

Оценка антиоксидантной активности полифенолов по методу FRAP в присутствии комплексантов

Н.С. Бриленок*, В.И.Вершинин, М.В. Бахарева

Омский государственный университет им. Ф.М. Достоевского,
Российская Федерация, 644077, г. Омск, Мира, 55а

*Адрес для переписки: Бриленок Наталия Сергеевна, E-mail: brilenok@list.ru

Поступила в редакцию 16 июня 2016 г., после исправления – 25 июля 2016 г.

Исследовано влияние посторонних веществ на результаты спектрофотометрического определения антиоксидантов полифенольного типа методом FRAP, основанным на восстановлении Fe(III) полифенолами в присутствии 2,2'-дипиридила. В качестве модельных соединений применяли кверцетин, рутин и галловую кислоту. Оптическую плотность измеряли при 520 нм через 60 минут после смешивания реагентов. Чувствительность определения полифенолов снижается в присутствии фторидов, фосфатов, цитратов, тартратов и других веществ, не формирующих собственные аналитические сигналы, но связывающих ионы Fe³⁺ в прочные комплексные соединения. Влияние комплексантов можно прогнозировать, рассчитывая закомплексованность Fe(III) с учетом концентрации лиганда и значения pH. Увеличение исходной концентрации реагента до 10⁻³ М несколько снижает влияние фторидов, но приводит к побочным процессам с участием фосфатов и салицилатов. Связывание Fe³⁺ комплексами приводит к возникновению мультипликативной систематической погрешности при определении обобщенной антиоксидантной активности (АОА) модельных смесей по градуировочному графику; величина АОА оказывается сильно заниженной. Переход к определению АОА модельных смесей по способу добавок значительно уменьшает влияние всех комплексантов. Поэтому анализ пищевых продуктов, содержащих комплексанты на уровне 10⁻⁴ М и выше, рекомендуется проводить по способу добавок, что ведет к более высоким (на 20-50 %) значениям АОА, чем при использовании традиционных методик анализа тех же продуктов. Для большинства исследованных продуктов различия результатов анализа статистически достоверны. Приблизительная правильность результатов анализа пищевых продуктов по разработанным методикам подтверждена по способу «введено-найдено».

Ключевые слова: анализ пищевых продуктов, полифенолы, комплексанты, метод FRAP, обобщенная антиоксидантная активность, селективность, способ добавок

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2016, vol. 20, no. 3, pp. 209-217

DOI: 10.15826/analitika.2016.20.3.004

Evaluation of polyphenols antioxidant capacity in the presence of complexants by FRAP assay

N.S. Brilenok*, V.I. Vershinin, M.V. Bakhareva

Dostoevsky Omsk State University (OmGU), 55A Mira pr., Omsk, 644077, Russian Federation

*Corresponding author: Nataliia S. Brilenok, E-mail: brilenok@list.ru

Submitted 16 June 2016, received in revised form 25 July 2016

The influence of foreign substances on the results of spectrophotometric determination of polyphenol antioxidants by FRAP assay is investigated. The assay is based on the reduction of Fe³⁺ ions by polyphenols in the presence of 2,2'-dipyridyl. Quercetin, rutin and gallic acid were used as model compounds. The absorbance at 520 nm is measured 60 minutes after mixing the reagents. The sensitivity of polyphenols determination decreases in the presence of fluorides, phosphates, citrates, tartrates and other substances not forming their own analytical signals but binding Fe³⁺ ions in the stable complex compounds. This effect can be predicted by the calculation of complexation degree and taking into account the ligand concentration and pH value. The increase of the initial concentration of Fe(III) up to 10⁻³ M decreases the effect of fluorides,

but leads to side processes involving phosphates or salicylates. Binding of iron(III) leads to the systematic error when the total antioxidant capacity (TAC) is determined with a calibration curve (underestimation). The analysis of model mixtures with the additives method significantly reduces the impact of complexants and the abovementioned error. Foodstuffs which contain 10^{-4} M complexants or more have to be analyzed by the *method* of standard additives, which leads to higher TAC values than using of traditional TAC determination with calibration curve; the difference is about 20–50%. For the majority of examined foodstuffs the difference in the mean results for these analytical methods is statistically valid. The accuracy of the proposed method for some products (wine, beer, tea etc.) was confirmed with the *added–found standard technique*.

