

ИНГИБИРОВАНИЕ РЕАКЦИЙ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ В СИСТЕМЕ ФЕНТОНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФЛАВОНОИДОВ

Е.И. Тарун, Е.В. Чудновская*

*Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова, г. Минск,
Республика Беларусь ktarun@tut.by*

**Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

Введение

Избыточная концентрация свободных радикалов в организме является центральным фактором риска сердечно-сосудистых, онкологических заболеваний и других патологий. Необходимость коррекции заболеваний, в которых важную роль играет свободно-радикальное окисление, определяет актуальность поиска перспективных средств антиоксидантной фармакотерапии [1–4]. Для коррекции патологических состояний и в профилактических целях рекомендуют лечебные средства. Очевидно, что направленное использование таких препаратов требует контроля их антиоксидантной активности. Метод определения антиоксидантной активности (АО) по отношению к активированным формам кислорода (АФК) является одним из наиболее применяемых в настоящее время [5–6]. Он основан на измерении интенсивности флуоресценции окисляемого соединения и ее уменьшении под воздействием АФК. В настоящей работе для детектирования свободных радикалов использован флуоресцеин, обладающий высоким коэффициентом экстинкции и близким к 1 квантовым выходом флуоресценции. Генерирование свободных радикалов осуществляли, используя систему Фентона, в которой образуются гидроксильные радикалы при взаимодействии комплекса железа (Fe^{2+}) с этилендиаминтетрауксусной кислотой (EDTA) и пероксида водорода [7–8].

В качестве ингибиторов радикальных процессов выбраны кверцетин, рутин, гесперидин, силибин, силимарин и эпикатехин – природные флавоноиды, обладающие сильными антиоксидантными свойствами (рисунок 1) [9–14]. Представляет интерес сравнение активности различных по строению флавоноидов для выявления вклада отдельных функциональных групп при связывании свободных радикалов, а также исследование их активности в различных биологических жидкостях. Известно, что кверцетин, рутин и гесперидин содержатся во многих фруктах и овощах. Эпикатехин содержится в яблочном соке и зеленом чае [15]. Поэтому в качестве тестируемых биологических жидкостей были взяты яблочный и апельсиновый сок и растворы зеленого чая.

Целью данной работы было определение и сравнение антиоксидантной активности шести флавоноидов разной структуры – кверцетина, рутина, гесперидина, силибина, силимарина и эпикатехина, а также определение и сравнение антиоксидантной активности кверцетина, рутина, гесперидина и эпикатехина, содержащихся в биологических жидкостях – фруктовых соках и зеленом чае.

Методы исследования

Реагенты. Использовали соль Мора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Fe^{2+}), пероксид водорода (H_2O_2) фирмы «Реахим» (Россия), флуоресцеин, этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), кверцетин, рутин, гесперидин, силибин, силимарин и эпикатехин фирмы «Sigma» (США).

Использовали зеленый китайский чай «Greenfield» фирмы «Greenfield Tea Ltd.» (Англия), зеленый цейлонский чай «St. Clair's» фирмы «Маскалия Тиа Гарденс Цейлон Лтд.» (Шри-Ланка), зеленый цейлонский чай «Dilmah» фирмы «MYF Teass (Pvt) Ltd.» (Шри-Ланка), зеленый китайский чай «Longjing Green Tea» фирмы «Лунцзин» (Китай).

Растворы соли Мора, H_2O_2 , EDTA и флуоресцеина готовили в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 7,4. Исходные растворы кверцетина, рутина, силибинина, силимарина и эпикатехина готовили в диметилформамиде (ДМФ). Исходный раствор гесперидина готовили в этиловом спирте.

