

С. Л. Аджиахметова (к.фармацевт.н., доц.), В. М. Руковицина (к.фармацевт.н., доц.),
Д. И. Поздняков (к.фармацевт.н., доц., зав.каф.), Э. Т. Оганесян (д.фармацевт.н., проф., зав.каф.)

СЕЛЕКТИВНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ОБЪЕКТОВ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ,
кафедра органической химии

357532, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11; e-mail: similla503@mail.ru

S. L. Adzhiakhmetova, V. M. Rukovitsina, D. I. Pozdnyakov, E. T. Oganesyana

SELECTIVE DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF OBJECTS OF SYNTHETIC ORIGIN BY THE AMPEROMETRIC METHOD

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – Branch of Volgograd State Medical University

11, Prospekt Kalinina Str., Pyatigorsk, 357532, Russia; e-mail: similla503@mail.ru

Определена антиоксидантная активность синтетических производных хромон-3-альдегида, гликозидов флоридзина, икариина и их агликонов с использованием амперометрического метода в сочетании с жидкостным хроматографом «Цвет Яуза 01-АА». Установлено, что самой высокой антиоксидантной активностью (1.145 ± 0.008 мг/г) обладает естественный флавоноид, мощный антиоксидант растительного происхождения гликозид флоретин. У агликонов флоретина и икаритина, в отличие от их гликозидов, наблюдается выраженная антиоксидантная активность – 0.90 ± 0.01 и 1.07 ± 0.01 мг/г, соответственно.

Ключевые слова: амперометрический метод; икариин; тролокс; флоридзин; хромон-3-альдегид; Цвет Яуза 01-АА

The antioxidant activity of synthetic derivatives of chromone-3-aldehyde, glycosides of phloridzin, icariin and their aglycones was determined using the amperometric method in combination with a Tsvet Yauza 01-AA liquid chromatograph. It was found that the natural flavonoid, a powerful antioxidant of plant origin, glycoside phloretin, possesses the highest antioxidant activity (1.145 ± 0.008 mg/g). The aglycones of phloretin and icaritin, in contrast to their glycosides, exhibit pronounced antioxidant activity of 0.90 ± 0.01 and 1.07 ± 0.01 mg/g, respectively.

Key words: amperometric method; chromone-3-aldehyde; icariin; phloridzin; trolox; Yauza color 01-AA

Как известно, свободные радикалы играют двойную роль в живых системах. Они являются токсичными побочными продуктами аэробного метаболизма, приводящими к окислительному повреждению и тканевым нарушениям, а также служат сигналами для активации соответствующих стрессовых реакций^{1, 2}. Баланс между свободными радикалами и антиоксидантами важен для нормального функционирования организма. Если количество свободных радикалов превышает физиологические нормы, имеет место снижение способности организма их контролировать, что приводит к формированию оксидативного стресса^{1, 2}, который является одной из основных

причин многих заболеваний, включая сахарный диабет, сердечно-сосудистые нарушения, атеросклероз, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и рак. Антиоксиданты помогут организму избежать этих явлений¹.

Одним из методов определения суммарного содержания антиоксидантов является амперометрический метод с использованием жидкостного хроматографа «Цвет Яуза 01-АА».

В обзоре³ представлены преимущества амперометрического метода: время исследования каждого образца занимает несколько минут; точное дозирование веществ; ошибка определения не превышает 5%; низкая вероятность взаимного влияния антиоксидантов в смеси.

Дата поступления 18.09.25

В качестве ингибиторов окисления при амперометрическом определении в различных биологических системах, пищевых добавках и лекарственных средствах по отдельности и в смесях используются стандартные образцы мочевой кислоты, глутатиона, тролокса, аскорбиновой кислоты, галловой кислоты, кверцетина, мексидола и фенозана калия⁴.

Амперометрию часто используют при определении суммарного содержания антиоксидантов, и в настоящее время описаны модификации данного метода, например, использование комплекса медь(II)-неокупроин⁵; амперометрическое восстановление 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH) на стеклоуглеродном электроде^{6,7}.

Часто в качестве внутреннего стандарта при определении антиоксидантов амперометрическим методом используется тролокс (водорастворимый аналог α -токоферола), который обладает выраженными известными антиоксидантными свойствами. Полученные значения электрохимической окисляемости тролокса коррелируют с параметрами антиоксидантной активности, измеренными другими методами^{4,8,9}.