Keywords: foodstuff, food analysis, polyphenols, complexants, FRAP assay, antioxidant activity, selectivity, method of additives.

Введение

Важный показатель качества пищевых продуктов, биообъектов и лекарственных препаратов – обобщенная антиоксидантная активность (АОА). Этот интегральный показатель, выраженный в пересчете на стандартное вещество $X_{ст}$, является приблизительной оценкой суммарного содержания антиоксидантов-восстановителей, преимущественно полифенолов [1]. Тот же показатель нередко называют антиоксидантной емкостью (ТАС). Нередко этот показатель определяют методом **FRAP**, основанным на восстановлении железа(III) полифенолами в присутствии лигандов **R**, дающих окрашенные комплексы с ионами Fe^{2+} . Возникающий аналитический сигнал (A_{Σ}) измеряют в видимой области спектра через τ минут после смешивания растворов. Показатель АОА (c^*) находят по градуировочному графику, построенному по растворам $X_{ст}$ (тролокс, кверцетин, галловая или аскорбиновая кислота). При большом избытке $Fe(III)$ сигналы полифенолов аддитивны, поэтому по величине АОА можно судить о суммарном содержании полифенолов (c_{Σ}) [2]. В ходе анализа реальных объектов полифенолы от матрицы не отделяют.

Первоначально термин FRAP подразумевал применение трипиридилтриазина (**TPTZ**), позднее термин стали использовать в более широком смысле, независимо от природы **R** (см. обзор [3]). Замена TPTZ о-фенантролином, 2,2'-дипиридилом или феррозином расширяет возможности метода в связи с повышением редокс-потенциала системы $Fe(II)/Fe(III)$ [4–6]. Простой, воспроизводимый и чувствительный метод FRAP используют для оценки качества вин и чая [6–8], хотя нормативные значения АОА для этих продуктов в России не установлены. Тот же метод применяют для сопоставления пищевой ценности разных пищевых продуктов; опубликована сводка значений АОА для 3100 продуктов [9].

Метод FRAP имеет и некоторые недостатки:

- термин «железозовосстанавливающая способность» (FRAP) можно использовать не только как характеристику содержания полифенолов и других антиоксидантов (антиоксидантной активности, антиоксидантной емкости), но и как оценку содержания других сильных восстановителей, не встречающихся в продуктах питания или биообъектах;
- чувствительность определения разных полифенолов по методу FRAP неодинакова, это снижает

точность оценки c_{Σ} [3, 10]. Показатель АОА может сильно отличаться от c_{Σ} , в зависимости от выбора $X_{ст}$, условий измерения A_{Σ} и соотношения разных полифенолов в данной пробе;

- чувствительность определения некоторых антиоксидантов близка к нулю [11];
- измерение АОА в кислой среде не отвечает условиям окисления антиоксидантов *in vivo*; в этом отношении метод FRAP уступает методу CUPRAC [12], основанному на окислении полифенолов соединениями меди(II) в нейтральной среде;
- недостаточно изучено влияние посторонних веществ **Z**. Для снижения матричных эффектов предложено разбавлять пробу в 100–200 раз [7], но этот прием, необходимый в анализе красных сухих вин, не удастся применять в анализе продуктов с низким содержанием полифенольных антиоксидантов. Из числа посторонних веществ особого внимания заслуживают комплексанты, нередко сопутствующие полифенолам и связывающие железо(III) в прочные комплексы. Ряд авторов указывает, что комплексанты затрудняют определение АОА [11]. Фторид натрия даже применяют в качестве «стоп-раствора», останавливая окисление полифенолов перед измерением их обобщенного сигнала [13]. Тем не менее, влияние комплексантов на результаты определения АОА специально не исследовалось. Цель данной работы - проверить селективность метода FRAP и предложить способ определения АОА в присутствии комплексантов.

