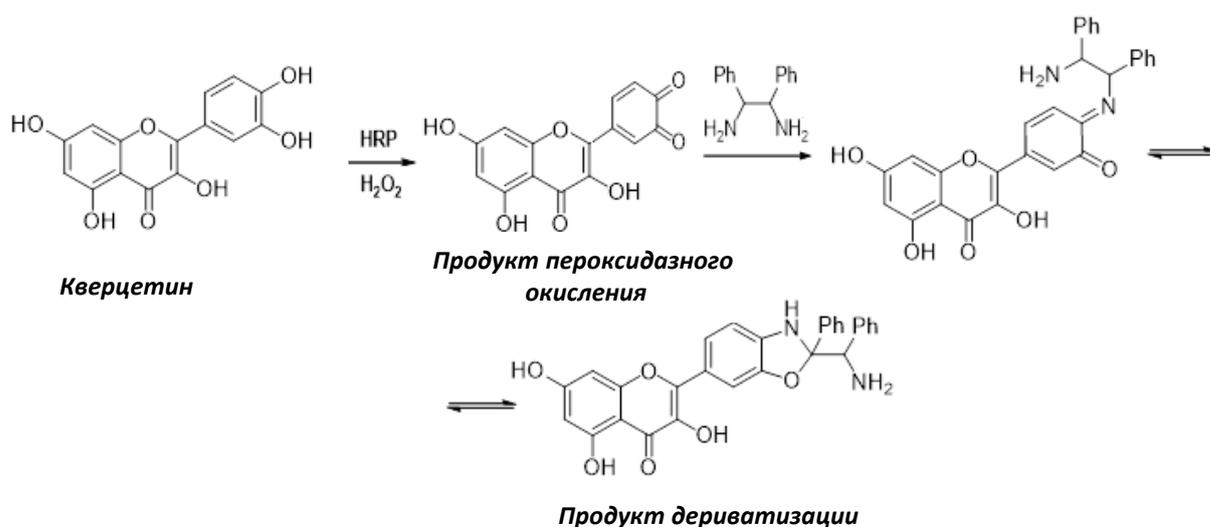


Рис. 1. Предполагаемая схема реакции дериватизации продукта пероксидазного окисления кверцетина с ароматическим амином ДЭД.

Выбор условий окисления флавоноидов в присутствии различных биокатализаторов. Кинетику образования продуктов окисления кверцетина в присутствии пероксидазы из корней хрена (ПХ) и тирозиназы гриба (ТГ) изучали при 325 нм (рис. 2).

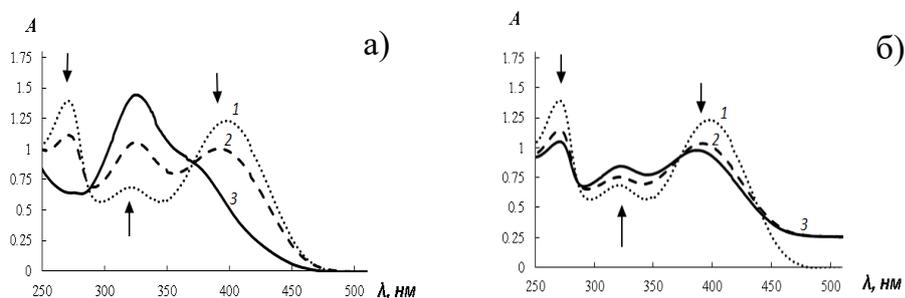


Рис. 2. Спектры поглощения кверцетина (1) и продукта его окисления через 3 мин (2) и 5 мин (3) после начала реакции в присутствии ПХ (а), ТГ (б). Условия: 0.2 М глицин–КОН буферный раствор, рН 8.0, $c(KB) = 100 \text{ мкМ}$, $c(H_2O_2) = 0.1 \text{ мМ}$, $c(ПХ) = 1 \text{ нМ}$ (а); $c(ТГ) = 0.6 \text{ мкМ}$ (б).

Скорость реакции в присутствии ПХ максимальна при ее концентрации 2.5 нМ, ТГ – 0.92 мкМ; при дальнейшем увеличении концентрации биокатализатора скорость реакции снижается.

Для выбора наиболее эффективного биокатализатора реакции **окисления флавоноидов** рассчитали кинетические параметры реакции окисления флавоноидов в присутствии пероксидазы и тирозиназы (табл. 1). При сравнении кинетических параметров реакции ($k_{кат}$ и $k_{кат}/K_M$) установили, что наиболее эффективным и специфичным биокатализатором для окисления кверцетина и остальных анализов является *пероксидаза* из корней хрена.

Таблица 1. Кинетические параметры реакций окисления кверцетина в присутствии различных биокатализаторов

Метод	K_M , мкМ	$k_{кат}$, мин ⁻¹	$k_{кат}/K_M$, мкМ ⁻¹ × мин ⁻¹
Пероксидаза			
<i>Лайнунивера-Берка</i>	23 ± 2	217 ± 5	9 ± 1
<i>Ленгмюра-Хейнса</i>	20 ± 3	208 ± 5	10 ± 1
<i>Иди-Хофсти</i>	22 ± 1	214 ± 5	9 ± 1
Тирозиназа			
<i>Лайнунивера-Берка</i>	28 ± 3	$(31 \pm 1) \times 10^{-2}$	$(108 \pm 9) \times 10^{-4}$
<i>Ленгмюра-Хейнса</i>	24 ± 2	$(30 \pm 1) \times 10^{-2}$	$(128 \pm 8) \times 10^{-4}$
<i>Иди-Хофсти</i>	27 ± 1	$(31 \pm 1) \times 10^{-2}$	$(113 \pm 6) \times 10^{-4}$

Выбор наиболее эффективного биокатализатора реакции дериватизации флавоноидов. Установили, что несмотря на то, что тирозиназа катализирует окисление флавоноидов, она не может быть применена для образования флуоресцирующего производного, так как эту реакцию катализирует только пероксидаза (рис. 3). Оптимальное количество пероксидазы для дериватизации (0.5 мкМ) на 2 порядка выше, чем количество, необходимое для окисления флавоноида (2.5 нМ).

