—— ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ ——

УДК 543.062;543.422.3;543.544.5;54.04

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИТИРЕОИДНЫХ И АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ ЦИСТЕИНА, ГЛУТАТИОНА И МЕТИОНИНА МЕТОДАМИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ И ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

© 2021 г. А.А. Щербатых^{а, *}, М. С. Черновьянц^а

^аЮжный федеральный университет, химический факультет ул. Р. Зорге, 7, Ростов-на-Дону, 344090 Россия *e-mail: sherbatyh@sfedu.ru Поступила в редакцию 30.07.2020 г. После доработки 15.10.2020 г. Принята к публикации 24.10.2020 г.

Изучены антитиреоидные свойства серосодержащих аминокислот цистеина и метионина и трипептида глутатиона путем оценки кинетических и термодинамических параметров взаимодействия аналитов с анионными комплексами иода (I_3 и I_2Cl^-). Максимальной, сопоставимой с константами скоростей физиологических процессов, является константа скорости реакции второго порядка между цистеином и трииодидом. Антиоксидантная активность цистеина и глутатиона оценена кинетическим методом со спектрофотометрическим контролем скорости реакции с использованием реакционной константы скорости второго порядка с хромоген-радикалом 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ) и времени реакционного полупревращения в спиртовых средах. Антиоксидантные свойства цистеина и глутатиона, проявляемые в реакции с ДФПГ, положены в основу разработки простого и чувствительного метода их количественного определения с использованием константы скорости псевдопервого порядка. Изучение реакции аналитов с хромоген-радикалом позволило оценить их антирадикальную активность средствами спектрофотометрического анализа, дополненного ВЭЖХ.

Ключевые слова: цистеин, глутатион, метионин, аминотиолы, антиоксидантная активность, антитиреоидная активность, кинетический метод со спектрофотометрическим контролем скорости реакции, высокоэффективная жидкостная хроматография со спектрофотометрическим детектированием. **DOI:** 10.31857/S0044450221040125

Цистеин и глутатион – серосодержащие аминокислоту и трипептил, присутствующие в организме в больших концентрациях (нормальное содержание цистеина в клетках составляет 30-200 мкМ, глутатиона – 1–10 мМ [1–3]). Они участвуют в синтезе белков, метаболических процессах [4, 5], служат индикаторами нарушения обмена веществ [6, 7], поддерживают постоянство редоксстатуса клетки [8, 9]. В организмах млекопитающих цистеин образуется из незаменимой кислоты метионина и заменимой аминокислоты серина. Метионин поставляет для синтеза цистеина атом серы, а серин — углеродный скелет. Конечный результат сложной последовательности реакций заключается в замене ОН-группы серина на SH-группу, получаемую от метионина, что приводит к образованию цистеина [10]. Цистеин, в свою очередь, участвует в биосинтезе глутатиона, объединяясь на первой стадии с глутаминовой кислотой в у-глутамилцистеин, который на второй стадии присоединяет фрагмент глицина [11]. Сильные антиоксидантные свойства цистеина и глутатиона лежат в основе их важнейшей функции — работе защитной системы организма для контроля оксидативного стресса [12]. При этом они реагируют со свободно-радикальными частицами и реактивными формами кислорода [4, 13, 14], окисляясь до дисульфидов [15, 16]. Метионин как синтетический предшественник цистеина также является частью антиоксидантной системы организма, поскольку от него зависит синтез и внутриклеточная концентрация цистеина и глутатиона [17].

От присутствующих в организме окислителей (таких как свободные радикалы) зависит протекание ряда важнейших физиологических процессов. Так, например, реактивные формы кислорода являются сигнальными молекулами [18, 19], участвуют в процессе мутагенного ответа [20], а также защищают клетки от патогенов [21, 22]. С другой стороны, нарушение баланса генерации и

удаления окислителей в клетках может привести к резкому росту концентрации оксидантов, что вызывает оксидативный стресс [23-25]. Этот процесс негативно влияет на метаболизм, так как приводит к неконтролируемому окислению липидов, нуклеиновых кислот и протеинов, разрушению ДНК, нарушению работы защитных ферментов, увеличивая риск развития таких заболеваний, как атеросклероз, болезнь Альцгеймера, рак, катаракта, сердечно-сосудистые заболевания и т.д. [26, 27]. Кроме того, оксидативный стресс нарушает синтез гормонов щитовидной железы и может привести к развитию в организме гипотиреоза (тиреодит Хашимото) [28, 29], либо гипертиреоза (болезнь Грейвса) [30-32]. Для регулирования концентрации окислителей и контроля оксидативного стресса клетки генерируют антиоксиданты [33]. Антиоксиданты могут отличаться друг от друга химической природой и механизмом действия [34]. Например, в качестве антиоксидантов, непосредственно взаимодействующих со свободными радикалами и прерывающих окислительную цепь, могут выступать низкомолекулярные аминотиолы, обладающие сильными восстановительными свойствами. Такими веществами являются цистеин и глутатион.

Работы по оценке антиоксидантной активности аминотиолов включают целый ряд оптических методов. Среди них метод CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity): с его помощью авторы работы [35] исследовали вклад цистеина и глутатиона в величину общей антиоксидантной активности (TAC, total antioxidant capacity). Для оценки уровня антиоксидантов, включая цистеин, в продуктах питания, использовали метод FRAP (ferric reducing ability of plasma) [36]. Для изучения кинетики свободно-радикальной реакции с участием цистеина и глутатиона применен метод ABTS (2,2H-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) [37].

В особую группу следует выделить методы, использующие 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ) – стабильный свободный хромоген-радикал, поглощающий излучение при 517 нм, что позволяет легко отслеживать его концентрацию в анализируемой системе [38, 39]. ДФПГ используют в качестве окислителя при моделировании оксидативного стресса in vitro и для оценки активности антиоксидантов с применением кинетических методов и ВЭЖХ со спектрофотометрическим и массспектрометрическим детектированием [40–46].

