

Определение показателей окислительного стресса в мялиссе лекарственной при действии микромицета *Fusarium culmorum* и его антагонистов

© 2022. А. И. Фокина¹, к. б. н., доцент, С. Г. Скугорева², к. б. н., н. с.,
Л. В. Трефилова³, к. б. н., доцент, Л. В. Даровских¹, к. п. н., доцент,

¹Вятский государственный университет,
610000, Россия, г. Киров, ул. Московская, д. 36,

²Институт биологии Коми научного центра
Уральского отделения Российской академии наук,
167982, Россия, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28,

³Вятский государственный агротехнологический университет,
610017, Россия, г. Киров, Октябрьский проспект, д. 133,
e-mail: annushka-fokina@mail.ru

На качество лекарственного растительного сырья, в частности мялиссе лекарственной *Melissa officinalis* L., большое влияние оказывает содержание биологически активных веществ, зависящее от окислительно-восстановительного баланса внутри клеток. Смещение баланса возможно в результате окислительного стресса, вызванного неблагоприятными факторами. Стресс-фактором, в частности, могут быть фитотоксины, которые выделяет распространённый в почве микромицет *Fusarium culmorum* (W.G. Sm.) Sacc.

Целью работы было изучить содержание антиоксидантов и накопление малонового диальдегида в растениях мялиссе лекарственной при внесении в питательный грунт фитопатогенного микромицета *F. culmorum* и его антагонистов (*Fischerella muscicola* (Thur.) Gom. 300 и *Trichoderma viride* Pers.). Для подтверждения корректности используемых методов анализа была проведена их валидация в соответствии с требованиями действующих нормативных документов.

Для оценки применимости методов кулонометрического определения суммы антиоксидантов и спектрофотометрического определения фенольных соединений (ФС) в спиртовых вытяжках из мялиссе выполнена валидация методик анализа. Показано, что их статистические характеристики в целом удовлетворяют критериям приемлемости валидационных параметров (линейность, повторяемость и правильность), представленным в отечественной и зарубежной нормативной документации и литературе.

Присутствие в грунте *F. culmorum* приводило к накоплению малонового диальдегида (МДА) в листьях мялиссе в количествах, превышающих контроль в 1,8 раза. В ответ на действие окислительного стресса происходит усиленный синтез антиоксидантов: в спиртовом экстракте из мялиссе количество суммы антиоксидантов увеличивается в 1,1–1,6 раза, ФС – в 1,2–1,8 раза по сравнению с контролем. Установлена прямая корреляционная зависимость между содержанием ФС и МДА ($r = 0,69$), ФС и суммой антиоксидантов ($r = 0,84$), МДА и суммой антиоксидантов ($r = 0,69$), что указывает на активацию антиоксидантной системы растений (накопление антиоксидантов, в том числе ФС) в условиях окислительного стресса. Внесение в грунт микробов-антагонистов *F. muscicola* и *T. viride* позволяет ослабить воздействие фитопатогена.

Ключевые слова: мялисса лекарственная, фитопатогены, антагонисты, окислительный стресс, антиоксиданты, фенольные соединения, валидация методик.

Determination of oxidative stress indicators in *Melissa officinalis* under the action of micromycete *Fusarium culmorum* and its antagonists

© 2022. A. I. Fokina¹ ORCID: 0000-0001-8265-8882, S. G. Skugoreva² ORCID: 0000-0002-5902-5187,
L. V. Trefilova³ ORCID: 0000-0002-9932-5803, L. V. Darovskikh¹ ORCID: 0000-0001-5868-102X,
¹Vyatka State University,

36, Moskovskaya St., Kirov, Russia, 610000,
²Institute of Biology of the Komi Science Centre of the Ural Branch
of the Russian Academy of Sciences,

28, Kommunisticheskaya St., Syktyvkar, Russia, 167982,

The quality of medicinal plant materials, in particular lemon balm *Melissa officinalis* L., is greatly influenced by the content of biologically active substances, which depends on the redox balance inside the cells. A balance shift is possible as a result of oxidative stress caused by adverse factors. The stress factor, in particular, may be phytotoxins, which are secreted by the micromycete *Fusarium culmorum* (W.G. Sm.) Sacc., which is widespread in the soil.

