

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11)

016868

(13)

B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации
и выдачи патента: **2012.08.30**

(51) Int. Cl. *G01N 33/52* (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)

(21) Номер заявки: **201101629**

(22) Дата подачи: **2011.10.21**

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА И/ИЛИ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТОВ

(43) **2012.07.30**

(96) **2011000142 (RU) 2011.10.21**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТ-
ВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ДИСофт" (RU)**

(72) Изобретатель:
**Измайлов Дмитрий Юрьевич, Владимиров
Юрий Андреевич (RU)**

(74) Представитель:
Михайлов А.В. (RU)

(56) КЛЕБАНОВ Г.И. и др. Антиоксидантные свойства производных 3-оксипиридина: мексидола, эмоксипина и проксипина// Вопросы медицинской химии, № 3, 2001 [он-лайн], найдено из Интернет: <URL:http://medi.ru/pbmc/8810302.htm>, особенно с. 3, абз. 2, 3, с. 5, посл. абз.

МАРИН Д.В. и др. Фотохемиллюминесценция как метод изучения антиоксидантной активности в биологических системах// Математическое моделирование. Вопросы медицинской химии, № 4, 2000 [он-лайн], найдено из Интернет: <URL:http://medi.ru/pbmc/8800410.htm>

ХАСАНОВ В.В. и др. Методы исследования антиоксидантов//Химия растительного сырья, № 3, 2004, с. 63-75, особенно с. 66-68

RU-C1-2206891

RU-C2-2282851

GB-A-2245062

(57) Изобретение относится к средствам для определения количества и/или активности антиоксидантов в исследуемых образцах. Предложен способ определения количества и/или активности антиоксиданта в исследуемом образце, в котором фотометрируют реакцию смесь с известными начальными концентрациями источника свободных радикалов и активатора хемиллюминесценции с момента инициирования реакции, по зависимости интенсивности светового излучения упомянутой смеси от времени реакции вычисляют константу скорости реакции образования свободных радикалов (k_R) и константу скорости реакции элиминирования свободных радикалов при их взаимодействии с упомянутым активатором (k_{Lum}), готовят реакционные смеси с известной начальной концентрацией источника и активатора, упомянутых выше, и образца, содержащего антиоксидант, фотометрируют упомянутую смесь с момента инициирования реакции и по изменению интенсивности светового излучения от времени реакции вычисляют начальную концентрацию антиоксиданта $[In]_0$ и константу скорости реакции взаимодействия свободных радикалов и антиоксиданта (k_m). Технический результат - определение начальной концентрации заранее не известного антиоксиданта и его активности.

016868

B1

B1

016868

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к аналитической химии, а точнее к средствам для определения количества и/или активности антиоксидантов в исследуемых образцах.

Сведения о предшествующем уровне техники

Способы определения антиоксидантной емкости (т.е. общего количества свободных радикалов, с которыми может прореагировать вещество-антиоксидант) хорошо известны и могут быть условно разделены на следующие группы: спектрофотометрические способы, электрохимические способы, хемиллюминесцентные и иные способы.

Спектрофотометрические способы измерения антиоксидантной емкости образцов основаны на измерении количественных изменений оптической плотности реакционной смеси, в которой протекают окислительно-восстановительные реакции, при добавлении исследуемого образца (см., например, заявки КНР № 101413896, 101718703, 101241076 и мексиканскую заявку № 2008011324). Результаты измерений выражаются в относительных, а не в стандартизированных единицах (коими являются моли для количества вещества и молярность для концентрации вещества), обычно в эквивалентах тролокса, или другого эталонного (общепринятого) антиоксиданта.

Электрохимические способы определения антиоксидантов основаны на измерении количественных изменений вольтамперометрических характеристик окислительно-восстановительных реакций при добавлении исследуемого образца к реакционной смеси (см., например, патент РФ на изобретение № 2238555). Недостаток этих способов состоит в том, что процессы окисления протекают под воздействием внешней электрической силы, т.е. принудительно. В связи с этим антиоксидантные свойства веществ в условиях измерений не совпадают с антиоксидантными свойствами веществ в естественных условиях.