В перечисленных выше работах содержатся результаты оценки антиоксидантной активности цистеина и глутатиона, выраженные в единицах антирадикальной активности (RS), количества антиоксиданта, необходимого для уменьшения концентрации окислителя на 50% (EC_{50}) и константы скорости окислительно-восстановительного процесса (k).

Высокая реакционная активность цистеина и глутатиона по отношению к различным формам свободных радикалов [4, 14] может быть обусловлена подвижностью атома водорода тиольной группы. Интересно, что это не первый пример проявления биологической активности веществами, содержащими SH-группу, и их производными. например такими как тиоамиды. Известно, что тиоамиды также проявляют антиоксидантную активность, а кроме того, и тиреостатическую активность [46-49]. Метионин, в отличие от цистеина и глутатиона, не относится к аминотиолам, однако проявляет антиоксидантную активность по отношению к некоторым окислителям [50]. Представляет интерес оценка кинетических параметров взаимодействия метионина - синтетического предшественника цистеина с активными формами иода.

В настоящей работе впервые применен кинетический метол со спектрофотометрическим контролем скорости реакции для оценки антиоксидантной активности in vitro цистеина и глутатиона в водной и спиртовой средах. Для сравнительной оценки антирадикальной активности (RS) и расчета EC_{50} оптимизированы известные методики ВЭЖХ- и спектрофотометрического определения этих параметров [44, 51]. Цель работы – разработка методов оценки антиоксидантной активности аминотиолов, основанных на точных и належных параметрах кинетического метода. К ним относятся константа скорости (k) и время уменьшения концентрации окислителя на 50% (*T_{EC50}*). Для исследования возможной тиреостатической активности шистеина и глутатиона изучен механизм и термодинамические параметры реакции аминотиолов с молекулярным иодом (степень реакционного превращения, ω , % и энергия активации, E_a, кДж/моль). Задачей исследования была также разработка кинетического метода количественного определения цистеина и глутатиона со спектрофотометрическим контролем скорости реакции. Наряду с цистеином и глутатионом исследовали свойства серосодержащей аминокислоты метионина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и оборудование. В работе использовали L-цистеин, 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ) и L-метионин (Sigma-Aldrich, США) и L-глутатион (Alfa Aesar, США).

Электронные спектры поглощения соединений и значения оптической плотности записывали на спектрофотометре Cary 50, снабженном Пельтьетермостатом (Varian, США). Протолитические свойства тиольной группы аналитов исследовали с использованием иономера pH-150M с индикаторным стеклянным электродом и хлоридсеребряным электродом сравнения. Для определения степени реакционного превращения применяли иономер ЭВ-74 в режиме вольтметра. Для проведения окислительно-восстановительного титрования в качестве индикаторного электрода использовали платиновый электрод.

Точные навески препаратов взвешивали на весах специального класса точности MB 210-A (Сартогосм, Россия) с погрешностью измерения 0.0001 г.

Анализ методом ВЭЖХ проводили на жидкостном изократическом хроматографе Стайер со спектрофотометрическим детектором UVV 104 М, дегазатором DG 18, термостатом колонок TS 10 и с аналитической колонкой Phenomenex Luna 5µm C18(2) 100 Å (США) с неподвижной фазой – октадецилсиланом (C18), химически связанным силикагелем (250 × 4.6 мм, 5 мкм).

В качестве растворителей использовали этанол и изопропанол отечественного производства квалификации не ниже х. ч. после очистки двукратной перегонкой. Метанол для ВЭЖХ производства "J.T. Baker" (Avantor Performance Material, Нидерланды) применяли без дополнительной очистки.

Приготовление растворов. Для оценки значений р K_a готовили 0.100 М раствор гидроксида натрия из фиксанала и стандартизовали его титрованием 0.100 М H₂SO₄. Для оценки степени реакционного превращения аналитов с иодом готовили 0.100 М раствор тиосульфата натрия из фиксанала и стандартизовали по дихромату калия. Исходный 0.050 М раствор иода стандартизовали титрованием тиосульфатом натрия. Для изучения взаимодействия аналитов с трииодид- и дииодхлорид-анионами готовили растворы растворением точных навесок цистеина, глутатиона, метионина, иода и иодида калия, иода и хлорида натрия в деионизированной воде.

Протолитические свойства SH-группы цистеина и глутатиона. Для оценки константы диссоциации SH-группы цистеина и глутатиона методом потенциометрического титрования готовили водный раствор, содержащий 0.20 ммоль аминотиола ($V_{\rm общ} = 25.0$ мл). Для поддержания постоянной ионной силы раствора ($\mu = 0.1$) добавляли раствор KCl. Титрование проводили 0.100 M раствором NaOH при перемешивании.

Взаимодействие цистеина, метионина и глутатиона с молекулярным иодом в водном растворе изучали методом обратного потенциометрического титрования. Для этого точные навески исследуемых соединений растворяли в 25 мл дистиллированной воды, добавляли избыток трииодида калия (0.50 ммоль). В случае цистеина [52] добавляли к реакционной смеси еще 0.800 г КІ и 0.60 мл 0.100 M HCl, охлаждали в емкости со льдом. В случае метионина [53] добавляли к реакционной смеси 0.5 г KH₂PO₄, 0.2 г K₂HPO₄ и 0.200 г КІ. Реакционные смеси оставляли в темноте на 15 мин, непрореагировавший иод титровали раствором тиосульфата натрия с точно установленной концентрацией (0.100 М). Точку эквивалентности фиксировали иономером в режиме вольтметра и визуально по обесцвечиванию титруемого раствора. Проводили по четыре параллельных измерения. Степень реакционного превращения (ω , %) рассчитывали по формуле:

$$\omega = \frac{\left(c_{I_2}V_{I_2} - c_{Na_2S_2O_3}V_{Na_2S_2O_3}\right)}{v} \times 100\%, \tag{1}$$

где c_{l_2} и $c_{Na_2S_2O_3}$ – концентрации иода и тиосульфата, М; V_{l_2} и $V_{Na_2S_2O_3}$ – объемы иода и тиосульфата, мл; υ – количество вещества препарата, ммоль.