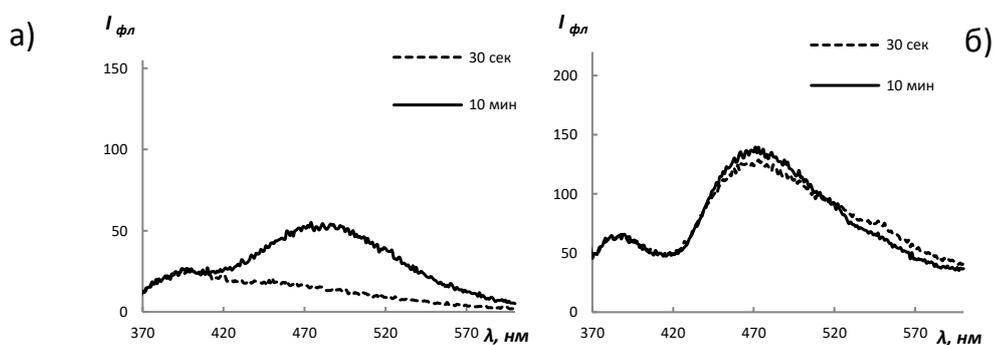


Рис. 3. Спектры флуоресценции продуктов дериватизации кверцетина с участием ПХ (а) и ТГ (б) через 30 сек и 10 мин после начала реакции. Условия реакций: $c(\text{КВ}) = 1 \text{ мкМ}$, $c(\text{ДЭД}) = 1 \text{ мМ}$, $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0.1 \text{ мМ}$, $c(\text{ПХ}) = 0.5 \text{ мкМ}$ (а), $c(\text{ТГ}) = 1 \text{ мкМ}$ (б), 0.2 М глицин–КОН буферный раствор, рН 8.0, $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ нм}$.

Процесс пероксидазной дериватизации изучили для каждого из аналитов (кверцетина, дигидрокверцетина, эпикатехина, кофейной кислоты и рутина) с двумя аминами: бензиламином (БА) и 1,2-дифенилэтилендиамином (ДЭД). Образование флуоресцирующего производного наблюдалось в 5 из 10 рассмотренных варьируемых пар «дериватирующий агент – флавоноид»: при дериватизации кверцетина, дигидрокверцетина, эпикатехина с ДЭД, кофейной кислоты – с ДЭД и БА. Наиболее интенсивно флуоресцирующие продукты образуются при использовании в качестве дериватирующего агента ДЭД. В выбранных условиях рутин не дериватируется ни с одним из агентов.

Флуориметрическое определение флавоноидов по реакции ферментативной дериватизации в планшетах. Для повышения экспрессности за счёт сокращения времени анализа, для одновременного анализа нескольких образцов, а также для повышения воспроизводимости и минимизации расхода пробы, индикаторную реакцию проводили в полистирольном микропланшете. Выбраны следующие условия формирования аналитического сигнала в микропланшете: цвет планшета – белый, мощность лампы – 800 Вт,

ширина входной и выходной щелей – 10/10 нм, объем анализируемого раствора – 250 мкл.

Выбрали условия получения наибольшего аналитического сигнала в зависимости от дериватирующего агента (*ДЭД*, *БА*), соотношения компонентов в реакционной системе, pH и природы буферного раствора, длин волн возбуждения и испускания (табл. 2, 3).

Таблица 2. Условия проведения реакции ферментативной дериватизации флавоноидов с *ДЭД*

Флавоноид Параметр	КВ	ДК	ЭП	КК
с(Е), мкМ	0.5			
с(H ₂ O ₂), мМ	0.1			
с(<i>ДЭД</i>), мМ	1		5	1
Время р-ции, мин	10			
Буферный раствор	0.2 М р-р глицина – КОН, pH 8			
λ_{ex} , нм	350			
λ_{em} , нм	470	460	465	500

Таблица 3. Условия проведения реакции ферментативной дериватизации кофейной кислоты с *БА*

с(Е), мкМ	0.25
с(H ₂ O ₂), мМ	0.1
с(<i>БА</i>), мМ	25
Время р-ции, мин	10
Буферный раствор	0.2 М раствор CAPS– КОН, pH 10
$\lambda_{ex} / \lambda_{em}$, нм	350/495

Преимущество предложенных методик заключается в возможности анализировать в ячейках многолуночного планшета одновременно до нескольких десятков проб, при этом время реакции (необходимое для достижения 90% величины аналитического сигнала) не превышает 10 мин.

Разработанные флуоресцентные экспресс-методики определения флавоноидов с использованием реакции дериватизации с *ДЭД* в присутствии пероксидазы – нативной и иммобилизованной в лунках полистирольного планшета позволяют определять кверцетин, дигидрокверцетин, эпикатехин и кофейную кислоту в диапазонах концентраций 0.1–5, 0.5–5, 1–10 и 0.1–10 мкМ, соответственно. Диапазон определяемых содержаний кофейной кислоты в присутствии *БА* составил 0.5–10 мкМ.

Хроматографическое определение производных флавоноидов с флуориметрическим детектированием осуществили с применением разработанной индикаторной системы. В результате проведенных экспериментов выбрали вариант проведения реакции дериватизации до введения в хроматографическую колонку, так как в этом случае снижается расход дорогостоящего биокатализатора. Кроме того, при проведении анализа в **послеколоночном** варианте значительно

сокращается время протекания реакции дериватизации (до 1–2 мин), что приводит к снижению сигнала флуоресценции продукта (в 5–10 раз) и, соответственно, чувствительности методики определения флавоноидов.