Хемиллюминесцентные способы определения антиоксидантной емкости позволяют непосредственно детектировать свободные радикалы, а не продукты окисления (см., например, патент РФ на изобретение № 2206891). Эти способы позволяют регистрировать кинетику взаимодействия радикалов с антиоксидантами, т.е. регистрировать естественное развитие процесса во времени. Недостаток хемиллюминесцентных способов состоит в невозможности достоверного определения количества и активности антиоксиданта в исследуемом образце. Это связано с тем, что во всех предложенных хемиллюминесцентных способах используются косвенные (амплитудные, временные или смешанные) параметры кинетики хемиллюминесценции, по которым не могут быть удовлетворительно смоделированы процессы, протекающие в реакционной смеси (см. также патентные публикации GB 2245062 A и DE 10327971).

Таким образом, общие недостатки известных способов выражаются в том, что результаты измерений имеют относительный характер и выражаются в сравнении показателей исследуемого образца с эталонным образцом, содержащим заранее известное количество эталонного вещества. Значения антиоксидантной емкости зависят от эталонного вещества, что не позволяет сравнивать антиоксидантную емкость веществ, свойства которых определены в сравнении с разными эталонными веществами. К тому же, известные способы не позволяют определить количество антиоксиданта независимо от его активности. В связи с этим невозможно установить, какими факторами (количеством или активностью антиоксиданта) обусловлена антиоксидантная емкость образца.

Сущность изобретения

Терминам и выражениям, используемым в настоящем тексте, придают следующее значение, если из контекста не следует иное.

Антиоксидантное соединение (антиоксидант) - индивидуальное химическое соединение, способное взаимодействовать со свободными радикалами, тем самым замедлять накопление продуктов окисления.

Антиоксидантная емкость - количество радикалов, с которыми вещество-антиоксидант может вступить во взаимодействие, независимо от количества радикалов, вступающих во взаимодействие с каждой молекулой антиоксиданта в отдельности.

Антиоксидантная активность - способность вещества взаимодействовать со свободными радикалами, характеризующаяся значением константы скорости соответствующей реакции.

Сильный антиоксидант - вещество, характеризующееся относительно высоким значением константы скорости реакции взаимодействия со свободными радикалами.

Слабый антиоксидант - вещество, характеризующееся относительно низким значением константы скорости реакции взаимодействия со свободными радикалами.

Активатор (активатор хемиллюминесценции) - вещество, излучающее квант электромагнитного излучения преимущественно в видимой области спектра при взаимодействии со свободным радикалом и имеющее высокий квантовый выход.

Источник свободных радикалов - вещество, при разложении которого или при взаимодействии которого с другими веществами образуются свободные радикалы.

Интенсивность излучения - количество фотонов, проходящее в единицу времени через единицу площади.

Остальные термины и выражения используют в обычном для своего контекста и данной области техники смысле.

Задача настоящего изобретения состоит в преодолении недостатков известных способов и в созда-

нии нового средства определенного назначения (т.е. способа, позволяющего установить количественное содержание и активность заранее неизвестного антиоксиданта в исследуемом образце), а технический результат - в определении активности антиоксиданта и его истинного (выраженного в стандартизированных, а не условных единицах) количественного содержания в исследуемом образце. Указанная возможность позволяет быстро определять количество антиоксиданта в образце, не требует применения сложных методов химического анализа и физико-химических методов.

Вышеуказанный технический результат проявляется при осуществлении способа определения количества и/или активности антиоксиданта в исследуемом образце, в котором фотометрируют реакцию смеси с известными начальными концентрациями источника свободных радикалов и активатора хемиллюминесценции с момента инициирования реакции, по зависимости интенсивности светового излучения упомянутой смеси от времени реакции вычисляют константу скорости реакции образования свободных радикалов (k_R) и константу скорости реакции элиминирования свободных радикалов при их взаимодействии с упомянутым активатором ($k_{L,um}$), готовят реакционные смеси с известной начальной концентрацией источника и активатора, упомянутых выше, и образца, содержащего антиоксидант, фотометрируют упомянутую смесь с момента инициирования реакции и по изменению интенсивности светового излучения от времени реакции, вычисляют начальную концентрацию антиоксиданта $[In]_0$ и константу скорости реакции взаимодействия свободных радикалов и антиоксиданта (k_m).

Интенсивность хемиллюминесценции в вышеуказанном способе могут определять посредством фотометра, флуориметра, спектрофотометра, спектрофлуориметра или хемиллюминометра.

В предпочтительном варианте осуществления способа для улучшения его воспроизводимости при осуществлении фотометрии, реакционную смесь термостатируют.

В качестве активаторов хемиллюминесценции могут применяться известные химические соединения, обладающие высоким квантовым выходом, предпочтительно люминол, люцигенин, 9,10-дибромантрацен, Eu^{3+} -тетрациклин, хлорофилл а, протопорфирин-IX, бактериофеофорбид, мезотетрафенилпорфирин, родамин Ж, хинолизин-кумарины.