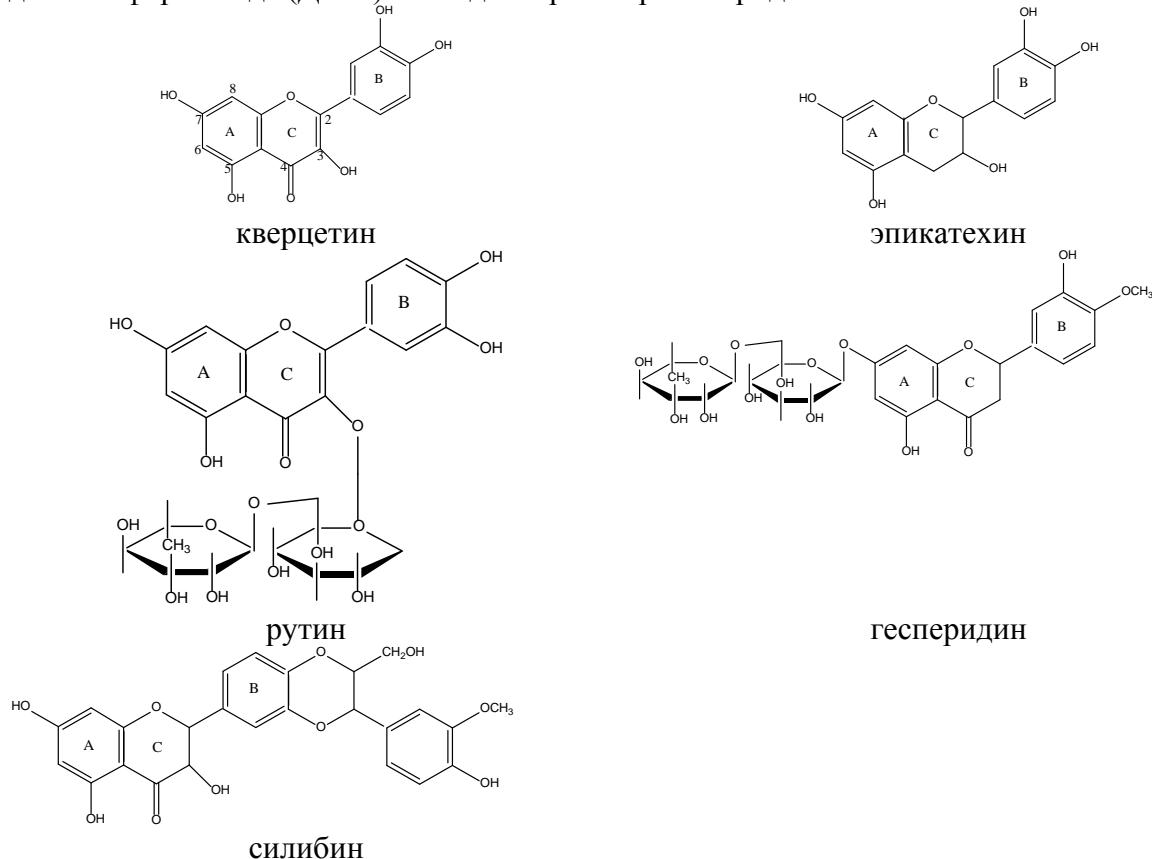


Рисунок 1 – Структурные формулы флавоноидов

Приготовление разведений яблочного сока. Содержание свежевыжатого яблочного сока принимали за 100%. Делали ряд разведений яблочного сока: в 2, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 и 10000 раз. Выражали содержание сока в полученных разведениях в %: 100; 50; 20; 10; 2; 1; 0,2; 0,1; 0,01%. Концентрации яблочного сока в пробе уменьшались в 10 раз и составляли: 10; 5; 2; 1; 0,2; 0,1; 0,02; 0,01; 0,001%.

Разведения апельсинового сока проводили аналогичным образом.

Приготовление раствора зеленого чая. Взвешивали 2 г зеленого чая и вносили в колбу на 50 мл. Заливали листья чая 20 мл кипяченой воды (100°C). Закрывали колбу и выдерживали 5 мин. Отфильтровывали раствор чая и делали ряд разведений: в 2, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 раз. Концентрацию исходного раствора чая принимали за 100%. Концентрации полученных разведений составляли: 100; 50; 20; 10; 2; 1; 0,2; 0,1; 0,02; 0,01%. Концентрации раствора зеленого чая в пробе уменьшались в 10 раз и составляли: 10; 5; 2; 1; 0,2; 0,1; 0,02; 0,01; 0,002; 0,001%.

Методика определения антиоксиданта и кверцетина.

Общий объем пробы, помещаемый в кювету составлял 2 мл. В кювету вносили 0,02 мл флуоресцеина ($2 \cdot 10^{-6}$ М) и 1,98 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера. Прописывали спектр. Полученное значение пика флуоресценции принимали за 100%.