Методика эксперимента

В качестве модельных соединений применяли три полифенола: кверцетин (**KB**), рутин (**PT**) и галловую кислоту (**ГК**). Исходные растворы готовили по точным навескам реактивов х.ч. Рабочие растворы и модельные смеси готовили в день употребления, разбавляя исходные растворы бидистиллированной водой. Фотометрируемые растворы содержали полифенолы (порознь или в смеси) на уровне 10^{-6} – 10^{-5} М; железо(III) – $8.1 \cdot 10^{-5}$ М, 2,2'-дипиридил – $2.3 \cdot 10^{-4}$ М и, в необходимых случаях, посторонние вещества (монофенольные соединения, нефенольные антиоксиданты, углеводы, белки, неорганические соли, комплексанты). Влияние комплексантов исследовали на примере фторида, фосфата и цитрата натрия, салициловой и винной кислот. Реакцию проводили при $pH = 3.3$ при комнатной темпе-

Таблица 1

Характеристики градуировочных графиков при определении некоторых фенольных соединений

Table 1

Characteristics of calibration curves in the determination of some phenolic compounds

| Название вещества | Область линейности, мкМ | r | $k \cdot 10^3$, мкМ ⁻¹ | $k_{норм}$ | $k_{норм}$ по [10] |
|---------------------------|-------------------------|-------|------------------------------------|------------|--------------------|
| Кверцетин (КВ) | 0.5 – 8.0 | 0.994 | 95.7 | 1.00 | 1.00 |
| Галловая кислота (ГК) | 0.5 – 10 | 0.998 | 69.3 | 0.72 | 0.67 |
| Рутин (РТ) | 0.8 – 8.0 | 0.998 | 53.1 | 0.55 | 0.43 |
| Аскорбиновая кислота (АК) | 0.6 – 15 | 0.999 | 32.2 | 0.34 | 0.41 |
| 1-нафтол (Н) | 1.8 – 20 | 0.999 | 34.0 | 0.36 | - |
| Салициловая кислота (СК) | 0.7 – 18 | 0.998 | 3.4 | 0.04 | - |

Примечание: (-) – отсутствие данных.

ратуре. Порядок смешивания реагентов в мерной колбе всегда был одним и тем же: вначале вносили растворы железа(III) и 2,2-дипиридила, затем раствор комплексанта, воду и в последнюю очередь – раствор исследуемого полифенола, модельную смесь или пробу. Оптическую плотность окрашенных растворов измеряли при 520 нм через 60 минут после смешивания реагентов, используя прибор КФК-3 ($l=2.0$ см). По той же методике измеряли фон, то есть оптическую плотность растворов, содержащих Z в отсутствие полифенолов; при вычислении результатов анализа вносили поправку на фоновое поглощение. О влиянии Z судили по изменению наклона и сдвигу прямолинейных градуировочных графиков, построенных для ГК и КВ в присутствии Z.

Значения АОА модельных смесей и реальных объектов, выраженные в мкмоль или ммоль ГК на 1 дм³, находили по градуировочному графику, построенному по растворам ГК в отсутствие Z. Использовали также способ добавок (расчетный и графический варианты), причем в реакционную смесь вводили 1-3 добавки ГК, увеличивающие сигнал не более чем в 2 раза. Анализируя пищевые продукты, пробоподготовку вели по стандартным методикам; так, настой чая готовили по методике [14]. Добавление в реакционную смесь нескольких миллилитров красного вина или чайного настоя нередко приводит к «зашкаливанию» сигнала, поэтому вина и чайные настои предварительно разбавляли в 100 или 10 раз. Другие напитки анализировали без предварительного разбавления.

При фотометрировании повторно приготовленных растворов в отсутствие Z коэффициенты вариации (W) не превышали 4 % ($n=3$). При фотометрировании Z-содержащих смесей сходимость данных несколько ухудшалась ($W \approx 3-6$ %). Результаты анализа реальных объектов характеризовались значениями W , не превышавшими 5 % при использовании градуировочного графика и 10 % – при использовании метода добавок. Правильность результатов анализа пищевых продуктов проверяли по способу «введено-найдено».