Изучение взаимодействия аналитов с анионными комплексами иода кинетическим методом. Для оценки констант скорости реакций аналитов с комплексами иода использовали изомолярные концентрации (1.0 × 10⁻⁴ M) водных растворов цистеина, глутатиона, метионина, трииодид-аниона и дииодхлорид-аниона.

Кинетические зависимости получали при 25 и 37°С (метионин), а также в диапазоне температур от 4 до 25°С (цистеин и глутатион), светопоглощение иода в составе трииодид- (351 нм) и дииодхлорид-анионов (246 нм) фиксировали с интервалом 1 с. Об антиоксидантной активности аналитов судили по величине констант скорости их взаимодействия с окислителями в водных растворах при различных температурах. Зависимость этих величин от температуры позволила оценить энергии активации исследуемых процессов.

Кинетика взаимодействия аналитов с 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразилом. Исходные 4.0×10^{-4} M растворы цистеина, глутатиона и метионина готовили растворением точных навесок в минимальном объеме 0.40 мл дистиллированной воды и разбавлением органическим растворителем (этанолом, метанолом, изопропанолом) до необходимого объема 50 мл. Исходный 4.0×10^{-4} M раствор ДФПГ готовили растворением точной навески препарата в соответствующем спирте.

Для оценки констант скорости реакций использовали растворы с одинаковыми концентрациями компонентов реакции 8.0 × 10⁻⁵ М.

Период от смешивания реагентов до начала регистрации кинетической кривой составлял 49 с. Кинетические зависимости получали при 25 и 37° С, при этом светопоглощение хромоген-радикала фиксировали с интервалом 1 мин (цистеин, метионин) и 5 мин (глутатион). Об антирадикальной активности препаратов судили по величине констант скорости реакции второго порядка (k, M^{-1} мин⁻¹) с хромоген-радикалом.

Оценка антирадикальной активности цистеина и глутатиона спектрофотометрическим методом в сочетании с ВЭЖХ. Исходные 4.0×10^{-4} М растворы цистеина, глутатиона и метионина готовили растворением точных навесок в минимальном объеме (0.40 мл) дистиллированной воды и разбавле-

нием органическим растворителем (этанолом, метанолом, изопропанолом) до необходимого объема 50 мл. Исходный 4.0×10^{-4} М раствор ДФПГ готовили растворением точной навески препарата в соответствующем спирте. При анализе методом ВЭЖХ все растворы фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 0.45 мкм.

Для оценки антирадикальной активности смешивали 6.0×10^{-6} — 4.0×10^{-5} М растворы аминотиола с 8.0×10^{-5} М раствором хромоген-радикала. Реакционную смесь оставляли на 30 мин в темноте при постоянной температуре 25 или 37°С. Контрольный опыт проводили с 8.0×10^{-5} М раствором ДФПГ в соответствующем спирте.

При спектрофотометрическом анализе регистрировали электронные спектры поглощения раствора ДФПГ (контрольный опыт) и реакционной смеси при 517 нм.

О свойствах препаратов судили по величине *RS* [51], которую рассчитывали по формуле:

$$RS = \left[\frac{A_{\rm C} - A_{\rm S}}{A_{\rm C}}\right] \times 100\%,\tag{2}$$

где $A_{\rm C}$ – оптическая плотность ДФПГ в контрольном опыте, $A_{\rm S}$ – оптическая плотность ДФПГ в реакционной смеси при $\lambda_{\rm max}$ = 517 нм.

Для повышения точности результатов (например, в случае анализа сложных или окрашенных смесей) целесообразно использовать метод ВЭЖХ. Для ВЭЖХ-анализа раствор ДФПГ (контрольный опыт) или реакционную смесь вводили вручную микрошприцем в хроматографическую систему (объем петли дозатора хроматографа 20 мкл). В качестве подвижной фазы использовали смесь спирта (этанол, метанол, изопропанол) и бидистиллированной воды. Детектирование проводили при 517 нм.

О свойствах препаратов судили по величине *RS* [51], которую рассчитывали по формуле:

$$RS = \left[\frac{PA_{\rm C} - PA_{\rm S}}{PA_{\rm C}}\right] \times 100\%,\tag{3}$$

где $PA_{\rm C}$ – площадь пика, соответствующего ДФПГ на хроматограмме контрольного опыта, $PA_{\rm S}$ – площадь пика, соответствующего ДФПГ на хроматограмме реакционной смеси.

Количественное определение цистеина и глутатиона кинетическим методом. Готовили рабочие 6.0×10^{-6} —4.0 $\times 10^{-5}$ М растворы аналитов объемом 50 мл в этаноле, метаноле и изопропаноле с предварительным растворением в минимальном объеме 0.40 мл дистиллированной воды и рабочие 8.0×10^{-5} М растворы хромоген-радикала в соответствующих спиртах. В указанных интервалах концентраций уменьшение светопоглощения раствора хромоген-радикала в зависимости от времени коррелирует с концентрацией препарата в растворе (*R* в диапазоне 0.97—0.99).

Кинетические зависимости получали при 25° С, светопоглощение хромоген-радикала фиксировали с интервалом: для цистеина — 0.5 мин (этанол, метанол) и 1 мин (изопропанол), для глутатиона — 5 мин (этанол, метанол) и 2 мин (изопропанол).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетика взаимодействия аналитов с 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразилом. Взаимодействие цистеина и глутатиона с хромоген-радикалом протекает согласно схеме 1:



$$2R-S=R-S-S-R$$
, где R:



Схема 1. Взаимодействие цистеина и глутатиона со свободным хромоген-радикалом 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразилом.



Рис. 1. Электронные спектры поглощения 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразила в метаноле при 37° С в присутствии равной концентрации глутатиона (8.0 × 10^{-5} М) и графическое представление уравнения (4). Электронные спектры поглощения регистрировали каждые 5 мин.

При одинаковых исходных концентрациях цистеина (глутатиона) и хромоген-радикала их взаимодействие описывается кинетическим уравнением реакции второго порядка:

$$\frac{1}{c^0 - x} = kt + \frac{1}{c^0},\tag{4}$$

где c^0 — начальная концентрация компонентов реакции, M; *x* — координата реакции, M; *t* — время, мин; *k* — константа скорости, M⁻¹ мин⁻¹.