Ранее нами были синтезированы новые соединения на основе хромон-3-альдегида^{10,11}, а для получения агликонов – флоретина и икаритина был проведен гидролиз их гликозидов^{12,13}. Эти соединения обладают различными видами биологической активности, в том числе антиоксидантной, нейропротекторной, антидиабетической.

Целью данной работы явилось амперометрическое детектирование антиоксидантной активности объектов синтетического происхождения: производных хромон-3-альдегида, гликозидов флоридина, икаритина и их агликонов.

Материалы и методы

Суммарное содержание антиоксидантов в анализируемых извлечениях определяли на жидкостном хроматографе Цвет Яуза 01-АА амперометрическим методом, используя градуировочный график зависимости выходного сигнала от концентрации тролокса (99.87%, «хч», BLD Pharmatech Ltd., CAS 53188-07-1). Методика выполнения измерений содержания антиоксидантов в исследуемых объектах амперометрическим методом, разработанная ОАО НПО «Химавтоматика», аттестована ФГУП Всероссийским научно-исследовательским институтом метрологической службы^{1,2}.

Для построения градуировочного графика последовательно регистрировали сигналы растворов тролокса в порядке возрастания их концентрации от 6.5 до 400 мг/л. С целью исключения случайных результатов и усреднения данных проводи-

ли по 5 последовательных измерений каждого из семи градуировочных растворов. За результат принимали среднее арифметическое значение из 5 измерений (относительное среднеквадратическое отклонение не более 5%).

Методика получения анализируемых извлечений: около 0.01 г (точная навеска) исследуемых соединений помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в небольшом объеме и доводили до метки 95%-ным этиловым спиртом. В случае необходимости пробу разбавляли¹⁻⁴.

Суммарное содержание антиоксидантов (мг/г) определяли по формуле:

$$X = \frac{X_G \cdot V_n \cdot N}{m_n \cdot 1000},$$

где X_G – массовая концентрация антиоксидантов, найденная по градуировочному графику, мг/л;

V_n – объем извлечения, мл; m_n – навеска анализируемых соединений, г;

N – кратность разбавления.

Амперометрическое детектирование в комбинации с высокоэффективной жидкостной хроматографией широко применяется для определения полифенолов в пищевых продуктах и напитках. Стандартными образцами при определении природных антиоксидантов являются кверцетин и галловая кислота¹⁴. Данные стандартные образцы часто используются при изучении растительных объектов.

В нашем исследовании анализируемые образцы (табл. 1) получены в результате синтеза, поэтому в качестве внутреннего стандарта использовали синтетический препарат тролокс^{10,12,13}.

Сущность амперометрического метода с использованием жидкостного хроматографа «Цвет Яуза 01-АА» состоит в том, что при окислении молекул антиоксидантов на поверхности рабочего электрода изменяется напряжение тока, которое автоматически регистрируется амперометрической ячейкой. Данные из детектора регистрируются процессорным блоком и отображаются в виде пиков на мониторе. Величина возникающей при этом силы электрического тока, будет зависеть от природы и концентрации анализируемых веществ. Концентрацию антиоксидантов определяли по площадям пиков дифференциальных кривых соответствующих извлечений.

Результаты и их обсуждение

Массовую концентрацию антиоксидантов исследуемого образца определяли по градуировочному графику тролокса¹², его концентрация и выходные сигналы представлены в табл. 2.

Названия и структурные формулы анализируемых соединений

Название	Формула	Название	Формула
Хромон-3-альдегид 1		3,5-дигидрокси-2-[3-(4-гидроксифенил)пропаноил]-фенил-β-D-глюкопиранозид (флоридзин) 7	
6-хлор-4-оксо-4Н-1-бензопиран-3-карбальдегид 2		3-(4-гидроксифенил)-1-(2,4,6-тригидроксифенил)-пропан-1-он, (флоретин) 8	
7-метокси-4-оксо-4Н-1-бензопиран-3-карбальдегид 3		7-(β-D-глюкопиранозилокси)-5-гидрокси-4'-метокси-8-(3-метилбут-2-ен-1-ил)-3-(α-L-рамнопиранозилокси) флавон (икариин) 9	
3-формил-4-оксо-4Н-1-бензопиран-6-ил ацетат 4		7-(β-D-глюкопиранозилокси)-5-гидрокси-4'-метокси-8-(3-метилбут-2-ен-1-ил)флаван, (икаризид I) 10	
3-формил-4-оксо-4Н-1-бензопиран-7-ил ацетат 5		3,5,7-тригидрокси-4'-метокси-8-пренилфлаван (икаритин) 11	
6-фтор-4-оксо-4Н-1-бензопиран-3-карбальдегид 6			