В кювету вносили 0,02 мл флуоресцеина ($2 \cdot 10^{-6}$ М), 0,2 мл Fe^{2+} с ЭДТА (10^{-3} М), 1,58 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера и 0,2 мл пероксида водорода (10^{-2} М). При взаимодействии Fe^{2+} с H_2O_2 (система Фентона) образующиеся радикалы подавляли свечение флуоресцеина. Полученное значение пика флуоресценции принимали за минимальное.

В кювету вносили 0,02 мл флуоресцеина ($2 \cdot 10^{-6}$ М), 0,2 мл Fe^{2+} с ЭДТА (10^{-3} М), 0,2 мл кверцетина (10^{-8} – $2 \cdot 10^{-3}$ М) и 1,38 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера. Реакцию начинали

добавлением 0,2 мл пероксида водорода (10^{-2} М). Конечные концентрации: флуоресцеин – $2 \cdot 10^{-8}$ М, Fe^{2+} – 10^{-4} М, ЭДТА – 10^{-4} М, H_2O_2 – 10^{-3} М, кверцетин – 10^{-9} – $2 \cdot 10^{-4}$ М. Полученные значения пиков флуоресценции выражали в процентах, принимая за 100% флуоресценцию раствора без Fe^{2+} , ЭДТА, кверцетина и пероксида водорода.

Активность рутин, гесперидина, силибина, силимарина и эпикатехина определяли аналогичным образом. При этом исходные концентрации флавоноидов составляли: рутин – 10^{-8} – 10^{-3} М, гесперидин – 10^{-8} – 10^{-3} М, силибин – 10^{-8} – 10^{-2} М, силимарин – 10^{-8} – 10^{-2} М, эпикатехин – 10^{-8} – 10^{-2} М. Конечные концентрации флавоноидов в пробе составляли: рутин – 10^{-9} – 10^{-4} М, гесперидин – 10^{-9} – 10^{-4} М, силибин – 10^{-9} – 10^{-3} М, силимарин – 10^{-9} – 10^{-3} М, эпикатехин – 10^{-9} – 10^{-3} М.

Методика определения общей антиоксидантной активности яблочного сока (ОАА). В кювету вносили 0,02 мл флуоресцеина ($2 \cdot 10^{-6}$ М), 0,2 мл Fe^{2+} с ЭДТА (10^{-3} М), 0,2 мл яблочного сока (0,01–100%) и 1,38 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера. Реакцию начинали добавлением 0,2 мл пероксида водорода (10^{-2} М). Конечные концентрации: флуоресцеин – $2 \cdot 10^{-8}$ М, Fe^{2+} – 10^{-4} М, ЭДТА – 10^{-4} М, H_2O_2 – 10^{-3} М, яблочный сок – 0,001–10%. Полученные значения пиков флуоресценции выражали в процентах, принимая за 100% флуоресценцию раствора без Fe^{2+} , ЭДТА, яблочного сока и пероксида водорода.

Активности апельсинового сока определяли аналогичным образом.

Методика определения ОАА зеленого чая.

В кювету вносили 0,02 мл флуоресцеина ($2 \cdot 10^{-6}$ М), 0,2 мл Fe^{2+} с ЭДТА (10^{-3} М), 0,2 мл раствора зеленого чая (0,01–100%) и 1,38 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера. Реакцию начинали добавлением 0,2 мл пероксида водорода (10^{-2} М). Конечные концентрации: флуоресцеин – $2 \cdot 10^{-8}$ М, Fe^{2+} – 10^{-4} М, ЭДТА – 10^{-4} М, H_2O_2 – 10^{-3} М, раствор зеленого чая – 0,001–10%. Полученные значения пиков флуоресценции выражали в процентах, взяв за 100% флуоресценцию раствора без Fe^{2+} , ЭДТА, раствора зеленого чая и пероксида водорода.

Измерения флуоресценции проводили на флуориметре RF-5301 PC («Shimadzu», Япония). Регистрировали интенсивность флуоресценции на длине волн 514 нм. Длина волны возбуждения – 490 нм.