Для определения кверцетина с применением доколоночного варианта дериватизации в пробирке проводили индикаторную реакцию, а через 15 мин после ее начала пробу объемом 20 мкл вводили в хроматографическую колонку, термостатированную при 25°C. При этом обнаружили плохую воспроизводимость значений времен удерживания продуктов и площадей пиков, соответствующих этим продуктам, и рост давления в системе, на основании чего предположили, что проблемы вызваны сорбцией фермента на колонке или коммуникациях системы.

Для **выделения фермента из реакционной среды** предложили несколько способов его осаждения: высококонцентрированными растворами солей (высаливание), полианионами, образованными в растворе из полимеров (кислот и солей), и органическими растворителями. К раствору, содержащему ПХ (0.5 мкМ), *в первом* случае приливали насыщенный раствор сульфата аммония (10–95 % об. в системе), *во втором* – 2%-ные растворы полимеров: полиакриловой (ПАК), поливинилсульфоновой кислот (ПВСК), полистиролсульфоната натрия (ПСС), поли(4-стиролсульфонат-со-малеинат) натрия (ПССМ), поли(2-акриламидо-2-метил-пропансульфоновой кислоты (ПААПСК), альгината натрия (АН) и гепарина натрия (ГН); *в третьем* – растворы ацетонитрила или ацетона. Раствор центрифугировали, после чего регистрировали спектры поглощения надосадочной жидкости. Остаточную концентрацию ПХ в растворе оценивали по отношению величины максимума оптической плотности полученного раствора к величине оптической плотности раствора ПХ в глициновом буфере той же концентрации, выраженному в процентах (рис. 4-6). Степень осаждения ПХ сульфатом аммония и полимерами недостаточна для проведения хроматографического разделения продуктов реакции. Для наиболее полного осаждения ПХ из раствора содержание в системе ацетонитрила или ацетона должно быть на уровне 70 % об. Для флуориметрического определения флавоноидов возможно использование обоих растворителей, а для хроматографического разделения с последующим флуориметрическим определением — только ацетонитрила.

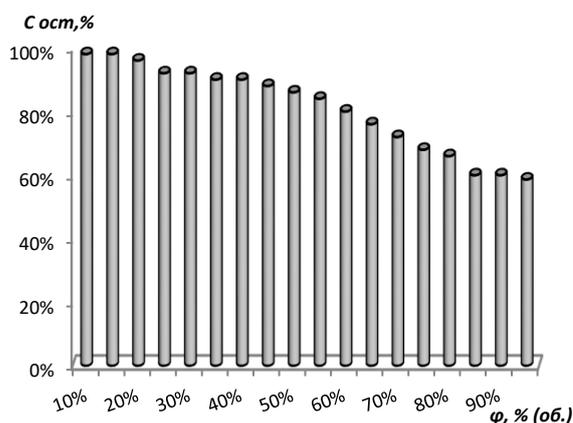


Рис. 4. Зависимость остаточной концентрации пероксидазы от содержания нас. раствора сульфата аммония в системе (10–95 %, об.).

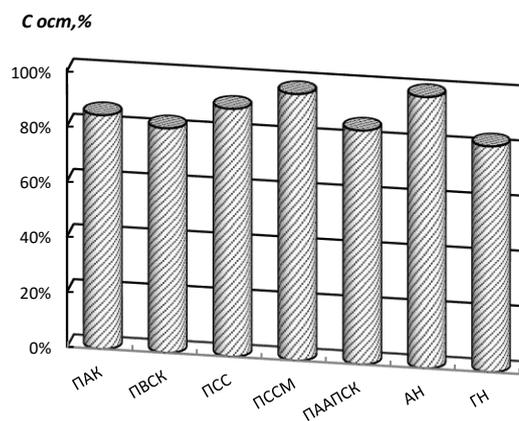


Рис. 5. Величины остаточной концентрации пероксидазы, осажденной полианионами (2%, об.).

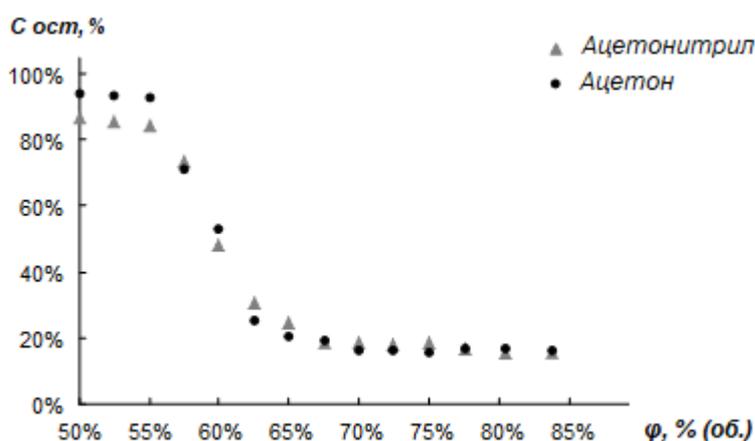


Рис. 6. Зависимость остаточной концентрации пероксидазы от содержания ацетона и ацетонитрила в системе (50–85%, об.).

Применение синтетического аналога пероксидазы — комплекса {железо(III) - тетрамаидомакроциклический лиганд (ТАМЛ)}. Основное достоинство в использовании миметика {Fe(III)-ТАМЛ} в качестве катализатора заключается в отсутствии необходимости его осаждения из реакционной среды перед хроматографическим разделением продуктов дериватизации флавоноидов.

Установили, что чувствительность методик с использованием в качестве катализатора комплекса {Fe(III)-ТАМЛ} ниже, пределы обнаружения выше, чем с использованием пероксидазы, величина s_R во всех случаях около 0.1. При этом концентрация миметика в системе (5 мкМ) должна быть на порядок выше концентрации пероксидазы, что значительно увеличивает расход катализатора. В реакции дериватизации флавоноидов с ароматическим амином ДЭД комплекс {Fe(III)-ТАМЛ} проявляет те же каталитические свойства, что и

нативная пероксидаза. Но по причине невысокой воспроизводимости сигнала флуоресценции продукта дериватизации изученную систему с миметиком пероксидазы нецелесообразно использовать для хроматографического разделения продуктов дериватизации флавоноидов.