The aim of the work was to study the content of antioxidants and the accumulation of malondialdehyde in lemon balm plants when the phytopathogenic micromycete *F. culmorum* and its antagonists (*Fischerella muscicola* (Thur.) Gom. 300 и *Trichoderma viride* Pers.) are introduced into the nutrient soil. To assess the applicability of the methods of coulometric determination of the amount of antioxidants and spectrophotometric determination of phenolic compounds (PC) in alcohol extracts from lemon balm, the methods were validated. It is shown that their statistical characteristics generally satisfy the acceptance criteria for validation parameters (linearity, repeatability and correctness) presented in domestic and foreign regulatory documentation and literature.

The presence of *F. culmorum* in the soil led to the accumulation of malondialdehyde (MDA) in lemon balm leaves in amounts exceeding the control by 1.8 times. In response to the action of oxidative stress, an increased synthesis of antioxidants occurs: in the alcoholic extract from lemon balm, the amount of antioxidants increases by 1.1–1.6 times, PC by 1.2–1.8 times compared with the control. A direct correlation was established between the content of PC and MDA ($r = 0.69$), PC and the amount of antioxidants ($r = 0.84$), MDA and the amount of antioxidants ($r = 0.69$), which indicates the activation of the antioxidant system of plants (accumulation of antioxidants, including PC) under conditions of oxidative stress. The introduction of microorganisms-antagonists of *F. muscicola* and *T. viride* into the soil makes it possible to weaken the impact of the phytopathogen.

Keywords: lemon balm, phytopathogens, antagonists, oxidative stress, antioxidants, phenolic compounds, method validation.

Мелисса лекарственная (*Melissa officinalis* L.) – многолетнее травянистое растение, которое широко используется в медицине благодаря содержанию в ней большого количества биологически активных веществ (БАВ): флавоноидов, дубильных веществ, витаминов, антиоксидантов [1]. Под действием неблагоприятных факторов среды может происходить изменение состава БАВ и ценности лекарственного сырья. Одним из таких факторов является наличие некоторых групп микроорганизмов (МО) в среде выращивания, в частности, фитопатогенного микромицета рода *Fusarium*, способного выделять в окружающую среду различные токсины.

Ведущим механизмом негативного влияния микромицета на растения является окислительный стресс, который основан на генерации избыточного количества активных форм кислорода (АФК). Они образуются в результате электронного возбуждения или окислительно-восстановительных превращений O_2 , являются необходимой и неотъемлемой частью метаболизма живых клеток всех аэробных организмов. Избыточное накопление АФК опасно для клетки, так как они способны взаимодействовать с биомолекулами и индуцировать развитие окислительного стресса [2].

В живых организмах существует большая группа веществ-антиоксидантов, способных снижать агрессивное действие АФК. К ним от-

носятся фенольные соединения (ФС) – большая группа веществ ароматической природы с высокой окислительно-восстановительной активностью. Антиоксидантные свойства ФС обусловлены наличием соединённых с ароматическим ядром гидроксильных групп, легко отдающих атом водорода при взаимодействии со свободными радикалами. Понимание функционирования антиоксидантной системы необходимо для поиска оптимальных условий для выращивания мелиссы лекарственной.

Кроме использования внутреннего потенциала растений для борьбы с окислительным стрессом, вызванным патогенным микромицетом р. *Fusarium*, хорошим биотехнологическим приёмом может стать использование микробов-антагонистов.

В настоящее время в научной литературе крайне мало информации о влиянии различных факторов на антиоксидантную систему лекарственных растений, несмотря на то, что работа этой системы играет одну из ключевых ролей в формировании качества сырья.

Целью работы было изучить содержание антиоксидантов и накопление малонового диальдегида в растениях мелиссы лекарственной при внесении в питательный грунт фитопатогенного микромицета *Fusarium culmorum* (W.G. Sm.) Sacc. и его антагонистов (*Fischerella muscicola* (Thur.) Gom. 300 и *Trichoderma viride* Pers.). Для подтверждения корректности используемых методов

анализа была проведена их валидация в соответствии с требованиями действующих нормативных документов.