Результаты и обсуждение

Для исследования ингибирования реакций свободных радикалов, генерируемых в системе Фентона, выбраны кверцетин, рутин, гесперидин, силибин, силимарин и эпикатехин (рисунок 1). Для всех флавоноидов получены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации флавоноидов.

На рисунке 2 показана зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации гесперидина (1), рутина (2) и кверцетина (3).

Положительный эффект при добавлении всех флавоноидов проявлялся при концентрации 10^{-9} М. При увеличении концентрации флавоноидов наблюдалось подавление действия свободных радикалов. Гесперидин показал максимальное восстановление интенсивности флуоресценции флуоресцеина до 98,2% при наименьшей концентрации (10^{-6} М) по сравнению с двумя другими флавоноидами. Рутин также оказался очень сильным антиоксидантом. Он подавлял действие свободных радикалов на 98,7%. Однако при этом его концентрация была на порядок выше, чем у гесперидина – 10^{-5} М. Кверцетин показал более слабые антиоксидантные способности. Он восстанавливал интенсивность флуоресценции флуоресцеина до 71%. При этом его концентрация была выше, чем у рутина – $5 \cdot 10^{-5}$ М. При избытке концентрации кверцетина и рутина наблюдается снижение их активности. При высоких концентрациях флавоноидов радикальные продукты их окисления могут взаимодействовать с флуоресцеином и снижать его флуоресценцию. Наиболее реакционноспособными являются феноксильные радикалы, образующиеся при окислении НО-групп, находящихся в *мета*-положении друг к другу. Такие группы имеются в кольце A у кверцетина и рутина, но их нет у гесперидина. Это объясняет значительное уменьшение флуоресценции флуоресцеина при высоких концентрациях кверцетина и рутина. Для

гесперидина такого эффекта не наблюдается. Увеличение его концентрации не приводит к уменьшению флуоресценции флуоресцеина.

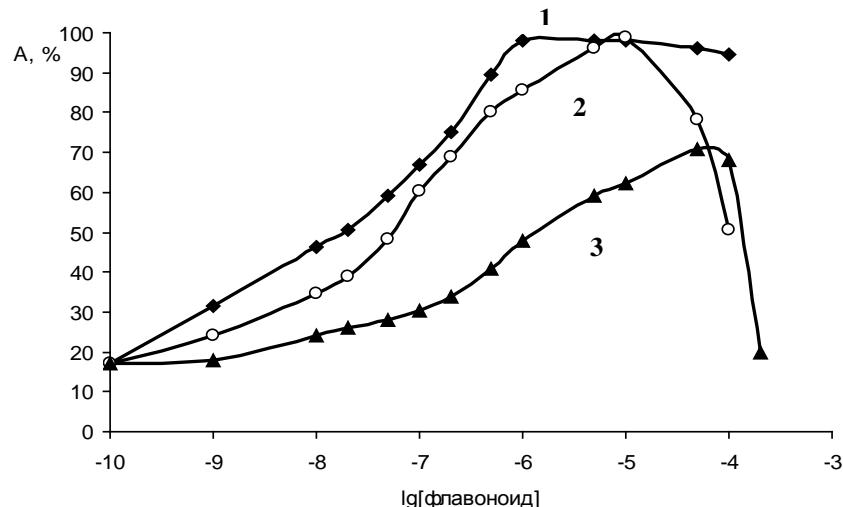


Рисунок 2 – Зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации гесперидина (1), рутина (2) и кверцетина (3)

На рисунке 3 показана зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации силибина (1), силимарина (2) и эпикатехина (3).

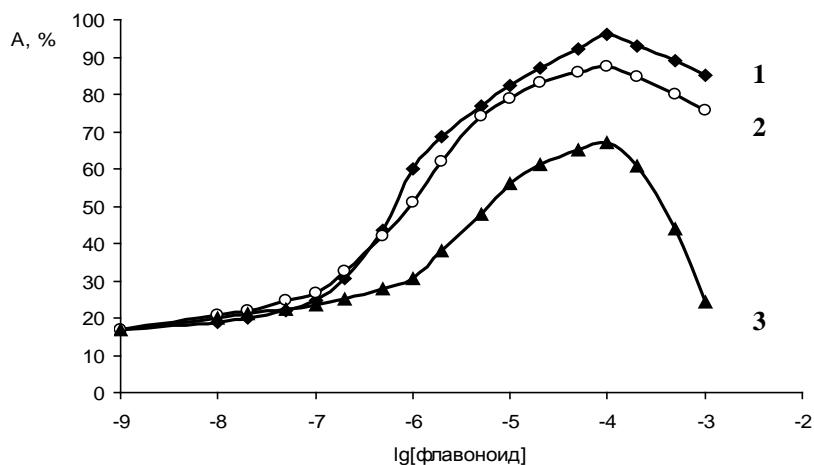


Рисунок 3 – Зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации силибина (1), силимарина (2) и эпикатехина (3)