Значения T_{EC50} (время уменьшения концентрации свободного радикала на 50%, мин) рассчитывали по формуле:

$$T_{EC50} = \frac{1}{kc^0};$$
 (5)

значения K_{RAA} (константа относительной антиоксидантной активности по отношению к стандартному антиоксиданту тролоксу) — по формуле:

$$K_{RAA} = \frac{k}{k_{\rm Tr}} \times 100\%, \tag{6}$$

где $k_{\rm Tr}$ — константа скорости окисления тролокса хромоген-радикалом, равная 6.37 × 10⁴ М⁻¹ мин⁻¹ (этанол, [46]), 4.43 × 10⁴ М⁻¹ мин⁻¹ (метанол), 3.54 × 10⁴ М⁻¹ мин⁻¹ (изопропанол).

Антиоксидантную активность аналитов оценивали, используя константу скорости k окислительно-восстановительного процесса, и для наглядности выражали через значения T_{EC50} и относительную константу K_{RAA} , сравнивая с распространенным эффективным антиоксидантом тролоксом. Последний часто используют в качестве стандарта при исследованиях свойств антиоксидантов [44, 46, 51, 54]. Указанные параметры рассчитывали по формулам (4)—(6) на основании спектрофотометрических измерений при 25 и 37°С. Снижение интенсивности собственного поглощения ДФПГ при $\lambda_{max} = 517$ нм (в этаноле $\varepsilon =$ = 9109.7 М⁻¹ см⁻¹, в метаноле $\varepsilon =$ 10238.1 М⁻¹ см⁻¹, в изопропаноле $\varepsilon =$ 9174.6 М⁻¹ см⁻¹) позволяет судить о степени протекания реакции между радикалом и антиоксидантом и рассчитать константу скорости. На рис. 1 уравнение (4) представлено в виде v = bx + a гле x = t $v = \frac{1}{2}$ b = k $a = 1/c^0$

виде y = bx + a, где x = t, $y = \frac{1}{C^0 - X}$, b = k, $a = 1/c^0$, и решено методом наименьших квадратов.

Установлено, что метионин в исследуемых условиях не реагирует с хромоген-радикалом, что, вероятно, связано с отсутствием SH-группы в молекуле метионина.

Рассчитанные кинетические параметры антиоксидантной активности цистеина и глутатиона приведены в табл. 1. Константы скорости взаимодействия аналитов с хромоген-радикалом измерены при комнатной температуре и при температуре физиологических условий (37°С). Скорость взаимодействия аминокислоты цистеина с ДФПГ выше, чем в случае трипептида глутатиона и менее подвержена влиянию температуры. С ростом температуры от 25 до 37°С константа скорости взаимодействия глутатиона с хромоген-радикалом увеличивается почти в 2 раза в этаноле, в 1.5 раза в метаноле и в 3 раза в изопропаноле. В случае же цистеина увеличение скорости взаимодействия незначительно и мало зависит от природы растворителя.

Взаимодействие тиольной группировки с хромоген-радикалом зависит также от подвижности протона при атоме серы в молекулах цистеина и глутатиона, поэтому важной характеристикой свойств аналитов могут служить значения р K_a (-SH). Значения концентрационных констант (р K_a) 8.28 и 9.05 для цистеина и глутатиона соответственно, определенные методом потенциометрического титро-

Исследуемое соединение	Растворитель	Температура, °С	k, M^{-1} мин ⁻¹	<i>K_{RAA}</i> , %	<i>T_{EC50}</i> , мин
Цистеин	C ₂ H ₅ OH	25	6.52×10^{3}	9.72	1.92
		37	7.46×10^{3}	11.08	1.68
Глутатион		25	92.7	0.14	134.79
		37	181	0.27	69.22
Цистеин	CH ₃ OH	25	4.66×10^{3}	10.53	2.68
		37	5.62×10^{3}	12.69	2.22
Глутатион		25	34.2	0.08	365.18
		37	43.3	0.10	288.88
Цистеин	(CH ₃) ₂ CHOH	25	1.28×10^{3}	3.62	9.74
		37	1.68×10^{3}	4.74	7.45
Глутатион		25	304	0.86	41.12
		37	901	2.55	13.87

Таблица 1. Кинетические параметры антиоксидантной активности цистеина и глутатиона в присутствии 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразила в равной концентрации

вания со стеклянным индикаторным электродом, хорошо согласуются со значениями 8.27 и 9.20, найденными с использованием метода Рамана [55, 56].

Кинетический метод изучения взаимодействия цистеина, глутатиона и метионина с анионными комплексами иода. Для разработки методик определения цистеина, глутатиона и метионина, а также для изучения возможности применения этих веществ в качестве антиоксидантных и антитиреоидных препаратов необходимо располагать сведениями о кинетике реакций цистеина, глутатиона и метионина с молекулярным иодом. Анализ указанных взаимодействий позволит определить степень реакционного превращения, а также оценить энергию активации процесса.

Взаимодействие цистеина, глутатиона и метионина с трииодид- и дииодхлорид-анионами при равных концентрациях компонентов реакции описывается уравнением реакции второго порядка (4) [57] согласно схеме 2:

 $KI_3+2R-SH \rightarrow 2HI+KI+2R-S^{\bullet}$, где R – остатки цистеина и глутатиона,

N T T T

Схема 2. Взаимодействие цистеина, глутатиона и метионина с трииодидом калия.

Как и при изучении реакции с ДФПГ, антиоксидантную активность аналитов по отношению к анионным комплексам иода оценивали, используя константу скорости окислительно-восстановительного процесса и величину T_{EC50} . Указанные параметры рассчитывали по формулам (4), (5) на основании спектрофотометрических измерений.

Реакцию метионина с комплексами иода изучали при 25 и 37°С. Рассчитанные значения константы скорости второго порядка (k, M^{-1} мин⁻¹) составили: для трииодид-аниона 230 при 25°С и

770 при 37°С; для дииодхлорид-аниона 104 при 25°С и 199 при 37°С.