Флуориметрическое определение флавоноидов по реакции дериватизации продуктов их окисления в присутствии органического растворителя. Для применения индикаторной реакции в динамическом режиме (ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием) выяснили условия проведения анализа в присутствии органического растворителя (при осаждении биокатализатора органическим растворителем — ацетонитрилом / ацетоном). В водно-органической среде длины волн возбуждения и испускания закономерно смещаются в коротковолновую область, а интенсивность флуоресценции образовавшегося продукта возрастает в 2-3 раза, по сравнению с аналогичной реакцией, протекающей в водной среде (рис. 7).

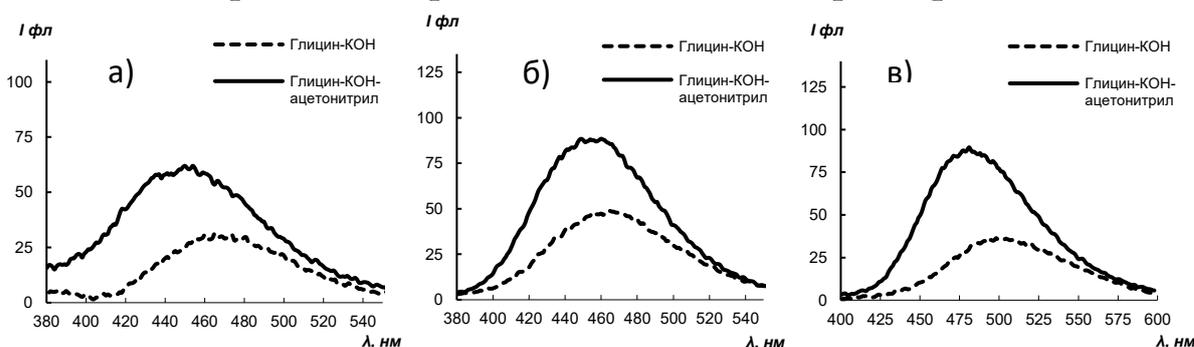


Рис. 7. Спектры флуоресценции продуктов дериватизации кверцетина (а), эпикатехина (б) и кофейной кислоты (в) в среде вода-ацетонитрил. Условия реакций: $c(\text{ПХ}) = 0.5 \text{ мкМ}$, $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0.1 \text{ мМ}$, $c(\text{ДЭД}) = 1 \text{ мМ}$, $c(\text{КВ}) = 1 \text{ мкМ}$, $c(\text{ЭП}) = 1 \text{ мкМ}$, $c(\text{КК}) = 1 \text{ мкМ}$, 0.2 М глицин-КОН буферный раствор, $\text{pH } 8.0$, ацетонитрил (66.7 %, об.), $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ нм}$.

Методика с использованием пероксидазы позволяет определять кверцетин в диапазоне концентраций $0.025\text{--}1.0 \text{ мкМ}$, эпикатехин — $0.010\text{--}1.0 \text{ мкМ}$, а кофейную кислоту — $0.025\text{--}2.5 \text{ мкМ}$ в водно-органических средах, т.е. позволяет на порядок снизить пределы обнаружения, что особенно важно для анализа реальных объектов.

Определение флавоноидов по реакции их ферментативной дериватизации в режиме ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием при проведении реакции до ввода в систему. В подобранных условиях проведения хроматографического разделения получили хроматограммы продуктов дериватизации кверцетина, кофейной кислот, эпикатехина и их смеси в соотношении 1:1:1 (рис. 8).

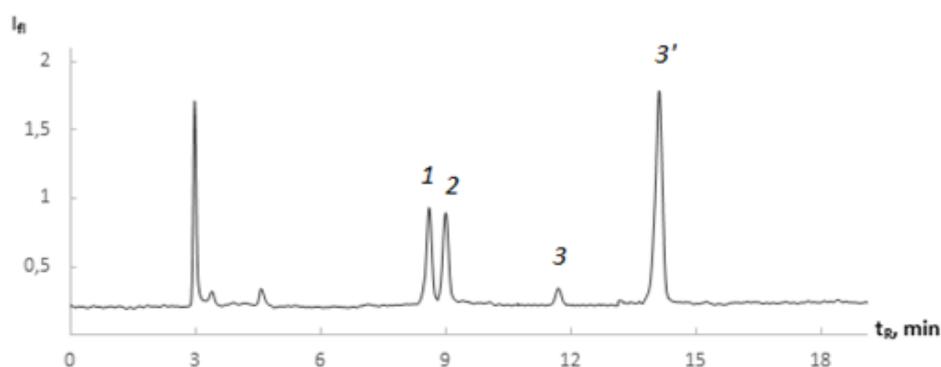


Рис. 8. Хроматограмма продуктов дериватизации модельной смеси из кверцетина, эпикатехина и кофейной кислоты (содержание в системе по 0.5 мкг/мл). Колонка Synergi Hydro 250 мм × 4.6 мм, 4 мкм. Элюент: А – ацетонитрил; В – вода. Градиентный режим, F = 0.7 мл/мин, объем вводимой пробы 10 мкл, T = 25°C. Флуориметрическое детектирование при $\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 340/450$ нм. Пики: 1— КВ; 2— ЭП; 3, 3'— КК.

Хроматографические характеристики разделения продуктов дериватизации тройной смеси флавоноидов и метрологические характеристики методик определения кверцетина, эпикатехина и кофейной кислоты представлены в табл. 4 и 5 .

Таблица 4. Хроматографические характеристики разделения продуктов дериватизации тройной смеси: кверцетин, эпикатехин и кофейная кислота

Пик соединения	t_R , мин	N, ТТ/м	A	Rs
Кверцетин	8.6	7300	–	–
Эпикатехин	9.0	8600	1.2	1.3
Кофейная кислота (пик 3)	11.7	5700	1.5	3.1
Кофейная кислота (пик 3')	14.1	12700	1.9	3.6

* два пика кофейной кислоты на хроматограмме рис. 8 соответствуют двум её формам (протонированной и депротонированной) в условиях выполнения эксперимента

Рассчитанные параметры хроматографического разделения позволяют сделать вывод о возможности индивидуального определения каждого из флавоноидов при их совместном присутствии.