Положительный эффект при добавлении всех флавоноидов проявлялся при концентрации 10^{-8} М, что на порядок выше, чем у гесперидина, рутина и кверцетина. При увеличении концентрации флавоноидов наблюдалось подавление действия свободных радикалов. Силибин показал высокие антиоксидантные способности. Он подавлял действие свободных радикалов на 96,2%. Это близко к аналогичным показателям для гесперидина и рутина. Однако при этом его концентрация (10^{-4} М) была на два порядка выше, чем у гесперидина и на порядок выше, чем у рутина, что говорит о его более слабых антиоксидантных способностях, чем у гесперидина и рутина. Силимарин восстанавливал интенсивность флуоресценции флуоресцеина до 87,5%. Кривая зависимости силимарина практически повторяет зависимость для силибина. Это объясняется тем, что силимарин на 80% состоит из силибина. Эпикатехин показал наиболее слабые антиоксидантные способности. Он восстанавливал интенсивность флуоресценции флуоресцеина до 67%.

Кривая зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина от логарифма концентрации эпикатехина близка к аналогичной зависимости для кверцетина, что объясняется схожими структурами этих флавоноидов. При повышении концентрации силибина, силимарина и эпикатехина выше 10^{-4} М наблюдается снижение их активности, что также как и в случае с рутином и кверцетином можно объяснить взаимодействием радикальных продуктов их окисления с флуоресцеином и снижением его флуоресценции. В состав кольца А силибина и эпикатехина также входят НО-группы, находящиеся в *мета*-положении друг к другу, при окислении которых образуются реакционноспособные феноксильные радикалы.

Основным показателем, характеризующим ингибиторную способность, является IC_{50} – концентрация антиоксидантов, при которой достигается 50% ингибирование свободных радикалов. В таблице 1 приведены значения IC_{50} для флавоноидов (гесперидина, рутина, силибина, силимарина, эпикатехина и кверцетина), полученные из графиков зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина от логарифма концентрации антиоксидантов.

Таблица 1 – Показатели антиоксидантной активности флавоноидов

Флавоноиды	IC_{50} , М	A_{max} , %	C_{max} , М
гесперидин	$2 \cdot 10^{-8}$	98,2	10^{-6}
рутин	$6,3 \cdot 10^{-8}$	98,7	10^{-5}
силибин	$6,3 \cdot 10^{-7}$	96,2	10^{-4}
кверцетин	10^{-6}	71	$5 \cdot 10^{-5}$
силимарин	10^{-6}	87,5	10^{-4}
эпикатехин	$6 \cdot 10^{-6}$	67	10^{-4}

Примечание: A_{max} – интенсивность флуоресценции, соответствующая максимальному ингибированию свободных радикалов, выраженная в %; C_{max} – концентрация антиоксиданта, при которой достигается максимальное ингибирование реакций свободных радикалов.

Гесперидин оказался лучшим ингибитором свободных радикалов. Близкое к нему значение IC_{50} имеет рутин. Представляет интерес сравнение этих флавоноидов с кверцетином. Рутин и кверцетин близки по своему химическому строению, однако рутин отличается от кверцетина наличием в своей молекуле гликозидного фрагмента. Гесперидин также имеет гликозидный фрагмент в своей структуре. У кверцетина показатель IC_{50} оказался на два порядка выше, что говорит о его более низких ингибирующих способностях. Очевидно, это может быть связано с наличием гликозидной части у рутина и гесперидина, OH-группы которой также могут связывать свободные радикалы. Рутин и гесперидин восстанавливали флуоресценцию флуоресцеина практически до 100%. Концентрация, при которой достигалось максимальное ингибирование свободных радикалов, у гесперидина была на порядок ниже, чем у рутина, что также говорит о его более сильных ингибиторных свойствах. Очевидно, это обусловлено положением гликозидного фрагмента. У гесперидина он расположен в положении 7 кольца А, а у рутина – в положении 3 кольца С.