В случае цистеина и глутатиона при 37°С (физиологические условия) из-за высокой скорости реакции точная оценка константы скорости кинетическим методом затруднена. В связи с этим оптическую плотность растворов трииодид-иона ($\lambda_{max} = 351$ нм, $\varepsilon = 9964$ M⁻¹ см⁻¹) и дииодхлоридиона ($\lambda_{max} = 246$ нм, $\varepsilon = 13992$ M⁻¹ см⁻¹) измеряли в диапазоне температур от 4 до 25°С. Рассчитанные значения константы скорости окислительновосстановительного процесса позволили полу-

Ион	Цистеин	Глутатион
I_3^-	$\ln k = -9859 \left(\frac{1}{T}\right) + 48.535$ $R = 0.9872$	$\ln k = -5706 \left(\frac{1}{T}\right) + 31.689$ $R = 0.9909$
	$k (310 \text{ K}) = 1.84 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ $E_a = 81.97 \text{ кДж/моль}$ $T_{EC50} = 5.43 \times 10^{-4} \text{ мин}$	$k (310 \text{ K}) = 5.86 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ $E_a = 47.44 \text{ кДж/моль}$ $T_{EC50} = 1.71 \times 10^{-2} \text{ мин}$
I ₂ Cl ⁻	$\ln k = -8080 \left(\frac{1}{T}\right) + 39.622$ $R = 0.9809$	$\ln k = -3069 \left(\frac{1}{T}\right) + 22.140$ $R = 0.9948$
	$k (310 \text{ K}) = 7.72 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ $E_a = 67.18 \text{ кДж/моль}$ $T_{EC50} = 1.30 \times 10^{-2} \text{ мин}$	$k (310 \text{ K}) = 2.07 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ $E_a = 25.51 \text{ кДж/моль}$ $T_{EC50} = 4.83 \times 10^{-2} \text{ мин}$

Таблица 2. Кинетические параметры, температурные зависимости и энергии активации взаимодействия цистеина и глутатиона с трииодид- и дииодхлорид-ионами

чить температурные зависимости с использованием уравнения Аррениуса:

$$\ln k = -\frac{E_{\rm a}}{R} \left(\frac{1}{T}\right) + \ln A,\tag{7}$$

где k — константа скорости, M^{-1} мин⁻¹; T — температура, K; A — предэкспоненциальный множитель, M^{-1} мин⁻¹; E_a — энергия активация, Дж/моль; здесь R — универсальная газовая постоянная (8.314 Дж/(моль K)).

Из полученных температурных зависимостей рассчитали энергии активации окислительновосстановительных процессов и константы антиоксидантной активности при физиологических условиях, а также значения T_{EC50} . Результаты приведены в табл. 2. Увеличение скорости взаимодействия аналитов с комплексами иода сопровождается ростом величины энергии активации соответствующих процессов.

Таким образом, максимальной является скорость взаимодействия цистеина с трииодидом. Константа скорости этой реакции сопоставима с константами скоростей физиологических процессов [58–62]. Выполненный in vitro анализ подчеркивает роль цистеина в окислительно-восстановительных физиологических процессах, протекающих в организме.

Определена степень реакционного превращения препаратов в реакции с молекулярным иодом (ω , %) методом иодиметрического титрования в водной среде при комнатной температуре. Значения ω составили $87 \pm 1\%$ для цистеина, $100 \pm 2\%$ для глутатиона, $92 \pm 1\%$ для метионина. Очевидно, что полнота реакционного превращения мало зависит от размера молекул и наличия тиольной группы (ω метионина выше, чем аминотиола цистеина, а ω трипептида глутатиона выше, чем каждого из исследуемых пептидов).

Оценка антираликальной активности пистеина и глутатиона спектрофотометрическим методом в сочетании с ВЭЖХ. Оптимизация условий хроматографического определения. Для оптимизации значений некоторых хроматографических параметров (состав подвижной фазы, температура колонки, скорость потока элюента) оценивали время выхода ДФПГ и соотношение сигнал/шум. В качестве компонентов подвижной фазы использовали смесь (5:95, по объему) вода-органический растворитель (метанол, этанол и изопропанол), в котором готовили растворы аналитов и ДФПГ. Установлено, что оптимальными условиями хроматографического определения ДФПГ являются скорость потока элюента 1 мл/мин, температура 37°С и составе подвижной фазы спирт-вода (95:5, по объему). При этом общая продолжительность хроматографического анализа составила 5.5 мин (этанол), 6.5 мин (метанол) и 4 мин (изопропанол). Пример хроматограммы представлен на рис. 2.

Расчет значений антиоксидантной активности (*RS*) и концентрации аминотиола, необходимой для уменьшения концентрации 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразила на 50% (*IC*₅₀). Зависимость *RS* от концентрации антиоксиданта имеет линейный характер (*R* в диапазоне 0.96–0.99) в выбранном диапазоне концентраций от 6.0 × 10⁻⁶ до 2.0 × 10⁻⁵ M. На основании полученных зависимостей вида *RS* = $= bc^0 + a$ рассчитали величины *IC*₅₀. Результаты для ВЭЖХ- и спектрофотометрического анализа приведены в табл. 3.

Можно отметить, что близкие величины IC_{50} реализуются в этаноле. При этом коэффициент корреляции зависимости $RS = f(c^0)$ в выбранном диапазоне в случае ВЭЖХ ближе к единице, чем при использовании спектрофотометрического метода.



Рис. 2. Хроматограммы 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразила в изопропаноле (*1*), этаноле (*2*) и метаноле (*3*). Состав элюента спирт—вода (95 : 5, по объему), колонка C18 (250 × 4.6 мм, 5 мкм), температура термостата колонки 37°С, концентрация 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразила 8.0 × 10⁻⁵ М.

Количественное определение цистеина и глутатиона кинетическим методом. Кинетика взаимодействия хромоген-радикала с цистеином и глутатионом при избыточной концентрации ДФПГ описывается уравнением реакции псевдопервого порядка по реагирующим компонентам:

$$\ln \frac{c^0}{c^0 - x} = kt,\tag{8}$$

где c^0 – исходная концентрация ДФПГ, М; x – координата реакции, t – время, мин; k – константа скорости, мин⁻¹.