Разработанные методики характеризуются высокой чувствительностью, широким диапазоном определяемых содержаний и низкими пределами обнаружения флавоноидов, что позволяет оценивать качество растительного сырья, фармацевтических препаратов по содержанию в них маркеров антиоксидантной активности.

Таблица 5. Метрологические характеристики определения продуктов дериватизации тройной смеси: кверцетина, эпикатехина и кофейной кислоты

Соединение	Диапазон опр.конц., мкг/мл (мкМ)	C_{min} , мкг/мл (мкМ)	Коэффициент корреляции, r	s_r (при s_n , $n = 4$, $P =$ 0.95)
Кверцетин	0.05–0.75	0.016	0.995	0.04
	(0.16–2.5)	(0.053)		
Эпикатехин	0.05–0.75	0.015	0.994	0.04
	(0.17–2.5)	(0.052)		
Кофейная кислота	0.01–0.75	0.003	0.997	0.02
	(0.06–4.2)	(0.017)		

Определение флавоноидов в реальных объектах. Для оценки возможности практического применения разработанных методик определения флавоноидов проанализировали фармацевтические препараты и экстракты лекарственных трав. Несмотря на значительное количество сопутствующих активных и вспомогательных компонентов в исследованных фармпрепаратах, дополнительная пробоподготовка, кроме растворения таблеток и крема в органическом растворителе (ДМСО) или получения водных экстрактов лекарственных трав, не потребовалась. Полученные результаты определения кверцетина и дигидрокверцетина в лекарственных препаратах хорошо согласуются с содержаниями, указанными производителями, а кофейной кислоты и эпикатехина - с данными, полученными методом ВЭЖХ с УФ детектированием (табл. 6).

Таблица 6. Определение флавоноидов в фармацевтических препаратах по реакции ферментативной дериватизации с ДЭД

Препарат	Определяемое соединение	Заявлено производителем	Найдено	
			Град.график	Метод добавок
«Капилар» (таблетки)	Дигидрокверцетин	10 мг	10±1	10±1
«Капилар» (гель-крем)	Дигидрокверцетин	0.60 г	0.60±0.03	0.60 ±0.01
«Activated Quercetin»	Кверцетин	0.33 г	0.34±0.01	0.33±0.01
«Ноготков цветки»	Кофейная кислота	0.9±0.1 мкМ	0.9±0.1	0.9±0.1
«Зверобоя травы»	Эпикатехин	3.8 ±0.2 мкМ	3.8±0.2	3.7±0.2

Разработанные методики экспресс-определения флавоноидов в планшете с применением их дериватизации с ДЭД в присутствии фермента/миметика апробированы в анализе мочи здорового человека, разбавленной в 100 раз физиологическим раствором для исключения влияния компонентов матрицы (табл. 7). Меньшее влияние биологической матрицы наблюдалось в присутствии синтетического аналога.

Таблица 7. Определение кверцетина, эпикатехина и кофейной кислоты в моче по реакции дериватизации с ДЭД, катализируемой пероксидазой и миметиком {Fe(III)-ТАМЛ}, методом «введено-найдено» (n=4, P=0.95)

Определяемое соединение	<i>Пероксидаза</i>		<i>{Fe(III)-ТАМЛ}</i>	
	Введено, мкМ	Найдено, мкМ	Введено, мкМ	Найдено, мкМ
Кверцетин	1	3.6±0.3	1	1.7±0.9
	10	13.9±0.5	10	10.5±0.8
Эпикатехин	1	2.6±0.4	1	1.3±0.6
	10	11.3±0.7	10	11.0±1.0
Кофейная кислота	1	2.6±0.4	1	1.7±0.9
	10	11.8±0.7	10	12.1±0.8

Результаты хроматографического определения флавоноидов в настойке боярышника с флуориметрическим детектированием представлены в табл. 8. Вспомогательные вещества – этанол (70%), дубильные вещества, производные олеановой и урсоловой кислот.

Таблица 8. Результаты хроматографического определения флавоноидов в настойке боярышника

Определяемое соединение	Градуировочный график, мкМ	Метод добавок, мкМ
Кверцетин	5.6 ± 0.2	5.5 ± 0.2
Кофейная кислота	3.2 ± 0.1	3.2 ± 0.2

Таким образом, разработанную индикаторную систему можно использовать в двух вариантах: как систему для анализа объектов с предсказуемым набором флавоноидов для быстрого скрининг-анализа, а также как детектирующую систему в хроматографии для анализа растительных экстрактов неизвестного состава без предварительной пробоподготовки образцов.

Флуоресцентное определение пероксидов различного строения. Изучили несколько систем для флуоресцентного определения пероксидов в микропланшетах; основные из них:

- 1) пероксидазное окисление какого-либо флавоноида с последующей дериватизацией продукта его окисления с дифенилэтилендиамином;
- 2) образование флуоресцирующего комплекса $\{Eu(III)\text{-окситетрациклин (ОТЦ) - пероксид}\}$.

На примере определения пероксида кумола (аналога гидропероксидов липидов) по первой реакции установили тушение флуоресценции, что, возможно, связано с низкой полярностью этого пероксида и блокировкой активного центра фермента/миметика большим углеродным радикалом.

Предположив, что регистрация аналитического сигнала по тушению флуоресценции будет неспецифичной при работе со сложными матрицами биологических объектов, решили перейти к более простым системам с меньшим числом компонентов, простого строения и небольшого размера. При этом и по чувствительности, воспроизводимости и возможности одновременного анализа нескольких образцов более предпочтительным оказался второй подход. При добавлении пероксида водорода к комплексу $\{Eu(III)\text{-ОТЦ}\}$ многократно возрастает интенсивность его флуоресценции за счет образования тройного комплекса $\{Eu(III)\text{-ОТЦ-H}_2O_2\}$ с максимумом эмиссии при 616 нм (рис. 9).