Вышеуказанный технический результат также достигается в процессе применения способа фотометрии реакционной смеси с известными начальными концентрациями источника свободных радикалов и активатора хемиллюминесценции и известными параметрами кинетических уравнений, характеризующих образование и элиминирование свободных радикалов, для определения начальной концентрации и антиоксидантной активности соединения в исследуемом образце, предусматривающее фотометрирование реакционной смеси, дополнительно содержащей образец, с момента инициирования фотохимической реакции.

Способ по изобретению может применяться для определения содержания высокорекреационноспособных соединений и соединений с антиоксидантной активностью в клетках, тканях, биологических жидкостях, фармакологических и косметических композициях, пищевых продуктах, напитках, в сырье для пищевой и косметической промышленности.

Каждое из изобретений, описанных в настоящем тексте, может обладать особенностями любой одной или нескольких из своих частных форм осуществления при условии логической и технической совместимости особенностей этих частных форм с особенностями самого изобретения и друг с другом.

Необходимо понимать, что в настоящем тексте способы охарактеризованы только такими признаками, которые достаточны для решения поставленной задачи, реализации назначения и достижения технического результата. Специального упоминания всех без исключения признаков изобретений не требуется, если специалистам и без того очевидно, что в отсутствие оных поставленная задача неразрешима, а назначение не может быть реализовано в полной мере. Тем более не требуется ограничивать обобщенные признаки какими-то конкретными вариантами, если таковые должны быть известны специалистам и/или могут быть подобраны ими по известным правилам.

Как будет понятно специалисту в данной области техники, поставленная выше задача решается за счет всей совокупности признаков способа, при этом ключевая особенность изобретения, от которой зависит получение технического результата, состоит в том, что фотометрирование осуществляют с момента инициирования фотохимической реакции и ведут до того момента, когда накопленных данных становится достаточно для вычисления параметров кинетических уравнений.

До настоящего времени не было известно о том, что результаты фотометрирования подобных смесей с момента инициирования фотохимической реакции согласуются с упрощенной математической моделью, включающей только три кинетических уравнения для реакций образования и элиминирования свободных радикалов. Не было известно, что эти результаты могут быть использованы для определения концентраций компонентов в смеси в любой момент времени и при этом обеспечивается высокая точность определения константы скорости реакции элиминирования свободных радикалов антиоксидантом и начальной концентрации антиоксиданта.

Как было неожиданно обнаружено, концентрации компонентов фотохимической реакции в любой момент времени могут быть удовлетворительным образом описаны с помощью уравнений химической кинетики, характеризующих образование и элиминирование свободных радикалов, причем для описания процесса возникновения свободных радикалов достаточно определить параметры кинетического уравне-

ния для реакции между радикалообразователем и инициатором радикалообразования (или только для реакции распада радикалообразователя в зависимости от химизма реакции), а для описания процесса элиминирования необходимо определить параметры кинетического уравнения для реакции свободных радикалов и активатора хемилюминесценции и для реакции взаимодействия свободных радикалов с антиоксидантом. В случае известности начальных концентраций радикалообразователя (и инициатора радикалообразования) и активатора хемилюминесценции, и известности параметров кинетических уравнений, которые характеризуют образование свободных радикалов, и их элиминирование по реакции взаимодействия с активатором хемилюминесценции, становится возможным определить в какой именно степени влияние исследуемого образца на зависимость интенсивности излучения от времени реакции обусловлено количеством содержащегося в нем антиоксиданта и/или его активностью. Количество антиоксиданта может быть определено с удовлетворительной точностью тогда, когда фотометрирование реакционной смеси осуществляют с момента иницирования фотохимической реакции (а не с запозданием, как это происходит в общепринятых способах фотометрии).

Как будет понятно из вышеизложенного, концентрации компонентов реакционной смеси в разные моменты времени могут быть рассчитаны посредством решения системы дифференциальных уравнений, описывающих три основных процесса: (1) образование свободных радикалов и их элиминирование в конкурирующих реакциях свободных радикалов (2) с активатором хемилюминесценции и (3) с антиоксидантом. Так как начальные концентрации компонентов реакции (1) и (2) известны, параметры соответствующих кинетических уравнений могут быть вычислены известными методами. Задача изобретения состоит в определении значений параметров третьего кинетического уравнения (т.е. реакции свободных радикалов с антиоксидантом), а именно константы скорости реакции и начальной концентрации антиоксиданта в реакционной смеси.