Результаты и их обсуждение

Определение индивидуальных полифенолов. В отсутствие Z градуировочные графики для определения полифенолов по методу FRAP линейны, коэффициенты корреляции (r) превышают 0.99. Для разных полифенолов коэффициенты чувствительности (k) достоверно различаются (табл. 1). Нормированные по кверцетину значения k разных полифенолов примерно соответствуют данным [10]. Окраска комплекса железа(II) с 2,2'-дипиридилем появляется и в присутствии некоторых монофенольных соединений (салициловая кислота и др.), но чувствительность их определения ниже. В тех же условиях определяются многие нефенольные антиоксиданты-восстановители, например, аскорбиновая кислота. Соединения, не обладающие антиоксидантными свойствами *in vivo*, в условиях определения полифенолов раствор не окрашивают (глюкоза, сахароза, фенол, фториды, фосфаты), либо формируют слабую окраску при гораздо более высоких концентрациях. Так, сигнал цитрата натрия (Na_3Cit) возникает на уровне $n \cdot 10^{-4}$ М, а сигнал альбумина – на уровне 0.05 %. Появление окраски в этих случаях можно объяснить как восстановительными свойствами исследуемых веществ, так и недостаточной очисткой реактивов от микропримесей восстановителей, в частности, от полифенолов.

В присутствии посторонних веществ градуировочные графики индивидуальных полифенолов сохраняют прямолинейный характер. На чувствительность определения полифенолов не влияет 100-кратный избыток солей, не обладающих окислительными или восстановительными свойствами, например NaCl или NaNO_3 . Не влияет 10-кратный избыток глюкозы и сахарозы, а также эквимольное количество фенола (гидроксибензола). Выявлено достоверное снижение чувствительности определения индивидуальных полифенолов в присутствии избытка альбумина и комплексантов (рис. 1). Примером может быть влияние фторидов (табл. 2). Рост c_F резко снижает чувствительность определения полифенолов. Влияние фторидов начинает проявляться, когда их концентрация выходит

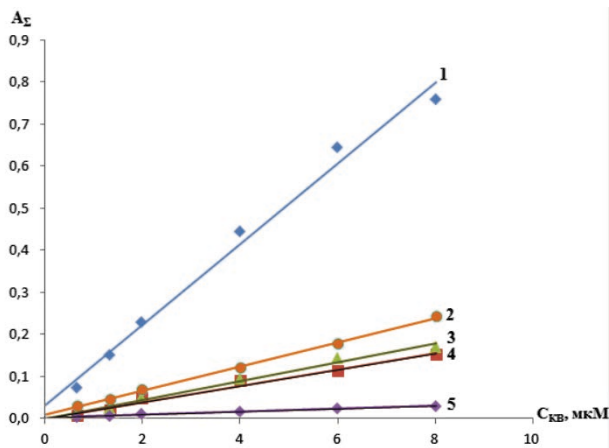


Рис. 1. Влияние комплексантов на чувствительность определения кверцетина: 1 – в отсутствие Z, 2 – KB + салициловая кислота (2.2 мМ), 3 – KB + Na₃PO₄ (2.4 мМ), 4 – KB + цитрат натрия (4.2 мМ), 5 – KB + NaF (7.15 мМ)

Fig. 1. Influence of complexants on the sensitivity of quercetin determination: 1 – in the absence of interfering substances Z, 2 – quercetin + salicylic acid (2.2 mmol), 3 – quercetin + Na₃PO₄ (2.4 mmol), 4 – quercetin + sodium citrate (4.2 mmol), 5 – quercetin + NaF (7.15 mmol)

на уровень $n \cdot 10^{-5}$ М, то есть на порядок превышает концентрацию полифенолов и становится соизмеримой с концентрацией железа(III). При $c_Z/c_{Fe} \geq 10^3$ определение полифенолов затруднено или невозможно ($k_{норм} \rightarrow 0$). Несколько слабее влияет избыток фосфатов.

Влияние некоторых комплексантов можно уменьшить, изначально используя более высокие концентрации железа(III). При $c_{Fe} = 10^{-3}$ М полифенолы можно определять и в присутствии большого избытка фторидов, хотя результат анализа бу-

Таблица 2

Влияние фторидов и фосфатов на чувствительность определения кверцетина и галловой кислоты