По уравнению реакции псевдопервого порядка рассчитали константы скорости реакций цистеина и глутатиона с ДФПГ в метаноле, этаноле и изопропаноле, параметры градуировочных графиков (k = bc + a) и метрологические характеристики количественного определения цистеина и глутатиона кинетическим методом со спектрофотометрическим контролем скорости реакции (табл. 4).

Таким образом, высокая антиоксидантная активность цистеина и глутатиона по отношению к свободному хромоген-радикалу позволила разработать простой и чувствительный метод их кинетического определения.

* * *

Таким образом, в настоящей работе использованы независимые, точные и надежные методы оценки антиоксидантной активности метионина, цистеина и глутатиона, основанные на кинетических параметрах реакций аналитов с хромогенрадикалом и иодом (константа скорости k, время уменьшения концентрации окислителя на 50% T_{EC50}). Получены температурные зависимости констант антиоксидантной активности цистеина

	Спирт	ВЭЖХ				Спектрофотометрия			
Аналит		$RS = bc^0 + a$			IC-0 M	$RS = bc^0 + a$			IC. M
		b	а	R	1050, 101	b	а	R	1050, 11
Цистеин	CH ₃ OH	8.6×10^{5}	43	0.989	8.1×10^{-6}	1.1×10^{6}	28	0.984	2.0×10^{-5}
	C ₂ H ₅ OH	1.3×10^{6}	25	0.977	1.9×10^{-5}	1.7×10^{6}	16	0.977	2.0×10^{-5}
	(CH ₃) ₂ CHOH	7.6×10^{5}	19	0.971	4.1×10^{-5}	6.0×10^{5}	15	0.968	5.8×10^{-5}
Глутатион	CH ₃ OH	6.2×10^{5}	24	0.987	4.2×10^{-5}	8.1×10^{5}	4.7	0.975	5.6×10^{-5}
	C ₂ H ₅ OH	1.7×10^{6}	-1.2×10^{-2}	0.988	2.9×10^{-5}	1.4×10^{6}	5.1	0.977	3.1×10^{-5}
	(CH ₃) ₂ CHOH	8.0×10^{5}	7.1	0.993	5.4×10^{-5}	1.6×10^{6}	-3.1	0.964	3.2×10^{-5}

Таблица 3. Оценка параметров функции антиоксидантной активности цистеина и глутатиона

Соединение	Растворитель	k = bc + a		Вредено	Найлено	P	s %	c M
		b	а	выдено	Паидено	Λ	5 _r ,70	Смин, 111
Цистеин	CH ₃ OH	2.0×10^{3}	2.9×10^{-4}	1.0×10^{-5}	9.8×10^{-6}	0.998	2.1	4.0×10^{-6}
Глутатион		30	1.7×10^{-4}	3.0×10^{-5}	2.8×10^{-5}	0.998	2.7	4.0×10^{-6}
Цистеин	C ₂ H ₅ OH	3.1×10^{3}	-1.0×10^{-2}	$8.0 imes 10^{-6}$	7.6×10^{-6}	0.993	0.61	5.4×10^{-6}
Глутатион		55	2.0×10^{-4}	1.8×10^{-5}	1.8×10^{-5}	0.995	2.3	5.0×10^{-6}
Цистеин	(CH ₃) ₂ CHOH	8.7×10^2	-2.4×10^{-3}	1.5×10^{-5}	1.4×10^{-5}	0.999	1.6	2.6×10^{-6}
Глутатион		2.9×10^{2}	-3.3×10^{-4}	1.5×10^{-5}	1.6×10^{-5}	0.994	3.9	3.6×10^{-6}

Таблица 4. Параметры градуировочных функций и результаты (М) определения цистеина и глутатиона с 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразилом в спиртовых средах

Примечание. *R* – коэффициент корреляции; *s*_r – относительное стандартное отклонение; *с*_{мин} – предел обнаружения [63].

и глутатиона по отношению к иоду в составе трииодид- и дииодхлорид-анионов, что позволило рассчитать значения энергии активации редокспроцессов при физиологических условиях (37° C). Антиоксидантные свойства цистеина и глутатиона, проявляемые ими в реакции с ДФПГ, использованы для разработки простого и чувствительного метода их количественного определения, характеризующегося высокой точностью. Интенсивное светопоглощение ДФПГ при 517 нм в спиртовых средах позволяет также оценить антиоксидантную активность средствами спектрофотометрии в сочетании ВЭЖХ. Оба метода дают сходящиеся результаты и дополняют друг друга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Yang Y., Feng Y., Qiu F., Iqbal K., Wang Y., Song X., Wang Y., Zhang G.L., Liu W. Dual-site and dual-excitation fluorescent probe that can be turned for discriminative detection of cysteine, homocystein, and thiophenols // Anal. Chem. 2018. V. 90. № 23. P. 14048.
- Zhang S., Ong C.-N., Shen H.-M. Critical roles of intracellular thiols and calcium in parthenolide-induced apoptosis in human colorectal cancer cells // Cancer. Lett. 2004. V. 208. P. 143.
- Jung H.S., Chen X., Kim J.S., Yoon J. Recent progress in luminescent and colorimetric chemosensors for detection of thiols // Chem. Soc. Rev. 2013. V. 42. P. 6.
- Droge W., Hack V., Breitkreutz R., Holm E., Shubinski G., Schmid E., Galter D. Role of cysteine and glutathione in signal transduction, immunopathology and cachexia // BioFactors. 1998. V. 8. P. 97.
- Meister A., Anderson M. Glutathione // Annu. Rev. Biochem. 1983. V. 52. P. 711.
- Goodman M.T., McDuffie K., Hernandez B., Wilkens L.R., Selhub J. Case-control study of plasma folate, homocysteine, vitamin B₁₂, and cysteine as markers of cervical dysplasia // Cancer. 2000. V. 89. P. 376.
- Estrela J.M., Ortega A., Obrador E. Glutathione in cancer biologe and therapy // Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 2006. V. 43. P. 143.