Системы уравнений, описывающих концентрации компонентов, решают численными методами, подбирая такие значения начальной концентрации антиоксиданта и константы скорости реакции между ним и свободными радикалами, которые наилучшим образом согласуются с наблюдаемой зависимостью интенсивности хемилюминесценции от времени реакции.

Образование свободных радикалов в способе можно обеспечить по любой известной реакции при условии, что начальное содержание реагентов известно. Свободные радикалы могут образовываться, например, в результате взаимодействия пероксида водорода (H_2O_2) и ионов металлов с переменной валентностью (Fe, Co), в результате термического разложения соединений (например, 2,2'-азо-бис-амидинопропана и дигидрохлорида 2,2'-азо-бис-2-метилпропанамидамида), в результате облучения соединений ультрафиолетом (см. немецкий патент DE 4304728).

Активатор используют для повышения интенсивности светового излучения (интенсивности свечения) фотохимической реакции. Активатором может быть вещество, обладающее более высоким квантовым выходом, нежели у свободных радикалов. Использование активатора люминесценции многократно увеличивает интенсивность излучения, позволяя определять малые количества свободных радикалов.

Добавление антиоксиданта в реакционную смесь приводит к снижению количества радикалов и соответственно к снижению интенсивности излучения. При определении количества и активности антиоксидантов считают, что интенсивность излучения реакционной смеси прямо соотносится с концентрацией свободных радикалов, а количество свободных радикалов определяется скоростью их образования и элиминирования с участием и без участия антиоксиданта. С учетом этих допущений интенсивность излучения в конце какого-либо периода времени с момента иницирования реакции (концентрацию свободных радикалов) определяется (1) константой скорости реакции радикалообразования (k_R), (2) константой скорости реакции элиминирования свободных радикалов без участия антиоксиданта (то есть пренебрегая остальными процессами, - константу скорости реакции взаимодействия активатора и радикалов k_{Lum}) и (3) константой скорости элиминирования свободных радикалов антиоксидантом k_{In} .

Интенсивность излучения в отсутствие антиоксиданта описывается только процессами (1) и (2). Эта интенсивность пропорциональна скорости реакции (2), описывающей взаимодействие свободных радикалов с активатором люминесценции, так как именно в ней происходит образование электронно-возбужденных продуктов с последующим высвечиванием квантов люминесценции. Константы скоростей обеих реакций k_R и k_{Lum} подбирают численными методами таким образом, чтобы расчетная зависимость наилучшим образом соответствовала экспериментальной зависимости с учетом заранее известной начальной концентрации источника свободных радикалов $[AR]_0$ и активатора люминесценции $[Lum]_0$.

Как показано на фиг. 1 экспериментальная зависимость интенсивности светового излучения от времени реакции в отсутствие антиоксиданта представляет собой двухфазную кривую, состоящую из фазы роста интенсивности, связанной с увеличением скорости образования радикалов, и фазы падения интенсивности, связанной с уменьшением концентрации источника радикалов (инициатора радикалообразования) или активатора люминесценции. Для описания такой двухфазной кинетики достаточно двух химических реакций, при этом для любого варианта кинетики существует только один набор значений констант скоростей этих реакций. Таким образом, значения констант скоростей реакции (1) и (2) в отсутствие антиоксиданта могут быть однозначным образом установлены экспериментально по определенной зависимости интенсивности излучения от времени реакции.

В присутствии антиоксиданта зависимость интенсивности светового излучения от времени реакции меняется и для удовлетворительного предсказания концентрации компонентов реакции в реакционной смеси в любой момент времени необходимо учитывать влияние реакции (3) на скорость реакции (2) и наблюдаемую интенсивность излучения (фиг. 2). Для этого необходимо определить начальную концентрацию антиоксиданта $[In]_0$ и константу скорости реакции взаимодействия антиоксиданта с радикалом k_{In} . Расчетное значение начальной концентрации антиоксиданта $[In]_0$ характеризует абсолютное количество свободных радикалов, с которыми может связаться антиоксидант из исследуемого образца, а расчетное значение константы скорости реакции k_{In} характеризует количество свободных радикалов, которое связывается антиоксидантом при его концентрации в растворе 1 моль/л (т.е. k_{In} является мерой антиоксидантной активности исследуемого образца).