Table 2

Effect of fluoride and phosphate on the sensitivity of quercetin and gallic acid determination

| Z | c_Z , мкМ | c_Z/c_{Fe} | $k_{норм}$ (KB) | $k_{норм}$ (ГК) |
|----------|-------------|--------------|-----------------|-----------------|
| Нет | 0 | 0 | 1.00 | 1.00 |
| Фтори-ды | 2.4 | 0.03 | 0.99 | 0.98 |
| | 72 | 0.9 | 0.82 | 0.77 |
| | 720 | 9 | 0.33 | 0.57 |
| | 7200 | 90 | 0.04 | 0.01 |
| | 7200 | 7.2* | 0.24 | 0.14 |
| Фосфа-ты | 2.4 | 0.03 | 0.97 | 0.99 |
| | 24 | 0.30 | 0.65 | 0.76 |
| | 79 | 1.0 | 0.39 | 0.63 |
| | 240 | 3.0 | 0.28 | 0.43 |
| | 2400 | 30 | 0.23 | 0.13 |

Примечание: * – при $c_{Fe} = 10^{-3}$ М. В остальных случаях $c_{Fe} = 8 \cdot 10^{-5}$ М.

дет сильно занижен (табл. 3). Уменьшить влияние фосфатов и салицилатов таким способом не удастся из-за образования малорастворимого фосфата и интенсивно окрашенного моносалицилатного комплекса железа(III).

Полученные данные позволяют предположить, что снижение чувствительности определения полифенолов в присутствии комплексантов не связано с химическим взаимодействием этих веществ, в отличие от влияния альбумина, казеина и других белков, непосредственно реагирующих с полифенолами [15]. Влияние комплексантов можно объяснить связыванием ионов железа(III) лигандами Z, что снижает формальный редокс-потенциал системы Fe(II)/Fe(III) и, соответственно, константы равновесия реакций, в которых Fe(III) является окислителем. Для проверки этого предположения по классическому алгоритму [16] рассчитывали закомплексованность (Φ) ионов Fe³⁺ в присутствии Z. Учитывали общую концентрацию лиганда, побочную реакцию протонирования Z, а также ступенчатый характер комплексообразования. Влиянием ионной силы, связыванием Z ионами железа(II) и связыванием железа(III) с 2,2'-дипиридилем пренебрегали ввиду низкой устойчивости соответствующих комплексов. Значения констант равновесия брали из справочника [17]. Результаты расчетов (значения $\lg \Phi$) сопоставляли с погрешностями определения полифенолов в Z-содержащих растворах (δC_Z). В табл. 3 приведены значения δC_Z для $C_{кв} = 6$ мкМ. Во всех случаях $\delta C_Z < 0$.

Следует отметить, что в этой серии опытов использовались различные Z, взятые в разных концентрациях, тем не менее между вычисленными значениями $\lg \Phi$ и экспериментально найденными значениями δC_Z существует достоверная линейная корреляция ($r = 0,86$ при $r_{крит} = 0,63$). Наличие такой корреляции позволяет прогнозировать влияние дру-

Таблица 3

Влияние закомплексованности железа(III) на погрешность определения кверцетина

Table 3

Effect of Fe(III) complexation degree on the error in quercetin determination

| Комплек-сant | c_Z мкМ | $\lg \Phi$ | δC_Z , % |
|---------------------------------|-----------|------------|------------------|
| Нет | 0 | 0 | 0 |
| СК | 2.2 | 0.5 | -3 |
| СК | 22 | 1,4 | -11 |
| СК | 440 | 2,7 | -78 |
| Na ₃ PO ₄ | 240 | 2,2 | -77 |
| Na ₃ PO ₄ | 2400 | 3,2 | -81 |
| Na ₃ Cit | 420 | 3,5 | -81 |
| Na ₃ Cit | 4200 | 4,5 | -86 |
| NaF | 715 | 4,1 | -71 |
| NaF | 7150 | 6,8 | -100 |
| NaF* | 7150 | 6,8 | -74 |

Примечание: * – при увеличении c_{Fe} до 10^{-3} М.

Таблица 4

Проверка аддитивности сигналов и правильности определения АОА в модельных смесях (в отсутствие комплексантов)