Для выяснения влияния природы тетрациклина на чувствительность определения пероксидов по реакции образования комплекса $\{Eu(III)\text{-ТЦа-пероксид}\}$ в выбранных условиях ($c(Eu)=1$ мМ, $c(\text{тетрациклина})=100$ мкМ, 0.2 М раствор MOPS– KOH, pH 6.9, $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 390/616$ нм) построили градуировочные зависимости и рассчитали метрологические характеристики методик определения пероксида водорода, пероксида мочевины, 2-бутанонпероксида и *трет*-бутилгидропероксида по реакции образования ими комплексов с европием и 3 различными тетрациклинами: окситетрациклином (ОТЦ), хлортетрациклином (ХТЦ) и доксициклином (ДЦ) (табл. 9). Оказалось, что на чувствительность определения пероксидов влияет как строение и полярность самих пероксидов, так и полярность антибиотиков тетрациклинового ряда, входящих в состав комплекса.

В случаях образования комплексов $\{Eu(III)\text{-ДЦ-пероксид мочевины}\}$ и $\{Eu(III)\text{-ОТЦ/ХТЦ-2-бутанонпероксид}\}$ наблюдалось

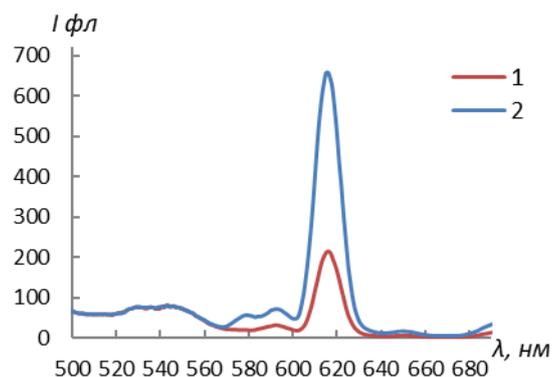


Рис. 9. Спектры флуоресценции двойного комплекса $\{Eu(III)\text{-ОТЦ}\}$ (1), тройного комплекса $\{Eu(III)\text{-ОТЦ-пероксид}\}$ (2), $c(Eu)=1.5$ мМ, $c(H_2O_2)=0.1$ мкМ, $c(ОТЦ)=500$ мкМ, $\lambda_{ex}=390$ нм

тушение флуоресценции. Интенсивность флуоресценции комплекса *трет*-бутилгидропероксида с любым из антибиотиков не зависела от концентрации аналита. Вероятно, это связано с возникновением стерических затруднений. Для наиболее полярного пероксида мочевины наибольший коэффициент чувствительности наблюдался при определении его в комплексах {Eu(III)-ОТЦ-Н₂O₂} и {Eu(III)-ХТЦ-Н₂O₂}; чувствительность определения пероксида водорода возрастала с увеличением полярности антибиотика (ДЦ < ХТЦ < ОТЦ) в комплексе. Наибольшее сродство к 2-бутанонпероксиду проявил ДЦ, который, в свою очередь, также является наименее полярным в представленном ряду антибиотиков.

Таблица 9. Метрологические характеристики определения пероксидов различного строения по образованию комплекса {Eu(III)-ТЦа-пероксид} (n = 4, P = 0.95)

ТЦа	ДОС, мкМ	c _{min} , мкМ	r	S _r (при c _n)
<i>Пероксид мочевины</i>				
ОТЦ	20–100	8.4	0.995	0.05
ХТЦ	20–100	8.4	0.986	0.09
<i>Пероксид водорода</i>				
ОТЦ	10–150	2.3	0.998	0.09
ХТЦ	15–150	5.7	0.998	0.06
ДЦ	15–150	5.9	0.998	0.06
<i>2-Бутанонпероксид</i>				
ДЦ	15–100	6.1	0.996	0.05

Влияние органических растворителей и ПАВ на метрологические характеристики определения пероксидов по реакции образования комплекса {Eu(III)-ОТЦ-пероксид}.

Одним из подходов к реализации суммарного определения органических пероксидов и пероксида водорода в биологических жидкостях, является проведение индикаторной реакции в водно-органических и мицеллярных средах. Для создания водно-органической среды выбрали растворители, полярность которых увеличивается в ряду: ацетон < этанол < ацетонитрил < ДМСО < Н₂O. Выбор таких растворителей обусловлен их коммерческой доступностью и способностью смешиваться с водой и биологическими жидкостями в любых отношениях. Для создания мицеллярной среды использовали ПАВ различной природы: катионный (ЦТАБ), неионогенный (ТВИН 80, ТРИТОН X-100) и анионный (ДДС).

Рассчитали метрологические характеристики методик определения пероксидов водорода, кумола, мочевины, 2-бутанонпероксида и *трет*-бутилгидропероксида в 4 различных органических растворителях и в присутствии 4 ПАВ различной природы при содержании добавки 10 об. %. Все изученные пероксиды удалось определить лишь в среде ацетона, наименее полярном из всех изученных растворителей; это свидетельствует о том, что в этом растворителе возможно суммарное определение пероксидов.

Изучение возможности определения органических пероксидов и пероксида водорода при их совместном присутствии.

Одновременное введение в реакционную систему двух органических пероксидов (*трет*-бутилгидропероксида с пероксидом мочевины / 2-бутанонпероксидом / пероксидом кумола) в концентрационных соотношениях 1:1, 1:2, 1:4 приводило к получению аддитивного аналитического сигнала в присутствии ацетона. Именно в этом растворителе результат определения суммарного количества пероксидов в наименьшей степени зависел от природы пероксида (радикала пероксида) и определялся лишь активностью пероксидной группы.