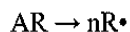
Активатор и антиоксидант в реакциях (2) и (3) конкурируют между собой за свободные радикалы. Как показано на фиг. 2, "сильные" антиоксиданты с k_{In} намного больше k_{Lum} успевают полностью перехватить свободные радикалы до того, как они успевают прореагировать с активатором, чем обусловлено практически полное подавление хемилюминесценции в начальный период реакции, которое называется "латентный период" (фиг. 2, значение "10000"). После того как антиоксидант полностью прореагирует со свободными радикалами, латентный период быстро сменяется крутым ростом интенсивности излучения. "Слабые" антиоксиданты с k_{In} близкими k_{Lum} не способны прореагировать со всеми или с большей частью радикалов до того, как они прореагируют с активатором, поэтому в начальный период наблюдается только незначительное снижение интенсивности свечения без латентного периода (фиг. 2, значение "20").

Начальная концентрация антиоксиданта определяет длительность периода, в течение которого сохраняется влияние антиоксиданта, на зависимость интенсивности светового излучения от времени реакции. Изменение начальной концентрации "сильного" антиоксиданта приводит к изменению длительности латентного периода (фиг. 3), между тем влияние "слабого" антиоксиданта сохраняется в течение длительного периода времени и проявляется в изменении степени подавления интенсивности свечения (фиг. 4). Несмотря на то что в настоящем тексте рассмотрены только крайние случаи, относящиеся к "сильным" и "слабым" антиоксидантам, безусловно, существуют промежуточные варианты, характеризующиеся смешанным влиянием (фиг. 7).

Из вышесказанного следует, что начальная концентрация и константа скорости реакции по-разному влияют на реакцию (2), для любой зависимости интенсивности светового излучения реакционной смеси от времени реакции в присутствии антиоксиданта существует одно и только одно сочетание значений начальной концентрации антиоксиданта $[In]_0$ и константы скорости реакции взаимодействия между антиоксидантом и свободным радикалом k_{In} . Именно поэтому указанные параметры могут быть однозначным образом определены по экспериментальной зависимости интенсивности светового излучения реакционной смеси от времени реакции.

Возможность охарактеризовать влияние антиоксиданта на кинетику хемилюминесценции единственным кинетическим уравнением для реакции антиоксиданта с радикалом позволяет характеризовать антиоксидантные свойства независимо от конкретного механизма реакции свободнорадикального процесса.

Сказанное выше нуждается в некоторых пояснениях, касающихся отдельных ситуаций. Во-первых, существуют системы генерации радикалов, в которых исходное количество источника радикалов не соответствует общему количеству образовавшихся радикалов. Например, одна молекула источника радикалов может распадаться на несколько радикалов или, наоборот, один радикал образуется из нескольких молекул источника. Для таких случаев в реакции генерации радикалов (1) следует использовать стехиометрический коэффициент n , отражающий количество радикалов, образующихся из одной молекулы источника радикалов AR



Стехиометрический коэффициент n может принимать любые положительные значения, в том числе дробные. Использование неправильного значения стехиометрического коэффициента или его отсутствие там, где это необходимо, будет приводить к ошибочному количественному определению антиоксидантов.

При этом предполагается, что антиоксидант действует однократно и после взаимодействия с радикалом полностью утрачивает способность связывать свободные радикалы (т.е. инактивируются). Многие известные антиоксиданты действуют именно таким образом.

Перечень чертежей

Фиг. 1 - зависимость интенсивности хемилюминесценции от времени реакции без антиоксиданта при различных соотношениях констант скоростей реакций k_R и k_{Lum} (цифры возле графиков);

фиг. 2 - зависимость интенсивности хемилюминесценции от времени реакции в присутствии антиоксиданта в реакционной смеси при различных значениях константы скорости реакции k_{In} (цифры возле графиков);

фиг. 3 - влияние начальной концентрации "сильного" антиоксиданта $[In]_0$ (цифры возле графиков) на зависимость интенсивности хемилюминесценции от времени реакции;

фиг. 4 - влияние начальной концентрации "слабого" антиоксиданта $[In]_0$ (цифры возле графиков) на зависимость интенсивности хемилюминесценции от времени реакции;

фиг. 5-10 - показано влияние антиоксидантов тролокса (фиг. 5 и 6), токоферола (фиг. 7 и 8) и мексидола (фиг. 9 и 10) на зависимость интенсивности хемилюминесценции от времени реакции (фиг. 5, 7 и 9 - эксперимент; фиг. 6, 8 и 10 - результаты математического моделирования). Начальная концентрация антиоксиданта в мМ указана цифрами возле графиков.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Нижеследующие примеры даются только для иллюстрации принципов, положенных в основу способа по изобретению; ничто в настоящем разделе не должно быть истолковано как ограничение объема притязаний.