Объекты и методы исследования

Валидация методик определения антиоксидантов в растениях. Валидацию методик проводили согласно [3–4], информации из статей ведущих международных и российских научных журналов [5–10].

Определение фенольных соединений спектрофотометрическим методом с реактивом Фолина-Чокальтеу. Для определения ФС использовали экстракт объёмом 0,5 мл, приготовленный из навески высушенных листьев Melissa массой 0,1 г (точная навеска) и 25,0 мл 70%-го этилового спирта нагреванием на кипящей ($t = 94 \pm 2$ °C) водяной бане в течение 2 ч (здесь и далее термин «точная навеска» означает взвешивание на аналитических весах с погрешностью $\pm 0,0002$ г согласно документу ОФС.1.1.0001.15 «Правила пользования фармакопейными статьями»). Анализ основан на спектрофотометрическом определении ФС после их реакции с реактивом Фолина-Чокальтеу при длине волны 765 нм. Реактив Фолина-Чокальтеу представляет из себя молибдофосфоровольфрамную гетерополиоксидную кислоту ($3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-13\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$). Последовательность обратимых одно- или двухэлектронных реакций восстановления молибдена приводят к синему окрашиванию раствора: Mo(VI) (жёлтый) + $e^- \rightarrow \text{Mo(V)}$ (синий) [11].

Валидационные характеристики методики – линейность (шесть уровней концентраций полифенолов: 20, 60, 100, 140, 200 и 300% от номинального значения – 2,6 мг/л, $n = 2$); повторяемость ($n = 6$); правильность, определённая методом «введено-найденно» (три уровня концентраций добавок: 0,4; 0,8 и 1,6 мг/л) за счёт добавления раствора галловой кислоты (внутренний стандарт) к экстракту из Melissa, $n = 3$.

Определение антиоксидантной активности методом кулонометрического титрования. Использовали экстракт объёмом 0,2 мл, приготовленный из навески высушенных листьев Melissa массой 0,1 г (точная навеска) и 10,0 мл водного раствора этилового спирта (1 : 1) в результате термостатирования при 37 °C в течение 2 ч. Анализ экстракта проводили на кулонометре «Эксперт-006» (Эконикс-Эксперт, г. Москва) методом кулонометрического титрования бромом. Электро-

генерацию брома осуществляли из водного 0,2 М раствора бромида калия в 0,1 М растворе серной кислоты с определением конца титрования бипотенциометрической индикацией [12]. Валидационные характеристики: линейность (пять уровней концентраций антиоксидантов: 80, 90, 100, 110 и 120% от номинального значения массы антиоксидантов, в пересчёте на рутин, в аликвоте для ввода в ячейку кулонометра – 1,03 мг, $n = 3$); повторяемость ($n = 3$ при трёх уровнях концентраций); правильность, определённая методом «введено-найденно» (три уровня концентраций добавок рутин: 80, 100 и 120%).

Во всех расчётах значение величины доверительной вероятности принято $P \geq 0,95$. В качестве критерия приемлемости линейности ориентировались на значение $R \geq 0,99$, повторяемости – 5–10%.

Изучение состояния антиоксидантной системы растений Melissa. Семена Melissa лекарственной сорта Лимонный аромат протравливали 1%-м раствором перманганата калия. Проращивали в стерильных условиях в чашках Петри на увлажнённой дистиллированной водой фильтровальной бумаге в течение 7 сут, для того, чтобы в дальнейшем высаживать в почву только жизнеспособные растения.

Далее растения пересаживали в питательный грунт («Универсальный», г. Тверь, Россия), имеющий следующие агрохимические характеристики: pH 5,5–6,5; N – 50–150 мг/100 г; P(P_2O_5) – 100–250 мг/100 г; K(K_2O) – 150–300 мг/100 г. Предварительно грунт стерилизовали с помощью парового стерилизатора ГК-25-2 «ТЗМОИ»; условия стерилизации: рабочее давление 2,1+0,2 бар, температура 134 ± 3 °C, время стерилизационной выдержки – не менее 5+1 мин; проводили два цикла стерилизации. Перед посадкой растений в грунт вносили суспензии микромицетов *F. culmorum* ($T = (5,0 \pm 0,1) \cdot 10^9$ пропагул/мл, 1 мл на 60 г грунта), *T. viride* ($T = (5,0 \pm 0,1) \cdot 10^9$ спор/мл, 5 мл на 60 г грунта), а также ЦБ *F. muscicola* ($T = (3,0 \pm 0,1) \cdot 10^9$ кл./мл, 5 мл на 60 г грунта). Титр МО определяли с помощью камеры Горяева. Используются культуры МО из коллекции кафедры биологии растений, селекции и семеноводства, микробиологии Вятского агротехнологического университета (г. Киров).