Таблица 2

Концентрации и выходные сигналы тролокса 12

№ п/п	Концентрация тролокса, мг/л	Сигнал тролокса, нАс
1	6.5	80.45
2	12.5	140.87
3	25	334.99
4	50	608.47
5	100	1237.95
6	200	2501.17
7	400	5024.45

На рис. 1 представлена структурная формула тролокса, на рис. 2 – градуировочный график зависимости выходного сигнала от его концентрации.

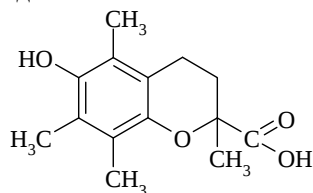
**12**

Рис. 1. Структурная формула тролокса

Визуальная оценка графика свидетельствует о его линейности, при этом коэффициент корреляции составляет 0.9999, что позволяет использовать его для определения суммарного содержания антиоксидантов в анализируемых соединениях синтетического происхождения. Уравнение градуировочного графика имеет вид:

$$y = 0.00008x + 0.0006$$

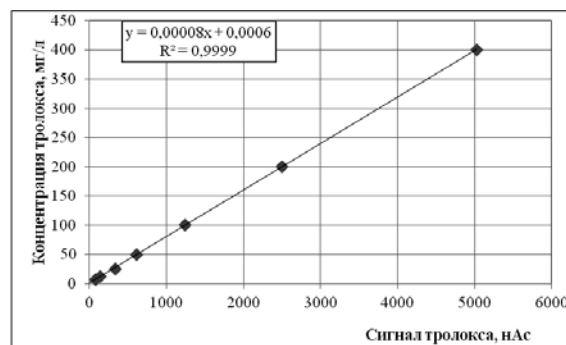


Рис. 2. Градуировочный график тролокса

Антиоксидантная активность анализируемых соединений

№ п/п	Соединение	Содержание антиоксидантов (в пересчете на тролокс, мг/г)	Метрологические характеристики
1	1	$\bar{X} = 0.63 \pm 0.01$	$S = 0.0100$, $\bar{S} = 0.0041$, $\varepsilon = 1.62\%$
2	2	$\bar{X} = 0.471 \pm 0.0008$	$S = 0.0080$, $\bar{S} = 0.0033$, $\varepsilon = 1.76\%$
3	3	$\bar{X} = 1.145 \pm 0.008$	$S = 0.0075$, $\bar{S} = 0.0031$, $\varepsilon = 0.69\%$
4	4	$\bar{X} = 0.98 \pm 0.01$	$S = 0.0118$, $\bar{S} = 0.0048$, $\varepsilon = 1.26\%$
5	5	$\bar{X} = 0.89 \pm 0.01$	$S = 0.0101$, $\bar{S} = 0.0041$, $\varepsilon = 1.20\%$
6	6	$\bar{X} = 0.491 \pm 0.007$	$S = 0.0064$, $\bar{S} = 0.0026$, $\varepsilon = 1.38\%$
7	7	$\bar{X} = 0.064 \pm 0.001$	$S = 0.0008$, $\bar{S} = 0.0003$, $\varepsilon = 1.24\%$
8	8	$\bar{X} = 0.90 \pm 0.01$	$S = 0.0097$, $\bar{S} = 0.0040$, $\varepsilon = 1.13\%$
9	9	$\bar{X} = 0.409 \pm 0.006$	$S = 0.0059$, $\bar{S} = 0.0024$, $\varepsilon = 1.50\%$
10	10	$\bar{X} = 0.72 \pm 0.01$	$S = 0.0103$, $\bar{S} = 0.0042$, $\varepsilon = 1.49\%$
11	11	$\bar{X} = 1.07 \pm 0.01$	$S = 0.0137$, $\bar{S} = 0.0056$, $\varepsilon = 1.34\%$

Суммарное содержание антиоксидантов определяли исходя из площадей пиков дифференциальных кривых соответствующих спиртовых растворов изучаемых соединений. Полученные данные представлены в табл. 3. Для каждой из проб проводили по шесть последовательных измерений выходного сигнала (площади пика) анализируемого антиоксиданта.