Table 4

Checking signals additivity and the correctness of TAC determination for model mixtures (in the absence of complexants)

| № смеси | с, мкМ | | | | Оптическая плотность, 10 ⁻³ | | | | Значимость ΔА | АОА, мкМ | δC ₀ , % |
|---------|--------|------|------|----------------|--|-----------------|------|------------------|---------------|----------|---------------------|
| | КВ | ГК | РТ | c _z | A _z | ΣA _i | ΔА | 3S _{AΣ} | | | |
| 1 | 2.00 | 2.15 | - | 4.15 | 478 | 470 | 8 | 12 | - | 5.16 | 24 |
| 2 | - | 3.22 | 1.11 | 4.33 | 417 | 419 | 2 | 6 | - | 4.23 | -2.3 |
| 3 | 2.00 | 1.07 | 1.11 | 4.18 | 462 | 453 | 9 | 12 | - | 4.74 | 13 |
| 4 | 3.34 | 1.07 | - | 4.41 | 526 | 536 | -10 | 11 | - | 5.47 | 24 |
| 5 | 1.34 | 3.22 | - | 4.56 | 488 | 478 | 10 | 30 | - | 5.04 | 10 |
| 6 | - | 10.7 | 10.3 | 21.0 | 938 | 1334 | -396 | 5 | + | 10.2 | -51 |
| 7 | 20.0 | 10.2 | - | 30.2 | 959 | 1685 | -726 | 23 | + | 10.4 | -66 |

Примечания: отклонения от аддитивности значимы при ΔА = (A_z - ΣA_i) > 3S_{AΣ}; погрешность δC₀ рассчитывали по формуле δC₀ = 100 (АОА - C_z) / C_z.

гих комплексантов, кроме активных окислителей или восстановителей. Так, судя по константам устойчивости, в присутствии тартратов (3.26 мМ) закомплексованность железа(III) при рН = 3.3 весьма велика (lg Φ = 3.7). Это должно приводить к сильно заниженным результатам анализа. Прогноз подтвердился: значение δC_z для КВ составило -84%. Примерно так же влияют тартраты на чувствительность и результаты определения других полифенолов.

Линейная взаимосвязь δC_z и lg Φ искажается лишь при очень высоких Φ, когда соответствующий график выходит на плато. Следует также учесть, что, кроме lg Φ, на δC_z могут влиять кинетические факторы. А именно, за счет стерических факторов скорость реакции между Fe(III) и полифенолами в присутствии Z должна снижаться. При фиксированном значении τ это должно приводить к заниженным результатам анализа, независимо от устойчивости образующихся комплексов.

Оценка АОА модельных смесей. Показатель АОА определяли, измеряя обобщенные аналитические сигналы полифенольных смесей известного состава и пересчитывая A_z на концентрацию ГК по градуировочному графику. Аддитивность сигналов проверяли по 3S-критерию [18]. Если общее содержание полифенолов в смеси ниже 10 мкМ, а содержание железа(III) превышает его на порядок и более, отклонения от аддитивности статистически незначимы. Значимые отклонения, наблюдаемые при c_z > 10 мкМ (табл. 4), можно объяснить нехваткой Fe(III) для одновременного окисления разных полифенолов [3].

Из-за разной чувствительности определения компонентов анализируемой смеси величина АОА даже в отсутствие Z достоверно отличается от суммарного содержания полифенолов. Возникающая систематическая погрешность δC₀ в зависимости от состава смеси принимает как положительные, так и отрицательные значения (табл. 4),

которые для аддитивных смесей можно прогнозировать по алгоритму [10]:

$$\delta C_0 = 100 (АОА - c_z) / c_z \quad (1)$$

Определение АОА полифенольных смесей в присутствии комплексантов (или белков) по градуировочному графику, построенному при c_z = 0, ведет к появлению дополнительной систематической погрешности δC_z. Считая результат определения АОА при c_z = 0 опорным значением (АОА₀), мы оценивали дополнительную погрешность по формуле

$$\delta C_z = 100 (АОА - АОА_0) / АОА_0 \quad (2)$$

Установлено, что погрешность δC_z хорошо воспроизводима, имеет мультипликативный характер, отрицательна и нередко превышает δC₀ по модулю. При прочих равных условиях величина δC_z тем выше, чем больше c_z (табл. 5). При concentra-

Таблица 5

Влияние комплексантов на точность оценки АОА аддитивной смеси КВ-ГК (4.23 мкМ) по градуировочному графику