Схема опыта: 1) контроль (без добавок МО); 2) *F. culmorum*; 3) *F. culmorum* + *F. muscicola*; 4) *F. culmorum* + *T. viride*; 5) *F. culmorum* + *F. muscicola* + *T. viride*. Исследования проводили при температуре 29 ± 3 °C, контроли-

ровали смену дня и ночи (12 ч/12 ч). Через 2 месяца после посадки растений определяли содержание ФС и суммы антиоксидантов (антиоксидантная активность – АОА) в листьях Melissa с помощью валидированных нами методик (ФС – спектрофотометрически с реактивом Фолина-Чекальтеу при $\lambda = 765$ нм, АОА – методом кулонометрического титрования бромом).

Содержание МДА в листьях Melissa определяли спектрофотометрически по интенсивности окраски комплекса вытяжки с тиобарбитуровой кислотой при $\lambda = 532$ нм [13].

Повторность опыта при выращивании растений четырёхкратная, аналитическая – трёхкратная. Статистическую обработку результатов проводили в программе Excel. В таблице представлены средние арифметические значения и ошибки средних. Достоверность различий с контролем оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Результаты валидации методик анализа.

Результаты валидации методики определения ФС с реактивом Фолина-Чекальтеу по такому параметру как линейность показали, что уравнение зависимости величины оптической плотности от концентрации аналита выглядит так: $y = 0,1076x$, $R = 0,9985$ (рис. 1). Метроло-

гические характеристики повторяемости: $X_{\text{ср}}$ составило 2,4 мг/л, среднее квадратичное отклонение (СКО) – 0,3 мг/л, относительное СКО – 11,2%, $\Delta X = (СКО \cdot t) / \sqrt{n}$. Следует учитывать естественную неоднородность сырья из Melissa, которое обуславливает значение относительного СКО чуть выше значений (до 10%), чаще всего приводимых авторами различных статей как предел для лекарственного растительного сырья [6–9].

Результаты валидации методики кулонометрического определения АОА в экстрактах из Melissa лекарственной по такому параметру как линейность показали, что зависимость продолжительности титрования от содержания аналита в экстракте описывается уравнением $y = 25,922x$, $R = 0,992$ (рис. 2); повторяемость – относительное СКО составило максимально 4,4%, среднее СКО методики – 0,036 (табл. 1).

Кроме того, обе валидируемые методики признаются правильными, так как значения, принимаемые за истинные, лежат внутри доверительных интервалов соответствующих средних результатов анализов, полученных экспериментально по данным методикам. Статистически достоверных различий между введёнными и найденными количествами галловой кислоты при определении ФС и рутина при определении АОА не обнаружено (табл. 1, 2).