Для клинического анализа крови важно не только определять общее содержание пероксидов, но и селективно определять пероксид водорода в условиях окислительного стресса (при концентрации > 10 мкМ). Выяснили, что определению пероксида водорода по реакции образования комплекса с Eu(III) и ОТЦ не мешают пероксид мочевины, *трет*-бутилгидропероксид, пероксид кумола при соотношениях H₂O₂:органический пероксид 1:1, 5:1, 10:1. Совместное присутствие одновременно всех органических пероксидов не влияло на интенсивность флуоресценции комплекса {Eu(III)–ОТЦ–H₂O₂}, в котором пероксид водорода присутствует в 10- и 100-кратных избытках по отношению к остальным пероксидам в водной среде (рис. 10).

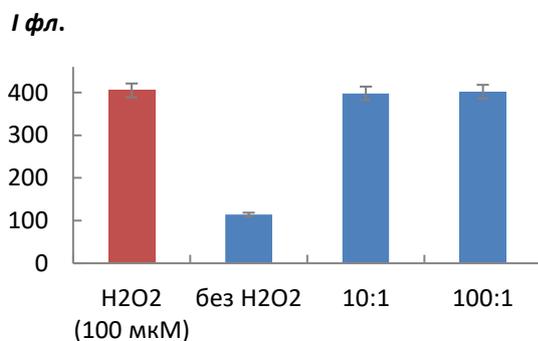


Рис. 10. Сравнение интенсивности флуоресценции комплексов {Eu(III)–ОТЦ–H₂O₂} и {Eu(III)–ОТЦ– H₂O₂/органические пероксиды} в водной среде (пероксид водорода присутствует в 10-, 100-кратном избытке по отношению к остальным пероксидам)

Определению пероксида водорода не мешают также глюкоза, аскорбиновая и мочева кислота, катехоламины. Как и ожидалось, на определение пероксида водорода в биологических объектах влияет присутствие каталазы; и этот же фермент обеспечивает селективное определение органических пероксидов в биологических жидкостях на фоне неорганического аналога за счет быстрого биокаталитического разложения последнего.

Для подавления каталитической активности каталазы при определении пероксида водорода в биологических объектах добавляли 2 мМ раствор азиды натрия.

Определение пероксидов в биологических объектах.

Разработанные флуоресцентные методики, основанные на реакции образования комплекса {E(III)-ОТЦ-пероксид}, при добавлении органического растворителя (аcetона) позволяют определять общее содержание органических пероксидов и селективно определять пероксид водорода в условиях окислительного стресса при концентрациях больше 10 мкМ в водной среде.

Методики определения общего содержания пероксидов по реакции образования комплекса {Eu(III)-ОТЦ-пероксид} в присутствии аcetона апробировали в анализе плазмы крови мышей.

Методики определения пероксида водорода по реакции образования комплекса {Eu(III)-ОТЦ-Н₂O₂} в водной среде в присутствии азиды натрия (ингибитора каталазы) апробировали в анализе плазмы крови человека при миелодиспластическом синдроме (МДС) и в фолликулярной жидкости женщин (табл.10).

Таблица 10. Определение пероксида водорода в биологических жидкостях по реакции образования комплекса {Eu(III)-ОТЦ-Н₂O₂} методом «введено-найденно» (n = 4, P = 0.95)

<i>Плазма крови человека с МДС</i>			<i>Фолликулярная жидкость</i>		
Введено Н₂O₂, мкМ	Найдено, мкМ	<i>s_r</i>	Введено Н₂O₂, мкМ	Найдено, мкМ	<i>s_r</i>
0	< c _H	–	0	< c _H	–
10	8±2	0.06	10	11±2	0.03
25	22±5	0.04	25	27±3	0.06
50	54±5	0.05	50	53±5	0.04

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложена новая индикаторная система для определения ряда **флавоноидов** (кверцетина, эпикатехина, дигидрокверцетина, кофейной кислоты), основанная на получении интенсивно флуоресцирующих производных по реакции дериватизации продуктов пероксидазного окисления аналитов с *мезо*-1,2-дифенилэтилендиамином. Эта система использована в двух вариантах: как система для быстрого скрининг анализа объектов с предсказуемым набором флавоноидов в планшетном варианте, а также в качестве детектирующей системы в хроматографии для анализа растительных экстрактов неизвестного состава.

Предложена индикаторная система для определения **пероксидов различного строения**, основанная на образовании ими флуоресцирующих комплексов с {Eu(III)–ТЦа}. В зависимости от цели анализа, условий проведения реакции (наличие органического растворителя или ингибитора каталазы), эту систему можно использовать либо для определения общего содержания органических пероксидов (пероксида мочевины, 2-бутанонпероксида, *трет*-бутилгидропероксида и пероксида кумола), либо для селективного определения пероксида водорода.

Разработанные методики определения антиоксидантов (флавоноидов) и маркеров окислительного стресса (пероксида водорода и органических пероксидов) позволяют анализировать до 20 проб одновременно в течение 30 мин и успешно апробированы в анализе реальных объектов: фармацевтических препаратах и биологических жидкостях.

ВЫВОДЫ

1. Предложены индикаторные системы для определения флавоноидов, основанные на получении интенсивно флуоресцирующих производных по реакции дериватизации продуктов их пероксидазного окисления с ароматическими аминами: *мезо*-1,2-дифенилэтилендиамином (ДЭД) или бензиламином (БА).

2. Разработаны флуоресцентные методики определения кверцетина, дигидрокверцетина, эпикатехина в присутствии ДЭД, а кофейной кислоты с ДЭД и БА в микропланшете в водной среде в диапазонах концентраций: 0.1–5, 0.5–5, 1–10 и 0.1–10, 0.5–10 мкМ, соответственно. Разработаны флуоресцентные экспресс-методики определения кверцетина, эпикатехина и кофейной кислоты по реакции получения их производных с ДЭД в водно-органической среде (ацетонитрил / ацетон, 70 об. %) в диапазонах концентраций: 0.025–1, 0.01–1 и 0.025–2.5 мкМ, соответственно.