Для определения прогностической способности описанного в настоящем тексте способа изучали влияние трех антиоксидантов, тролокса, токоферола и мексидола на хемилюминесценцию системы H_2O_2 -CytC (цитохром C). Результаты эксперимента, в частности кривые зависимости интенсивности светового излучения реакционных смесей от времени реакции, представлены на фиг. 5, 7 и 9.

В отсутствие антиоксиданта кривая интенсивности светового излучения реакционной смеси представляет собой двухфазную кривую, состоящую из быстрой фазы нарастания интенсивности свечения и медленной фазы снижения интенсивности свечения. Добавление антиоксидантов в реакционные смеси вызывает уменьшение интенсивности хемилюминесценции, зависящее от начальной концентрации антиоксиданта. При этом, как следует из сравнения фиг. 5, 7 и 9, характер влияния антиоксиданта на вид кривых, характеризующих зависимость интенсивности излучения от времени реакции, для исследованных антиоксидантов оказывается различным.

Как показано на фиг. 5, добавление тролокса в радикалгенерирующую систему H_2O_2 -CytC приводит к практически полному подавлению хемилюминесценции в начале реакции, т.е. к появлению латентного периода. При этом длительность латентного периода тем выше, чем выше начальная концентрация тролокса.

Как показано на фиг. 9, добавление мексидола в радикалгенерирующую систему H_2O_2 -CytC приводит к неполному подавлению хемилюминесценции в течение всего периода наблюдения. Степень подавления хемилюминесценции пропорциональна начальной концентрации мексидола.

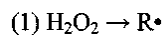
Как показано на фиг. 7, добавление токоферола к радикалгенерирующей системе H_2O_2 -CytC приводит к эффекту, который можно охарактеризовать, как сочетание эффектов, достигаемых при добавлении тролокса и мексидола.

Из этого следует, что разные по химической природе антиоксиданты по-разному влияют на вид кривых хемилюминесценции, что не позволяет применять какой-либо универсальный геометрический параметр в качестве характеристики количества или активности антиоксидантов различной химической природы.

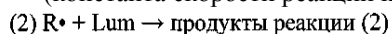
Именно поэтому предшествующие методики, основанные на измерении длительности латентного периода, степени подавления интенсивности свечения или угла наклона начального участка кривой хемилюминесценции, не позволяют получить сравнимые показатели активности антиоксидантов различной химической природы, даже если такую активность выражают в единицах активности эталонного антиоксиданта.

Как показано на фиг. 6, 8 и 10 параметры кинетических уравнений, удовлетворительным образом объясняющие форму экспериментальной кривой хемилюминесценции, могут быть подобраны численными методами для всех описанных выше примеров.

Форму кривой хемилюминесценции в отсутствие антиоксиданта моделируют двумя химическими реакциями, в которых происходит образование свободных радикалов ($R\cdot$) из пероксида водорода (H_2O_2) и их взаимодействие с люминолом (Lum):

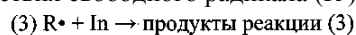


(константа скорости реакции k_R)



(константа скорости реакции k_{Lum})

Форму кривой хемилюминесценции в присутствии антиоксиданта моделируют с учетом того, что в реакционной смеси, параллельно со второй реакцией свободных радикалов с люминолом дополнительно протекает третья реакция взаимодействия свободного радикала ($R\cdot$) с антиоксидантом (In):



(константа скорости реакции k_{In})

В описанных выше примерах начальные значения концентраций пероксида водорода, люминола и антиоксидантов были известны заранее: $[H_2O_2]_0=10$ мкМ, $[Lum]_0=25$ мкМ. Концентрация $[In]_0$ указана числами возле соответствующих кривых на фиг. 4-9.

Расчетные значения констант скоростей реакции (1) и (2) в отсутствие антиоксиданта составили $k_R=0,04\pm 0,01$ мкМ/мин, $k_{Lum}=0,05\pm 0,01$ мкМ/мин. Расчетные значения константы скорости реакции k_{In} между антиоксидантом и свободным радикалом (реакции 3) составили 60 ± 10 мкМ/мин для тролокса,

$2 \pm 0,5$ мкМ/мин для токоферола и $0,04 \pm 0,01$ мкМ/мин для мексидола. Расчетные данные согласуются с реальными.

Таким образом, из вышеизложенного следует, что предложенный способ позволяет определять действительную начальную концентрацию антиоксиданта в реакционной смеси.