Силибин имеет IC_{50} на порядок выше, чем у рутина и гесперидина, однако ниже, чем у кверцетина. Положение OH-групп в кольцах А и С кверцетина и силибина одинаковы. Эти два флавоноида различаются заместителями в кольце В. У кверцетина в кольце В есть две OH-группы, расположенные в *ортоположении* относительно друг друга. У силибина в кольце В есть заместители, также имеющие OH-группы. Очевидно, расположение этих групп влияет на связывание свободных радикалов.

IC_{50} эпикатехина в 6 раз выше, чем у кверцетина. Это подтверждает его самые слабые ингибиторные способности по сравнению с другими флавоноидами. Эпикатехин и кверцетин имеют одинаковое число и расположение OH-групп. Эпикатехин отличается от кверцетина отсутствием карбонильной группы в 4-ом положении кольца С и двойной связи между 2 и 3 углеродными атомами кольца С. Однако, у силибина и силимарина также отсутствует двойная связь между 2 и 3 углеродными атомами кольца С. Таким образом, можно

предположить, что именно отсутствие карбонильной группы в 4-ом положении кольца С существенно снижает антиоксидантную способность эпикатехина.

Кверцетин, рутин и гесперидин содержаться во многих фруктах и овощах. Эпикатехин в большом количестве обнаружен в яблочном соке и зеленом чае. Представляло интерес определить активность этих флавоноидов в таких биологических жидкостях, как фруктовые соки и раствор зеленого чая.

На рисунке 4 показана зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации раствора яблочного сока (1) и апельсинового сока (2).

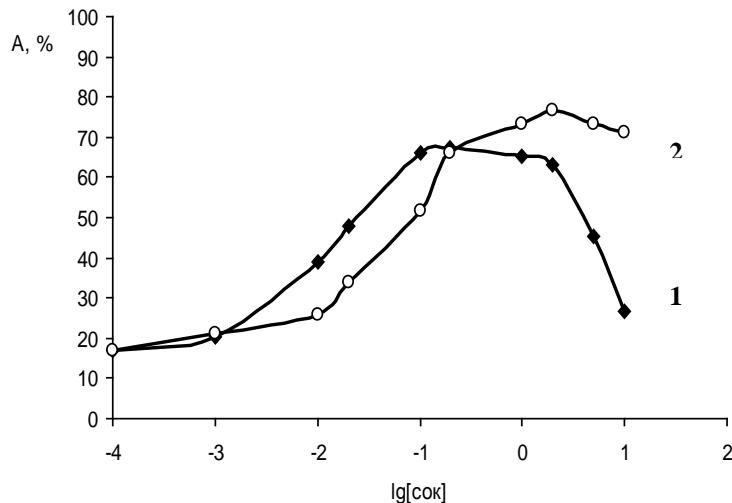


Рисунок 4 – Зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации раствора яблочного сока (1) и апельсинового сока (2)

Положительный эффект при добавлении соков наблюдается при их концентрации 0,01%, что соответствует разведению в 10^4 раз. Флавоноиды, содержащиеся в яблочном соке, восстанавливают интенсивность свечения флуоресцеина до 67,5% при концентрации раствора сока 0,2%, что соответствует разведению сока в 500 раз. Увеличение концентрации раствора сока выше 2% (разведение сока в 50 раз) приводит к снижению активности флавоноидов. Отмечая сходство этого графика с аналогичными зависимостями, полученными для кверцетина, рутина и эпикатехина, можно предположить, что яблочный сок содержит в больших количествах именно эти флавоноиды.

Флавоноиды, содержащиеся в апельсиновом соке, восстанавливают интенсивность свечения флуоресцеина до 76,8% при концентрации раствора сока 2% (разведение сока в 50 раз). Увеличение концентрации сока до 10% приводит к незначительному снижению активности флавоноидов. Отмечая сходство этого графика с аналогичной зависимостью, полученной для гесперидина, можно предположить, что апельсиновый сок содержит в больших количествах именно этот флавоноид.