3. Реакция получения флуоресцирующих производных флавоноидов в результате ферментативной дериватизации с ДЭД впервые

использована в качестве детектирующей для определения кверцетина, эпикатехина и кофейной кислоты методом ВЭЖХ в диапазоне концентраций 0.06–4.2 мкМ, с пределами обнаружения 0.05, 0.05 и 0.02 мкМ, соответственно.

4. Для флуоресцентного определения пероксидов водорода, мочевины, кумола, 2-бутанонпероксида и *трет*-бутилгидропероксида предложены индикаторные системы, основанные на реакции образования тройного комплекса {Eu(III)–ТЦа-пероксид} в водно-органических и мицеллярных средах. Показано, что суммарное содержание всех изученных пероксидов можно определить лишь в среде ацетона. Селективно определить пероксид водорода в присутствии органических пероксидов в условиях окислительного стресса (при 10-, 100- избытках пероксида водорода по отношению к остальным органическим пероксидам) возможно при проведении реакции в водной среде.

5. Показано, что флуоресцентную индикаторную систему на основе реакции дериватизации продуктов ферментативного окисления флавоноидов с ДЭД возможно использовать как для быстрого скрининг анализа биологических жидкостей (мочи человека) и фармацевтических препаратов (таблеток, гелей, лекарственных трав), так и в качестве детектирующей системы в ВЭЖХ для анализа растительных экстрактов неизвестного состава. Предложенные флуоресцентные индикаторные системы для определения пероксидов различного строения, основанные на образовании тройного комплекса {Eu(III)–ОТЦ–пероксид} применены для определения общего содержания пероксидов в плазме крови мышей в среде вода-ацетон, а также для селективного определения пероксида водорода в водной среде при ингибировании каталазы в плазме крови и в фолликулярной жидкости человека. Разработанные методики позволяют одновременно анализировать до 20 образцов в течение 30 мин без предварительной (или минимальной) подготовки проб.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень Минобрнауки РФ, а также индексируемых в Web of Science, Scopus.

1. Родионов П.В., Веселова И.А., Павлова М.Е. (Барсукова М.Е.), Алиева Е.А., Шеховцова Т.Н. Подходы к повышению чувствительности определения фенольных соединений с использованием твердофазных оптических биосенсоров на основе хитозана. // Вест. Моск. Ун-та. Химия. 2013. Т. 54. № 3. С. 154-163. РИНЦ: 0.525

2. Барсукова М.Е., Токарева А.И., Буслова Т.С., Малинина Л.И., Веселова И.А., Шеховцова Т.Н. Кинетика окисления флавоноидов в водной и водно-

органической средах в присутствии пероксидазы, тирозиназы и гемоглобина. // Прикладная биохим. и микробиол. 2017. Т. 53. № 2. С. 146-154. WOS: 0.707

3. *Veselova I., Malinina L., Barsukova M., Tokareva A., Buslova T., Sokolova L., Pirogov A., Shekhovtsova T.* A novel multi-purpose enzymatic system and procedures for the rapid fluorescent determination of flavonoids in herbal pharmaceuticals and plant materials. // *Talanta*. 2017. V. 171. P. 108–114. WOS: 4.244

4. *Барсукова М.Е., Веселова И.А., Шеховцова Т.Н.* Основные методы и подходы к определению маркеров окислительного стресса - органических пероксидных соединений и пероксида водорода. // *Журн. аналит. хим.* 2019. Т. 74. № 2. С. 1–15. WOS: 0.971

ИНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ

1. *Павлова М.Е. (Барсукова М.Е.), Токарева А.И., Буслова Т.С.* Флуориметрическое определение флавоноидов после их ферментативной дериватизации. XXI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2014», Москва, 2014.
2. *Барсукова М.Е., Македонская М.И., Токарева А.И., Малинина Л.И., Веселова И.А., Шеховцова Т.Н.* Флуоресцентные экспресс-методики определения фенольных соединений в биологических объектах. II Всероссийская конференция по аналитической спектроскопии с международным участием, Краснодар, 2015.
3. *Веселова И.А., Барсукова М.Е., Сергеева Е.А., Еремина О.Е., Сидоров А.В., Гудилин Е.А., Шеховцова Т.Н.* Самособирающиеся хитозановые пленки как основа твердофазных оптических сенсоров. 11-й Международного симпозиума по полиэлектролитам (ISP-2016), Москва, 2016.
4. *Веселова И.А., Еремина О.Е., Македонская М.И., Барсукова М.Е., Гудилин Е.А., Шеховцова Т.Н.* Оптические сенсорные системы для экомониторинга, контроля качества растительного сырья и биомедицинской диагностики. Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни», Москва, 2019.
5. *Барсукова М.Е., Куроптева А.Е.* Флуоресцентное определение пероксидов различного строения по реакции образования их комплексов с европием(III) и антибиотиками тетрациклинового ряда. XXVI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019», Москва, 2019.
6. *Shekhovtsova T, Veselova I., Makedonskaya M., Barsukova M., Mikhailova A., Kouropteva A.* The universal approaches to the fluorimetric determination of the markers of neuromediator exchange and oxidative stress. International Conference «Euroanalysis 2019», Turkey, Istanbul, 2019.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность своим научным руководителям д.х.н., доц. И.А. Веселовой и д.х.н., проф. Т.Н. Шеховцовой за поддержку в научно-исследовательской деятельности и на жизненном пути.

Автор выражает благодарность д.х.н., проф. А.В. Пирогову и к.х.н. Л.С. Соколовой за помощь и ценные советы при разработке хроматографических методик, д.м.н., доц. Е.В. Проскурниной и к.б.н. М.М. Созаруковой за предоставленные образцы плазмы крови, коллективу лаборатории кинетических методов анализа химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова: А.И. Токаревой, А.И. Трофимовой, А.Е. Куроптевой, П.В. Родионову за помощь в проведении экспериментов и всестороннюю поддержку.

Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского государственного университета.