- Jones D.P., Liang Y. Measuring the poise of thiol/disulfide couples in vivo // Free Radical Biol. Med. 2009. V. 47. № 10. P. 1329.
- Halvey P.J., Watson W.H., Hansen J.M., Go Y.-M., Samali A., Jones D.P. Compartmental oxidation of thiol– disulphide redox couples during epidermal growth factor signalling // Biochem. J. 2005. V. 386. P. 215.
- Ленинджер А. Основы биохимии: В 3-х тт. М.: Мир, 1985. С. 656.
- 11. White C.C., Viernes H., Krejsa C.M., Botta D., Kavanagh T.J. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity // Anal. Biochem. 2003. V. 318. № 2. P. 175.
- 12. Valencia E., Marin A., Hardy G. Glutathione nutritional and pharmacologic viewpoints // Nutrition. 2002. V. 18. P. 291.
- 13. *Yin F., Sancheti H., Cadenas E.* Mitochondrial thiols in the regulation of cell death pathways // Antioxid. Redox Signal. 2012. V. 17. № 12. P. 1714.
- Pastore A., Federici G., Bertini E., Piemonte F. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification // Clin. Chim. Acta. 2003. V. 333. P. 19.
- Jones D.P. Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance // Methods Enzymol. 2002. V. 348. P. 93.
- Toyo'oka T. Recent advances in separation and detection methods for thiol compounds in biological samples // J. Chromatogr. 2009. V. 877. P. 3318.
- Pinnen F., Cacciatore I., Cornacchia C., Sozio P., Cerasa L.S., Iannitelli A., Nasuti C., Cantalamessa F., Sekar D., Gabbianelli R., Falcioni M.L., Stefano A.D. Codrugs linking L-dopa and sulfur-containing antioxidants: New pharmacological tools against Parkinson's disease // J. Med. Chem. 2009. V. 52. P. 559.
- Sena L.A., Chandel N.S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species // Mol. Cell. 2012. V. 48. № 2. P. 158.
- 19. *Droge W*. Free radicals in the physiological control of cell function // Physiol. Rev. 2002. V. 82. P. 47.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2007. V. 39. P. 44.

ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ том 76 № 4 2021

- Emre Y., Hurtaud C., Nübel T., Criscuolo F., Ricquier D., Cassard Doulcier A.-M. Mitochondria contribute to LPS-induced MAPK activation via uncoupling protein UCP2 in macrophages // Biochem. J. 2007. V. 402. P. 271.
- Kizaki T., Suzuki K., Hitomi Y., Taniguchi N., Saitoh D., Watanabe K., Onoe' K., Day N. K., Good R.A., Ohno H. Uncoupling protein 2 plays an important role in nitric oxide production of lipopolysaccharide-stimulated macrophages // PNAS. 2002. V. 99. № 14. P. 9392.
- 23. *Trachootham D., Alexandre J., Huang P.* Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach? // Nat. Rev. Drug Discovery. 2009. V. 8. № 7. P. 579.
- 24. *Pelicano H., Carney D., Huang P.* ROS stress in cancer cells and therapeutic implications // Drug Resist. Updates. 2004. V. 7. № 2. P. 597.
- 25. *Sies H.* Oxidative Stress: Introductory Remarks. London: Academic Press, 1985. P. 8.
- Mayne S.T. Antioxidant nutrients and chronic disease: Use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research // J. Nutr. 2003. V. 133. P. 933.
- Moriarty S.E., Shah J.H., Lynn M., Jiang S., Openo K., Jones D.P., Sternberg P. Oxidation of glutathione and cysteine in human plasma associated with smoking // Free Radical Biol. Med. 2003. V. 35. № 12. P. 1582.
- Ruggeri R.M., Vicchio T.M., Cristani M., Certo R., Caccamo D., Alibrandi A., Giovinazzo S., Saija A., Campenni A., Trimarchi F., Gangemi S. Oxidative stress and advanced glycation end products (AGEs) in Hashimoto's thyroiditis // Thyroid. 2016. V. 26. № 4. P. 504.
- 29. *Nanda N*. Oxidative stress in hypothyroidism // Int. J. Clin. Exp. Physiol. 2016. V. 3. P. 4.
- Aslan M., Cosar N., Celik H., Aksoy N., Dulger A.C., Begenik H., Soyoral Y.U., Kucukoglu M.E., Selek S. Evaluation of oxidative status in patients with hyperthyroidism // Endocrine. 2011. V. 40. P. 285.
- Marcocci C., Bartalena L. Role of oxidative stress and selenium in Graves' hyperthyroidism and orbitopathy // J. Endocrinol. Invest. 2013. V. 36. P. 15.
- Bianchi G., Solaroli E., Zaccheroni V., Grossi G., Bargossi A.M., Melchionda N., Marchesini G. Oxidative stress and anti-oxidant metabolites in patients with hyperthyroidism: Effect of treatment // Horm. Metab. Res. 1999. V. 31. P. 620.
- 33. Harris I.S., Treloar A.E., Inoue S., Sasaki M., Gorrini C., Lee K.C., Yung K.Y., Brenner D., Knobbe-Thomsen C.B., Cox M.A., Elia A., Berger T., Cescon D.W., Adeoye A., Brustle A., Molyneux S.D., Mason J.M., Li W.Y., Yamamoto K., Wakeham A., Berman H.K., Khokha R., Done S.J., Kavanagh T.J., Lam C.W., Mak T.W. Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression // Cancer Cell. 2015. V. 27. № 2. P. 211.
- Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K. Methods for testing antioxidant activity // Analyst. 2002. V. 127. P. 183.
- 35. *Çekiç S.D., Başkan K.S., Tütem E., Apak R.* Modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay for measuring the antioxidant capacities of thiol-con-

taining proteins in admixture with polyphenols // Talanta. 2009. V. 79. № 2. P. 344.