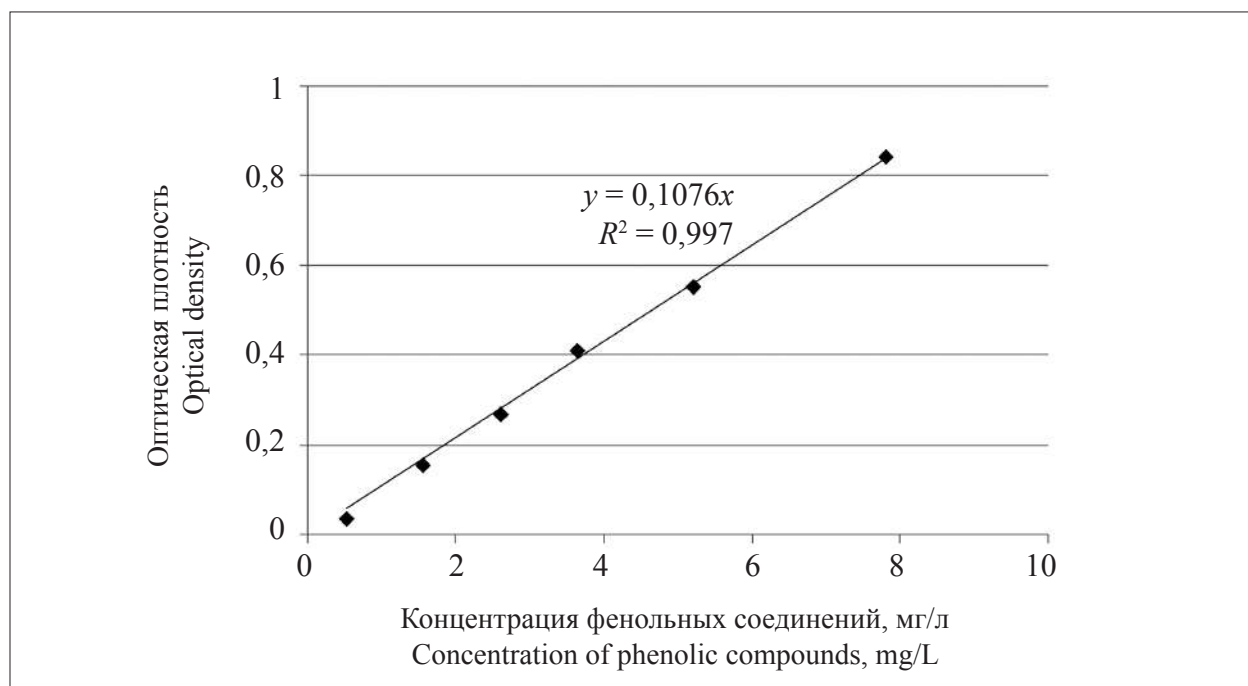


Рис. 1. Результаты валидации методики определения фенольных соединений с реактивом Фолина-Чекальтеу
Fig. 1. Results of the validation of the method for the determination of phenolic compounds with the Folin-Ciocalteu's reagent