Кроме того, как следует из сравнения фиг. 5, 7 и 9, значение константы скорости реакции взаимодействия антиоксиданта с радикалом может быть использовано в качестве универсальной меры антиоксидантной активности любого вещества, независимо от их химической природы. Константа скорости реакции позволяет удовлетворительным образом предсказать характер влияния антиоксиданта с известной начальной концентрацией на протекание свободнорадикальных процессов, в частности позволяет рассчитать период защитного действия, степень окисленности компонентов реакционной смеси в зависимости от длительности свободнорадикального процесса и т.п.

Вышеприведенное описание следует толковать лишь как иллюстративное, не претендующее на описание всех и/или каждого из возможных вариантов выполнения или осуществления изобретений, ибо такое описание было бы невыполнимым.

Вышеописанные изобретения можно воплотить и/или осуществить на практике различными способами, в том числе посредством замены их (изобретений) существенных признаков уже известными эквивалентами или эквивалентами, которые станут известны в будущем. При этом вновь создаваемые эквивалентные решения будут оставаться под охраной нижеприведенной формулы изобретения.

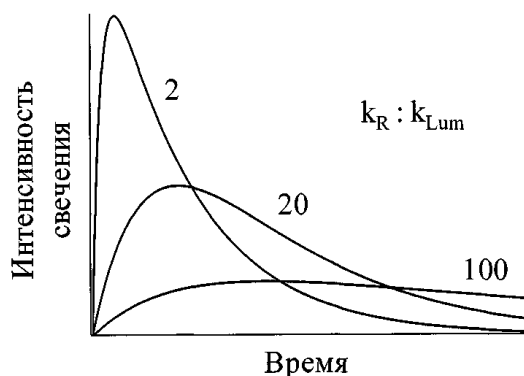
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения количества и/или активности антиоксиданта в исследуемом образце, в котором фотометрируют реакционную смесь с известными начальными концентрациями источника свободных радикалов ($[AR]_0$) и активатора хемилюминесценции ($[Lum]_0$) с момента инициирования реакции, по зависимости интенсивности светового излучения упомянутой смеси от времени реакции вычисляют константу скорости реакции образования свободных радикалов (k_R) и константу скорости реакции элиминирования свободных радикалов при их взаимодействии с упомянутым активатором (k_{Lum}), готовят реакционную смесь, содержащую антиоксидант, с известной $[AR]_0$ и $[Lum]_0$, фотометрируют упомянутую смесь с момента инициирования реакции и с учетом известных $[AR]_0$ и $[Lum]_0$, k_R и k_{Lum} по изменению интенсивности светового излучения реакционной смеси в зависимости от длительности периода времени, прошедшего с момента инициирования реакции, вычисляют начальную концентрацию антиоксиданта $[In]_0$ и константу скорости реакции взаимодействия свободных радикалов и антиоксиданта (k_{In}).

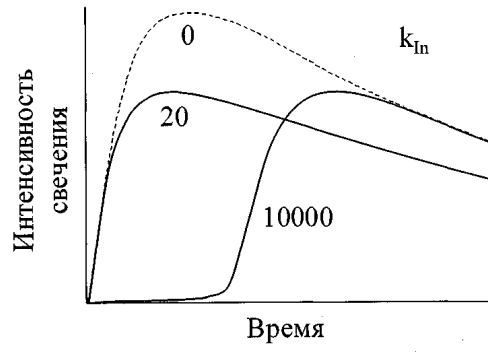
2. Способ по п.1, в котором интенсивность хемилюминесценции определяют посредством фотометра, флуориметра, спектрофотометра, спектрофлуориметра или хемилюминометра.

3. Способ по п.1, в котором при осуществлении фотометрии реакционную смесь термостатируют.

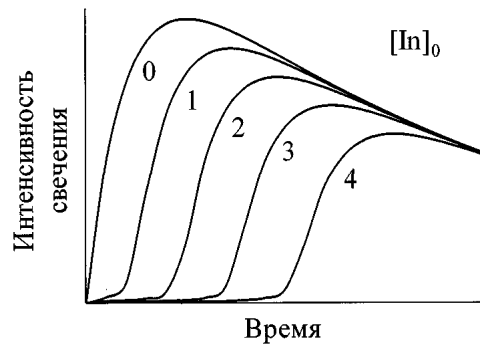
4. Способ по п.1, в котором в качестве активатора хемилюминесценции используют вещество с высоким квантовым выходом, предпочтительно люминол, люцигенин, 9,10-дибромантрацен, Eu^{3+} -тетрациклин, хлорофилл а, протопорфирин-IX, бактериофеофорбид, мезотетрафенилпорфирин, родамин Ж, хинолизин-кумарины.