Активность флавоноидов в яблочном и апельсиновом соке достаточно высока и достигает максимума при очень больших разведениях соков, что говорит об их большой концентрации в этих продуктах. Активность гесперидина, рутина и кверцетина в соках ниже, чем в чистых растворах.

Так как зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина от логарифма концентрации гесперидина и апельсинового сока аналогичны, можно предположить, что концентрация гесперидина, при которой наблюдается его максимальная активность (10^{-6} М), будет совпадать с максимумом его активности в растворе сока (2%). Исходя из этого, можно предположить, что 100% апельсиновый сок содержит $5 \cdot 10^{-5}$ М гесперидина.

Листья зеленого чая содержат эпикатехин. Для определения активности эпикатехина были взяты четыре сорта зеленого чая: зеленый китайский чай «Greenfield», зеленый

цейлонский чай «St. Clair's», зеленый цейлонский чай «Dilmah», зеленый китайский чай «Longjing Green Tea».

На рисунке 5 показана зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации раствора зеленого чая «St. Clair's» (1), «Dilmah» (2), «Greenfield» (3) и «Longjing Green Tea» (4).

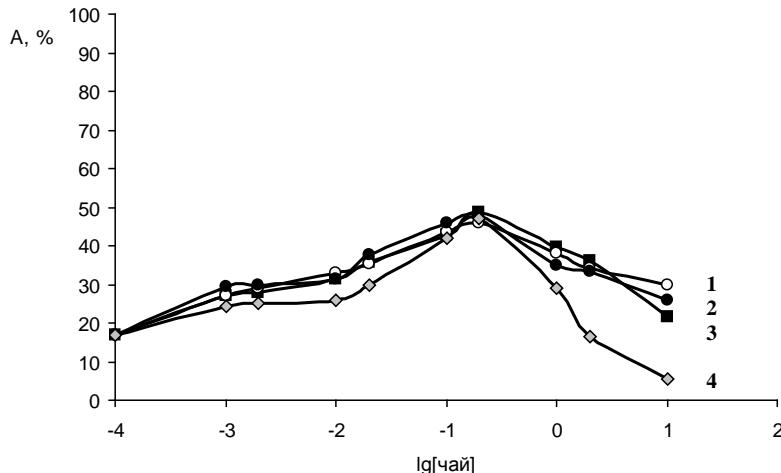


Рисунок 5 – Зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации раствора зеленого чая «St. Clair's» (1), «Dilmah» (2), «Greenfield» (3) и «Longjing Green Tea» (4)

Эпикатехин начинает проявлять антиоксидантную активность в растворах чая при их концентрации 0,001% (разведение в 10^5 раз). Максимальная активность эпикатехина для всех сортов чая достигается при концентрации раствора чая 0,2% (разведение в 500 раз). При этом интенсивность флуоресценции примерно одинакова. Самую высокую активность показал эпикатехин, содержащийся в китайском зеленом чае «Greenfields» – 48,6%. Активность эпикатехина в цейлонском зеленом чае «Dilmah» (47,7%) и китайском зеленом чае «Longjing Green Tea» (47%) близка по значению. Самую низкую активность показал эпикатехин, содержащийся в цейлонском зеленом чае «St. Clair's» - 46%). Увеличение концентрации чая выше 0,2% приводило к снижению антиоксидантной активности эпикатехина. Активность эпикатехина в растворах чая была ниже активности раствора чистого эпикатехина. Очевидно, чай содержит вещества, снижающие реакционную способность эпикатехина. Необходимо отметить сходство графиков зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина от концентрации эпикатехина и аналогичных зависимостей для растворов зеленого чая. Можно предположить, что концентрация эпикатехина, при которой наблюдается ее максимальная активность (10^{-4} М), будет совпадать с максимумом ее активности в растворах чая, что позволит рассчитать его содержание в биологических жидкостях. Так как максимальная активность эпикатехина в растворах зеленого чая «Greenfields», «St. Clair's», «Dilmah» и «Longjing Green Tea» наступает при растворении 40 мг чая в 200 мл воды, можно рассчитать, что при растворении 1 г чая в 1 л воды высвобождается 145 мг эпикатехина ($5 \cdot 10^{-4}$ М).