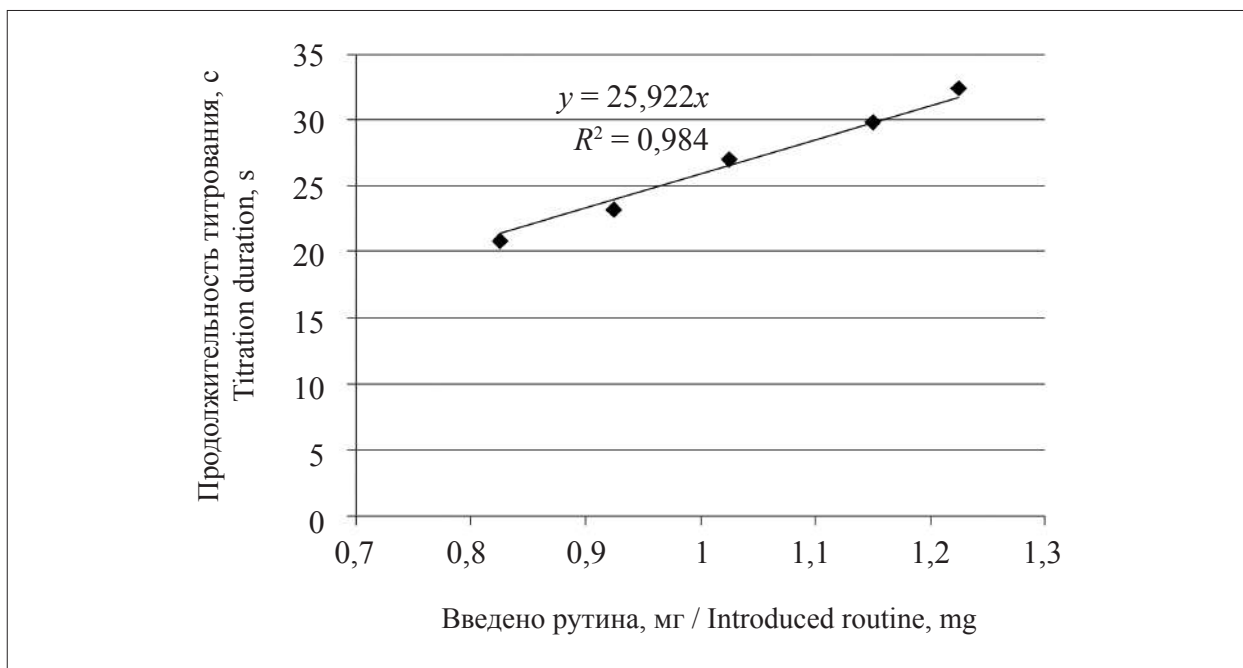


Рис. 2. График зависимости значения продолжительности кулонометрического титрования от содержания рутина, введённого в экстракт
Fig. 2. Graph of the dependence of the coulometric titration duration on the content of rutin introduced into the extract

Таблица 1 / Table 1

Метрологическая характеристика показателей правильности и повторяемости результатов определения антиоксидантной активности
 Metrological characteristics of indicators of correctness and repeatability of the results of determination of antioxidant activity

Введено рутина, мг / Introduced rutin, mg	Найдено рутина, мг / Found rutin, mg	СКО / Standard deviation (SD)	Относительное СКО, % / Relative SD	$\Delta X = (СКО \cdot t) / \sqrt{n}$ $\Delta X = (SD \cdot t) / \sqrt{n}$	S ²	СКО методики / Method SD
0,83	0,83	0,010	1,24	0,03	0,000100	0,036
1,03	1,07	0,029	2,70	0,07	0,000841	
1,24	1,28	0,055	4,30	0,14	0,003025	

Таблица 2 / Table 2

Данные для оценки правильности результатов определения фенольных соединений
 Data for assessing the correctness of the results of the determination of phenolic compounds

Введено галловой кислоты, мг/л / Added gallic acid, mg/L	Найдено галловой кислоты, мг/л / Found gallic acid, mg/L
0,40	0,46±0,13
0,80	0,61±0,20
1,60	1,36±0,38

Так как методики в целом валидны, они могут быть использованы в исследовании содержания антиоксидантов и ФС в мелиссе лекарственной.

В ходе исследования было выполнено 5 вариантов эксперимента, различающихся сочетанием внесённых в грунт МО, включая контроль (табл. 3).

Антиоксидантная система растений мелиссы. В результате исследования установлено, что фитопатоген *F. culmorum* вызывает окислительный стресс в клетках мелиссы, о чём свидетельствует накопление МДА, одного из конечных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) (табл. 3). Концентрация МДА в листьях мелиссы в варианте

№ 2 (с внесением в почву только *F. culmorum*) была в 1,8 выше, чем в контроле (вариант № 1). В вариантах с внесением в грунт МО-антагонистов (*F. muscicola* + *T. viride*) в растениях отмечали снижение накопления МДА почти до контрольных значений. В меньшей степени данный эффект проявился в варианте № 4 с внесением *T. viride*, что, вероятно, обусловлено, относительно невысокой антагонистической активностью данного МО по отношению к *F. culmorum*. В большей степени снижает интенсивность ПОЛ у растений, обусловленную микромицетом, внесение в грунт *F. muscicola* (варианты № 3 и № 5). Цианобактерии синтезируют разнообразные циклические липопептиды, обладающие фунгицидной активностью, действуя через холестерин- и эргостерин-зависимое разрушение мембран [14]. Микромицеты рода *Trichoderma* способны влиять на фитопатоген, например, вырабатывая фунгициды – антрахиноны (пахибазин, хризофанол, эмодин, ω-гидроксипахибазин, 1,5- и 1,7-дигидрокси-3-гидроксиметил-9,10-антрахиноны), которые способствуют закручиванию гиф микромицета вокруг гриба и способствуют его уничтожению (патогенез) [15].