- 36. Zardo D.M., Silva K.M., Guyot S., Nogueira A. Phenolic profile and antioxidant capacity of the principal apples produced in Brazil // Int. J. Food Sci. Nutr. 2013. V. 64. № 5. P. 611.
- Valent I., Topol'ská D., Valachová K., Bujdák J., Šoltés L. Kinetics of ABTS derived radical cation scavenging by bucillamine, cysteine, and glutathione. Catalytic effect of Cu²⁺ ions // Biophys. Chem. 2016. V. 212. P. 9.
- Kovatcheva E.G., Koleva I.I., Ilieva M., Pavlov A., Mincheva M., Konushlieva M. Antioxidant activity of extracts from Lavandula vera MM cell cultures // Food Chem. 2001. V. 72. P. 295.
- Chen J.H., Ho C.-T. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds // J. Agric. Food Chem. 1997. V. 45. P. 2374.
- Ohnishi M., Morishita H., Iwahashi H., Toda S., Shirataki Y., Kimura M., Kido R. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acids peroxidation and haemolysis // Phytochemistry. 1994. V. 36. P. 579.
- 41. *Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C.* Use of free radical method to evaluate antioxidant activity // Lebensm.-Wiss. Technol. 1995. V. 28. P. 25.
- Bonina F., Puglia C., Tomaino A., Saija A., Mulinacci N., Romani A., Vincieri F. F. In-vitro antioxidant and in-vivo photoprotective effect of three lyophilized extracts of sedum telephium L. leaves // J. Pharm. Pharmacol. 2000. V. 52. P. 1279.
- 43. *Krings U., Berger R.G.* Antioxidant activity of some roasted foods // Food Chem. 2001. V. 72. P. 223.
- 44. Koleva I.I., Niederlander H.A.G., Beek T.A. An on-line HPLC method for detection of radical scavenging compounds in complex mixtures // Anal. Chem. 2000. V. 72. P. 2323.
- 45. Orsini F., Vovk I., Glavnik V., Jug U., Corradini D. HPTLC, HPTLC-MS/MS and HPTLC-DPPH methods for analyses of flavonoids and their antioxidant activity in Cyclanthera pedata leaves, fruits and dietary supplement // J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 2019. V. 42. P. 290.
- 46. Chernovyants M.S., Kolesnikova T.S., Karguinova A.O. Thioamides as radical scavenging compounds: Methods for screening antioxidant activity and detection // Talanta. 2016. V. 149. P. 319.
- 47. Долинкин А.О., Черновьянц М.С. Анализ гетероароматических тиоамидов-препаратов тиреостатического действия // Хим.-фарм. журн. 2010. Т. 44. № 2. С. 46.
- Chernovyants M.S., Starikova Z.A., Karguinova A.O., Kolesnikova T.S., Terznikov A.Yu. Spectroscopic and structural investigation of interaction product of 8mercaptoquinoline with molecular iodine // Spectrochim. Acta A. 2013. V. 115. P. 861.
- 49. Черновьянц М.С., Алешина Н.В. Исследование антиоксидантной активности и определение тиоамидов на основе азотсодержащих пятичленных гетероциклов кинетическим методом // Журн. аналит. химии. 2012. Т. 67. № 3. С. 253. (Chernovyants M.S., Aleshina N.V. Study on the antioxidant activity and quantification of thioamides based on ni-

trogen five-membered heterocycles by the kinetic technique // J. Anal. Chem. 2012. V. 67. № 3. P. 214.)

- 50. Triantis T.M., Yannakopoulou E., Nikokavoura A., Dimotikali D., Papadopoulos K. Chemiluminescent studies on the antioxidant activity of amino acids // Anal. Chim. Acta. 2007. V. 591. P. 106.
- 51. Chandrasekar D., Madhusudhana K., Ramakrishna S., Diwan P.V. Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: A sensitive screening method for polyherbal formulations // J. Pharm. Biomed. Anal. 2006. V. 40. № 2. P. 460.
- 52. British Pharmacopoeia Commission British Pharmacopeia. London: Stationery Office, 2008.
- 53. Государственная фармакопея СССР IX издания. М.: Медгиз, 1961. 914 с.
- 54. Benzie I.F.F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay // Anal. Biochem. 1996. V. 239. P. 70.
- 55. Suwandaratne N., Hu J., Siriwardana K., Gadogbe M., Zhang D. Evaluation of thiol Raman activities and pK_a values using internally referenced Raman-based pH titration // Anal. Chem. 2016. V. 88. P. 3624.
- 56. Якубке Х.-Д., Эшкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки. М.: Мир, 1985. 456 с.
- 57. Беликов В.Г. Фармацевтическая химия. В 2-х ч.: Учебн. пособие. М.: МЕДпресс-информ, 2007. 624 с.

- 58. Ładyżyński P., Wójcicki J.M., Bąk M.I., Sabalinska S., Kawiak J., Foltynski P., Krzymien J., Karnafel W. Hemoglobin glycation rate constant in non-diabetic individuals // Ann. Biomed. Eng. V. 39. P. 2721.
- 59. Захарченко Н.Л., Ермакова Е.А., Зуев Ю.Ф. Влияние микроокружения трипсина на константы скорости элементарных стадий реакции гидролиза этилового эфира *N*-бензоил-*L*-аргинина // Биоорг. химия. 2008. Т. 34. № 3. С. 404. (Zakharchenko N.L., Ermakova E.A. Zuev Y.F. Effect of trypsin microenvironment on the rate constants of elementary stages of the hydrolysis reaction of N^{α} -benzoyl-L-arginine ethyl ester // Russ. J. Bioorg. Chem. 2008. V. 34. № 3. P. 364.)
- 60. Tian W.X., Tsou C.L. Determination of the rate constant of enzyme modification by measuring the substrate reaction in the presence of the modifier // Biochemistry. 1982. V. 21. № 5. P. 1028.
- 61. Rigg T., Taylor W., Weiss J. The rate constant of the bimolecular reaction between hydrogen peroxide and ferrous ion // Experientia. 1954. V. 10. № 5. P. 202.
- 62. Hargrove M.S., Barrick D., Olson J.S. The association rate constant for heme binding to globin is independent of protein structure // Biochemistry. 1996. V. 35. № 35. P. 11293.
- 63. Булатов М.И., Калинкин И.П. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. Л.: Химия, 1986. 432 с.

323