В ходе исследования было обнаружено, что самой высокой антиоксидантной активностью

(1.145 ± 0.008 мг/г) обладает соединение **3**. У агликонов флоретина и икаритина **8** и **11** наблюдается выраженная антиоксидантная активность – 0.90 ± 0.01 и 1.07 ± 0.01 мг/г, соответственно, в отличие от их гликозидов.

Эти результаты согласуются с полученными ранее данными по антиоксидантной активности производных хромон-3-альдегида в условиях мышечной дисфункции ¹¹.

Литература

1. Hassan H.A., Ahmed H.S., Hassan D.F. Free radicals and oxidative stress: Mechanisms and therapeutic targets // *Hum Antibodies*.– 2024.– V.32, №4.– Pp. 151-167.
2. Alkadi H. A Review on Free Radicals and Antioxidants // *Infect Disord Drug Targets*.– 2020.– V.20, №1.– Pp.16-26.
3. Тринеева О.В. Методы определения антиоксидантной активности объектов растительного и синтетического происхождения в фармации // *Разработка и регистрация лекарственных средств Раздел: Аналитические методики и методы контроля*.– 2017.– Т.4, №21.– С.180-197.
4. Sazhina N., Plotnikov E., Korotkova E., Dorozhko E., Voronova O. Electrochemical oxidability of antioxidants: synergism and antagonism in mixes // *J Pharm Bioallied Sci*.– 2018.– V.10, №2.– P.60-65.
5. Ayaz S., Uzer A., Dilgin Y., Apak R. A novel flow injection amperometric method for sensitive determination of total antioxidant capacity at cupric-neocuproine complex modified MWCNT glassy carbon electrode // *Mikrochim Acta*.– 2022.– V.189, №4.– P.167.
6. Milardovic S., Ivekovic D., Grabaric B.S. A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical // *Bioelectrochemistry*.– 2006.– V.68, №2.– Pp.175-80.
7. Arbnesi T., Frangu A., Fruhbauerova M., Cervenka L., Berisha L., Kalcher K., Sys M. Flow Injection Amperometric Evaluation of Trolox Equivalent

References

1. Hassan H.A., Ahmed H.S., Hassan D.F. [Free radicals and oxidative stress: Mechanisms and therapeutic targets]. *Hum Antibodies*, 2024, vol.32, no.4, pp.151-167.
2. Alkadi H. [A Review on Free Radicals and Antioxidants]. *Infect Disord Drug Targets*, 2020, vol.20, no.1, pp.16-26.
3. Trineeva O.V. *Metody opredeleniya antioksidantnoy aktivnosti obyektov rastitel'nogo i sinteticheskogo proiskhozhdeniya v farmatsii* [Methods for determining the antioxidant activity of plant and synthetic objects in pharmacy]. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv. Razdel Analiticheskiye metodiki i metody kontrolya* [Development and registration of drugs. Section Analytical methods and control methods], 2017. vol.4, no.21, pp.180-197.
4. Sazhina N., Plotnikov E., Korotkova E., Dorozhko E., Voronova O. [Electrochemical oxidability of antioxidants: synergism and antagonism in mixes]. *J Pharm Bioallied Sci*, 2018. vol.10, no.2, pp.60-65.
5. Ayaz S., Uzer A., Dilgin Y., Apak R. [A novel flow injection amperometric method for sensitive determination of total antioxidant capacity at cupric-neocuproine complex modified MWCNT glassy carbon electrode]. *Mikrochim Acta*, 2022. vol.189, no.4, p.167.
6. Milardovic S., Ivekovic D., Grabaric B.S. [A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical]. *Bioelectrochemistry*, 2006, vol.68, no.2, pp.175-180.
7. Arbnesi T., Frangu A., Fruhbauerova M., Cervenka L., Berisha L., Kalcher K., Sys M. [Flow Injection

Antioxidant Capacity of Chocolates with Different Cocoa Content at a Boron-Doped Diamond Electrode // *Food Technol Biotechnol.*– 2021.– V.59, №2.– Pp.194-200.