В ответ на действие стресс-фактора активируется работа защитной системы самого организма, что проявляется в синтезе антиоксидантов. Клетки содержат вещества, способные ингибировать процессы свободно радикального окисления макромолекул с образованием менее токсичных продуктов. К ним относят аскорбиновую кислоту, каротиноиды, α-токоферол, глутатион, пролин, сахара, соединения фенольной природы, полиамины и др. Дисбаланс между оксидантами и антиоксидантами в пользу оксидантов, потенциально приводящий к повреждению,

называется «оксидативным стрессом» [16]. Общее содержание антиоксидантов в листьях мелиссы при внесении в грунт суспензии мицелия *F. culmorum* (вариант № 2) было в 1,6 раза выше по сравнению с контролем. Использование МО-антагонистов значительно снижало данный показатель. В вариантах № 4 и № 5 АОА растений незначительно превышала контроль. При внесении в грунт *F. muscicola* (вариант № 3) значение общего содержания антиоксидантов было ниже контроля в 1,6 раза.

Активация процессов ПОЛ в растительных клетках приводила к накоплению ФС. В вариантах с внесением МО отмечали большее накопление ФС, чем в контроле (в 1,3–3,4 раза), что свидетельствует о более активной работе защитной системы растения в ответ на действие стресс-фактора. Максимальное содержание данных соединений определено в варианте № 2 с внесением суспензии мицелия фитопатогенного микромицета *F. culmorum*. В других вариантах отмечали более низкие значения данного показателя, что может быть обусловлено антагонистическим эффектом *F. muscicola* и *T. viride*.

Существует прямая корреляционная зависимость между содержанием ФС и МДА ($r = 0,69$), ФС и АОА ($r = 0,84$), МДА и АОА ($r = 0,69$), что указывает на активацию антиоксидантной системы растений (накопление антиоксидантов и ФС) в условиях окислительного стресса.

Несмотря на антагонистическую роль *F. muscicola* и *T. viride*, а также биосинтез антиоксидантов в клетках мелиссы, изредка встречаются, особенно в варианте с микромицетом без антагонистов, растения с признаками окислительного стресса на листьях (увядание и усыхание краёв листовых пластинок).

Таблица 3 / Table 3

Влияние микроорганизмов на содержание фенольных соединений (ФС), малонового диальдегида (МДА), антиоксидантной активности (АОА) в растениях мелиссы / The effect of microorganisms on the content of phenolic compounds, malondialdehyde, antioxidant activity in melissa plants

№ No.	Варианты опыта Variants of the experiment	С(МДА), мкмоль/г Malondialdehyde content, μmol/g	АОА, мг рутина/г Antioxidant activity, mg of rutin/g	ФС, мг галловой кислоты/г / The content of phenolic compounds, mg of gallic acid/g
1	Контроль / Control	4,02±0,32	46,4±1,2	50,90±0,26
2	<i>F. culmorum</i>	7,21±0,22**	75,0±0,7***	93,5±0,7***
3	<i>F. culmorum</i> + <i>F. muscicola</i>	4,6±1,0	29,30±0,30***	59,20±0,23***
4	<i>F. culmorum</i> + <i>T. viride</i>	5,35±0,26*	52,0±0,7*	64,9±1,4***
5	<i>F. culmorum</i> + <i>F. muscicola</i> + <i>T. viride</i>	4,30±0,29	60,0±0,4***	84,30±0,12***

Примечание: различия с контролем достоверны при * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.
 Note: the differences with the control are significant at: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Выводы

Валидированы методики определения суммы антиоксидантов методом кулонометрического титрования на анализаторе «Эксперт-006» и фенольных соединений методом спектрофотометрии с реактивом Фолина-Чокальтеу в спиртовых экстрактах из Melissa лекарственной. Показано, что в целом методики валидны по показателям: линейность, повторяемость и правильность и могут быть использованы в исследовании содержания антиоксидантов и фенольных соединений в Melissa.

Присутствие в грунте для выращивания Melissa патогенного микромицета *F. culmorum* оказывает стрессовое действие на растения: интенсивность ПОЛ, содержание ФС и АОА в листьях были достоверно выше по сравнению с контролем.

Внесение в грунт микроорганизмов-антагонистов *F. muscicola* и *T. viride* позволяет ослабить воздействие фитопатогена. Изученные антагонисты могут быть рекомендованы как перспективные для разработки на их основе биопрепаратов с целью защиты лекарственных растений от фузариозов после подбора оптимальных технологических условий.