Выводы

Все исследованные флавоноиды показали высокую антиоксидантную активность. Они восстанавливали интенсивность флуоресценции флуоресцеина до 67–98,7% при очень малых концентрациях 10^{-6} – 10^{-4} М. Показатели IC_{50} составляли $2 \cdot 10^{-8}$ – $6 \cdot 10^{-6}$ М. Сравнение антиоксидантной активности флавоноидов и анализ их структур позволил выявить вклад отдельных функциональных групп при связывании свободных радикалов. По эффективности протекторного действия от активных радикалов флавоноиды можно расположить в следующий ряд: гесперидин > рутин > силибин > кверцетин > силимарин > эпикатехин.

Полученные результаты показывают, что методика определения активности флавоноидов с помощью детектирования интенсивности флуоресценции флуоресцеина и ее уменьшения под воздействием АФК, генерирование которых осуществляли реакцией Fe^{2+} с H_2O_2 , может быть использована для определения их активности как в чистых растворах так и в биологических жидкостях.

Авторы выражают благодарность профессору Д.И.Метелице за консультации при написании статьи.

Список литературы

- 1.Рюбен, К. Антиоксиданты/ К. Рюбен. – Москва: Крон-Пресс, 1998. – 224 с.
- 2.Оковитый, С.В. Клиническая фармакология антиоксидантов / С.В. Оковитый. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 602 с.
- 3.Halliwell, B. Free radicals in biology and medicine/ B. Halliwell, Y.M.C. Gutteridge // Fourth Edition Oxford: University Press, 2007. – 851 p.
- 4.Epicatechin attenuates atherosclerosis and exerts anti-inflammatory effects on diet-induced human-CRP and NFkB in vivo/ M. Morrison [et al.] // Atherosclerosis. – 2014. – Vol. 233, № 1. – P. 149–156.
- 5.Cao, G.H. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants / G.H. Cao, H.M. Alessio, R.G. Cutler // Free Radicals In Biology And Medicine. – 1993. – Vol. 3, №14. – P. 303–311.
- 6.Ehlenfeldt, M.K. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry/ M.K. Ehlenfeldt, R.I. Prior // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2001. – Vol. 49. – P. 2222–2227.
- 7.Сычев, А.Я. Гомогенный катализ соединениями железа/ А.Я. Сычев, В.Г. Исак – Кишинев: Штиинца, 1988. – 216 с.
- 8.Wei, Y. A novel H_2O_2 -triggered anti-Fenton fluorescent pro-chelator excitable with visible light/ Y. Wei // Chem. Commun. – 2009. – Vol. 11. – P.1413–1415.
- 9.Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies/ W. Bors [et al.] // Meth. Enzymol./Ed. Packer., Glaser A.N.N.-Y.: Academic Press, 1990. – Vol. 186. – P. 343–354.
- 10.Min, K. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels/ K. Min, S.E. Ebeler // Food Chem. Toxicol. – 2008. – Vol. 46, № 1. – P. 96–104.
- 11.Sotibran, A.N. Flavonoids and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*/ A.N. Sotibran, M.G. Ordaz-Tellez, R. Rodriguez-Arnaiz // Mutat. Res. – 2011. –Vol.726, № 1. – P. 60–65.
- 12.Evaluating the bioactive effects of flavonoid hesperidin - a new literature data survey/ V. Kuntić [et al.] // Vojnosanit Pregl. – 2014. – Vol.71, № 1. – P. 60–65.
- 13.van Wenum, E. Media effects on the mechanism of antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin: role of the enol group/ E. van Wenum, R. Jurczakowski, G. Litwinienko //J Org Chem. – 2013. – Vol.78, № 18. – P. 9102–9112.
- 14.Antioxidant activity and preventive effect of aqueous leaf extract of *Aloe Vera* on gentamicin-induced nephrotoxicity in male Wistar rats/ A.Baradaran [et al.] // Clin Ter. – 2014. – Vol. 165, № 1. – P. 7–11.
- 15.Яшин, Я.И. Природные антиоксиданты. Содержание в пищевых продуктах и влияние их на здоровье и старение человека/ Я.И. Яшин, В.Ю. Рыжнев, Н.И. Черноусова. – М.: Транс Лит., 2009. – 212 с.