8. Plotnikov E., Korotkova E., Voronova O., Sazhina N., Petrova E., Artamonov A., Chernyavskaya L., Dorozhko E. Comparative investigation of antioxidant activity of human serum blood by amperometric, voltammetric and chemiluminescent methods // *Arch Med Sci.*– 2016.– V.12.– Pp.1071-1076.
9. Mudric S.Z., Gasic U.M., Dramicanin A.M., Ciric I.Z., Milojkovic-Opsenica D.M., Popovic-Dordevic J.B., Momirovic N.M., Tesic Z.L. The polyphenolics and carbohydrates as indicators of botanical and geographical origin of Serbian autochthonous clones of red spice paprika // *Food Chem.*– 2017.– №217.– Pp.705-715.
10. Rukovitsina V., Oganessian E., Pozdnyakov D. Synthesis and study of the effect of 3-substituted chromone derivatives on changes in the activity of mitochondrial complex III under experimental cerebral ischemia // *Journal of Research in Pharmacy.*– 2022.– V.26, №2.– Pp 408-420.
11. Воронков А.В., Поздняков Д.И., Руковицина В.М., Оганесян Э.Т. Антиоксидантная активность новых производных хромон-3-альдегида в условиях мышечной дисфункции // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.*– 2018.– Т.21, №6.– С.38-42.
12. Адзиахметова С.Л., Поздняков Д.И., Дибизева Н.М., Оганесян Э.Т. Исследование процесса гидролиза икариина // *Баш. хим. ж.*– 2024.– Т.31, №2.– С.10-14.
13. Поздняков Д.И., Адзиахметова С.Л., Червонная Н.М., Оганесян Э.Т. Химическая модификация *ex planta* флавоноида флоридзина реакцией оксимирования и оценка его нейропротекторной активности // *Баш. хим. ж.*– 2023.– Т.30, №4.– С.17-21.
14. Яшин А.Я. Методология определения антиоксидантной активности пищевых продуктов и биологических жидкостей // *Аналитические методы и приборы.*– 2021.– Т.11, №5.– С.370-384.
- Amperometric Evaluation of Trolox Equivalent Antioxidant Capacity of Chocolates with Different Cocoa Content at a Boron-Doped Diamond Electrode]. *Food Technol Biotechnol.*, 2021, vol.59, no. 2, pp. 194-200.
8. Plotnikov E., Korotkova E., Voronova O., Sazhina N., Petrova E., Artamonov A., Chernyavskaya L., Dorozhko E. [Comparative investigation of antioxidant activity of human serum blood by amperometric, voltammetric and chemiluminescent methods]. *Arch Med Sci.*, 2016, vol.12, pp.1071-1076.
9. Mudric S.Z., Gasic U.M., Dramicanin A.M., Ciric I.Z., Milojkovic-Opsenica D.M., Popovic-Dordevic J.B., Momirovic N.M., Tesic Z.L. [The polyphenolics and carbohydrates as indicators of botanical and geographical origin of Serbian autochthonous clones of red spice paprika]. *Food Chem.*, 2017, no.217, pp.705-715.
10. Rukovitsina V., Oganessian E., Pozdnyakov D. [Synthesis and study of the effect of 3-substituted chromone derivatives on changes in the activity of mitochondrial complex III under experimental cerebral ischemia]. *Journal of Research in Pharmacy*, 2022, vol.26, no.2, pp.408-420.
11. Voronkov A.V., Pozdnyakov D.I., Rukovitsina V.M., Oganessian E.T. *Antioksidantnaya aktivnost' novykh proizvodnykh khromon-3-al'degida v usloviyakh myshechnoy disfunktsii* [Antioxidant activity of new derivatives of chromone-3-aldehyde under conditions of muscle dysfunction]. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii* [Issues of biological, medical and pharmaceutical chemistry], 2018, vol. 21, no. 6, pp. 38-42.
12. Adzhiakhmetova S.L., Pozdnyakov D.I., Dibizheva N.M., Oganessian E.T. [Study of the icariin hydrolysis process]. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal* [Bashkir Chemical Journal], 2024, vol.31, no.2, pp.10-14.
13. Pozdnyakov D.I., Adzhiakhmetova S.L., Chervonnaya N.M., Oganessian E.T. [Ex planta chemical modification of the flavonoid phloridzin by oximation reaction and evaluation of its neuroprotective activity]. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal* [Bashkir Chemical Journal], 2023, vol.30, no.4, pp.17-21.
14. Yashin A.Ya. *Metodologiya opredeleniya antioksidantnoy aktivnosti pishchevykh produktov i biologicheskikh zhidkostey* [Methodology for determining the antioxidant activity of food products and biological fluids]. *Analiticheskiye metody i pribory* [Analytical methods and devices], 2021, vol.11, no.5, pp.370-384.