Таким образом, действие фитопатогена, с одной стороны, стимулирует выработку антиоксидантов в растениях Melissa; с другой стороны – приводит к напряжённой работе антиоксидантной системы и нарушению нормального функционирования растения. Кроме того, возможно накопление фитотоксинов в самом лекарственном сырье, что требует специальной проверки.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН по теме «Структура и состояние компонентов техногенных экосистем подзоны южной тайги», номер государственной регистрации в ЕГИСУ № 122040100032-5.

References

- Grebennikova O.A., Paliy A.E., Logvinenko L.A. Biologically active substances of lemon balm // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. Series: Biology, Chemistry. 2013. V. 26 (65). No. 1. P. 43–50 (in Russian).
- Golovko T.K., Silina E.V., Lamshanova E.A., Kozlovskaya A.V. Reactive oxygen species and antioxidants in living systems: an integrated overview // Theoretical and Applied Ecology. 2022. No. 1. P. 17–26 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2022-1-017-026

- State Pharmacopoeia of the Russian Federation. Edition XIV. OFS 1.1.2012.15 Validation of analytical methods. Moskva, 2018. P. 276–278 (in Russian).

- Validation of analytical methods (Guidelines for Laboratories). Sankt-Peterburg: Professiya, 2016. 312 p. (in Russian).

- Denisenko T.A., Vishnikov A.B., Tsyganok L.P. Spectrophotometric determination of the amount of phenolic compounds in plant objects using aluminum chloride, 18-molybdodiphosphate and the Folin-Ciocalteu reagent // Analytical and Control. 2015. No. 4. P. 373–380 (in Russian).

- Bubenchikova V.N., Starchak Yu.A. Validation of the method for the quantitative determination of the amount of flavonoids in thyme herb // Belgorod State University Scientific Bulletin. Medicine. Pharmacy. 2012. No. 12. P. 157–160 (in Russian).

- Kuzmenko A.N., Nesterova O.V., Suleymanova F.Sh., Matyushin A.A., Krasnyuk I.I. Modification of the method for the quantitative determination of flavonoids in the herb of Canadian goldenrod // Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya Khimiya. 2019. V. 60. No. 1. P. 49–54 (in Russian).

- Kutateladze G.R., Fedoseeva L.M. Research on the development and validation of a method for the quantitative determination of flavonoids in sorrel grass harvested in the Altai territory // Drug Development & Registration. 2019. No. 2. P. 80–86 (in Russian).

- Konovalov D.A., Konovalova D.S. Development of a method for the quantitative determination of flavonoids in the herb feverfew and its validation // Belgorod State University Scientific Bulletin. Medicine. Pharmacy. 2012. No. 16. P. 156–159 (in Russian).

- Evdokimova O.V. Development and validation of a method for the quantitative determination of the amount of flavanoids in yarrow herb // Proceedings of Voronezh State University. Series “Chemistry. Biology. Pharmacy. 2007. No. 2. P. 155–160 (in Russian).

- Ivanova A.V. Potentiometry in the study of antioxidant and antiradical properties of substances: Diss. ... dr. chem. sciences. Yekaterinburg, 2019. 350 p. (in Russian).

- Total antioxidant and oxidant activity: making measurements on a coulometric analyzer. Moskva: Econiks-Expert LLC, 2010. 18 p. (in Russian).

- Lukatkin A.S. Cold damage to thermophilic plants and oxidative stress. Saransk: Izdatelstvo Mordovskogo universiteta, 2002. 208 p. (in Russian).

- Osman R.K., Goda H.A., Higazy A.M. Evaluation of some extra- and intracellular cyanobacterial extracts as antimicrobial agents // International Journal of Advanced Research. 2015. V. 3. No. 5. P. 852–864.

- Gessler N.N., Egorova A.S., Belozerskaya T.A. Fungal anthraquinones // Applied Biochemistry and Microbiology. 2013. V. 49. No. 2. P. 85–99. doi: 10.1134/S000368381302004X

- Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants // Experimental Physiology. 1997. V. 82. No. 2. P. 291–295. doi: 10.1113/expphysiol.1997.sp004024