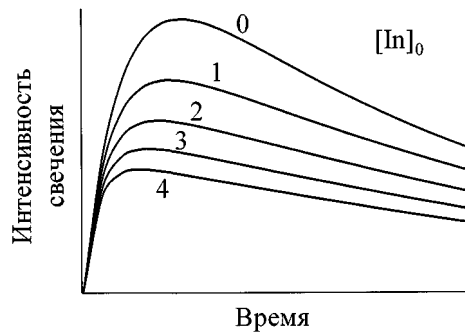
Фиг. 1



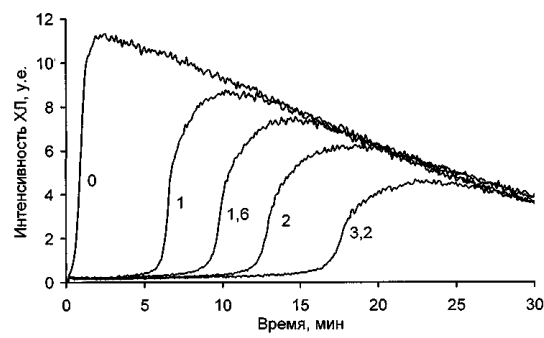
Фиг. 2



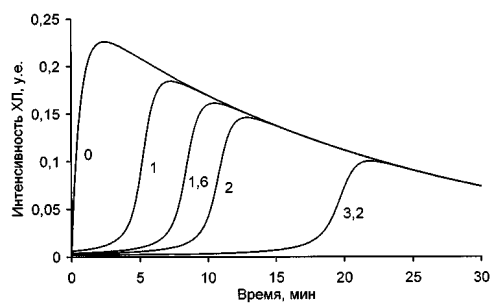
Фиг. 3



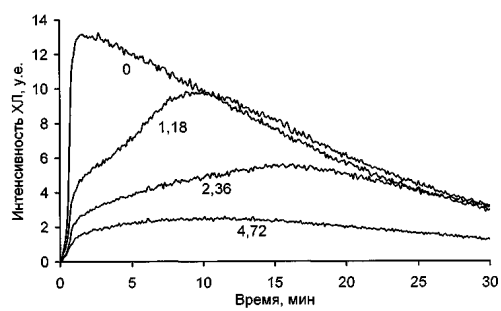
Фиг. 4



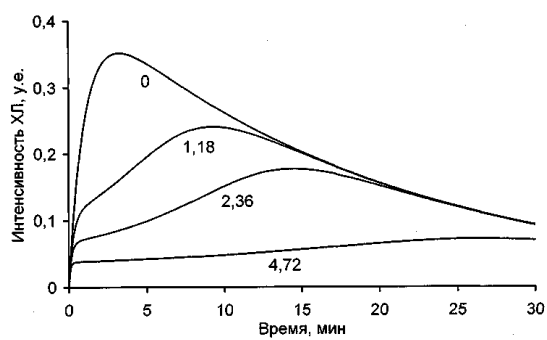
Фиг. 5



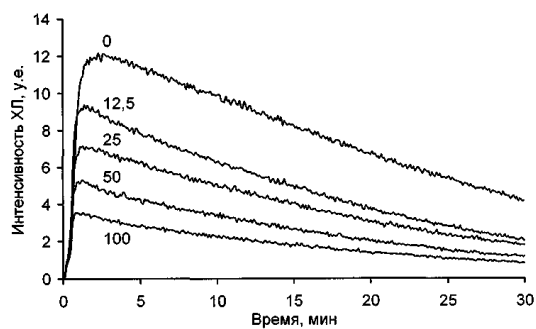
Фиг. 6



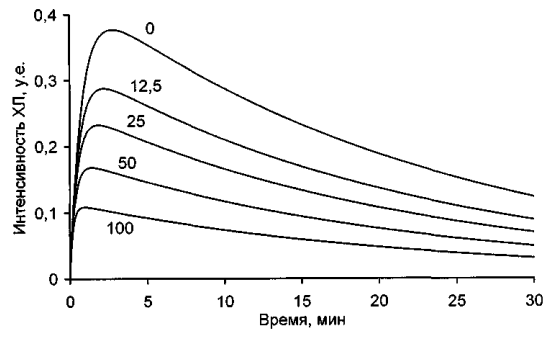
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