Table 5

Effect of complexants on the accuracy of the TAC estimation of quercetin - gallic acid (4.23 M) with a calibration curve

| Z | c _z , мкМ | АОА мкМ | δC _z , % |
|---------------------------------|----------------------|-----------------|---------------------|
| нет | 0 | 5.16 ± 0.17 | 0 |
| Na ₃ PO ₄ | 79 | 1.61 ± 0.03 | - 69 |
| | 237 | 1.17 ± 0.04 | - 77 |
| | 2370 | 0.40 ± 0.03 | - 92 |
| Na ₃ Cit | 42 | 4.21 ± 0.15 | -18 |
| | 420 | 0.26 ± 0.19 | - 95 |
| | 4200 | не определяется | |
| NaF | 71,5 | 4.72 ± 0.07 | -8 |
| | 715 | 1.33 ± 0.16 | -74 |
| | 7150 | не определяется | |

Таблица 6

Результаты анализа смеси КВ + ГК ($c_z = 4.15$ мкМ; $AOA_0 = 5.16$ мкМ) в присутствии фосфатов при разных способах расчета АОА

Table 6

Results of the mixture analysis: quercetin - gallic acid ($C_z = 4.15$ μmol ; $TAC = 5.16$ μmol) in the presence of phosphates with different ways of calculating the TAC value

| C_z , мкМ | По градуировочному графику | | По методу добавок (расчетный вариант, одна добавка) | | По методу добавок (графический вариант, две добавки) | |
|-------------|----------------------------|------------------|---|------------------|--|------------------|
| | АОА, мкМ | δC_z , % | АОА, мкМ | δC_z , % | АОА, мкМ | δC_z , % |
| 79 | 1.61 ± 0.03 | - 69 | 4.37 | -15 | 4.33 | -16 |
| 237 | 1.17 ± 0.04 | - 77 | 4.26 | -17 | 4.39 | -15 |
| 790 | 0.85 ± 0.04 | - 84 | 4.41 | -15 | 4.54 | -12 |

Примечание: во всех случаях стандартным веществом $X_{\text{ст}}$ является ГК.

циях фторидов и цитратов на уровне $n \cdot 10^{-3}$ М АОА вообще не определяется (A_z на уровне фона). Таким образом, комплексанты влияют на результаты определения АОА приблизительно так же, как и на результаты определения индивидуальных полифенолов.

Для уменьшения мультипликативных систематических погрешностей результаты анализа нередко рассчитывают по способу добавок [19]; этот способ был применен и в данном случае. Если влияние комплексантов на результаты определения полифенолов объясняется связыванием железа(III), то аналитические сигналы полифенолов, изначально присутствующих в пробе, должны снижаться в той же степени, что и сигналы ГК, которую вводили в качестве добавки. Очевидно, переход к определению АОА по способу добавок должен повышать правильность анализа Z-содержащих модельных смесей по сравнению с определением АОА тех же

смесей по градуировочному графику. Подтверждением могут быть данные по определению АОА модельной смеси, полученные двумя способами в присутствии фосфатов (табл. 6). Аналогичные результаты были получены для смесей, содержащих другие полифенолы и другие комплексанты; использование метода добавок всегда приводило к более высоким значениям АОА. Отметим, что в отсутствие комплексантов значения АОА, полученные разными методами, приблизительно совпадают. Например, анализ единичной пробы ($c_z = 4.30$ мкМ) по методу добавок привел к АОА = (4.42 ± 0.29) мкМ, а анализ по градуировочному графику дал АОА = (4.45 ± 0.04) мкМ.

Как видно из табл. 6, полностью исключить погрешность δC_z за счет применения метода добавок не удастся, однако, независимо от природы Z, погрешность δC_z по модулю уменьшается в 3-4 раза. При этом величина АОА приближается к действительному содержанию полифенолов. Поэтому в дальнейшем мы анализировали пищевые продукты, используя способ добавок, несмотря на большую трудоемкость соответствующей методики и несколько худшую сходимость результатов.

Анализ пищевых продуктов. В присутствии предварительно разбавленного красного сухого вина (рис. 2) или настоя черного чая градуировочные графики для определения индивидуальных полифенолов сохраняют свой линейный характер. Наклон этих графиков тем меньше, чем больше вина или чая вводится в пробу, как и при добавлении комплексантов. Одновременно график сдвигается вверх по оси ординат, как при добавлении других полифенолов. Сдвиг графика тем больше, а чувствительность определения полифенолов тем меньше, чем больше вина или чайного настоя введено в реакционную смесь. Влияние чайного настоя на чувствительность определения полифенолов проявляется в меньшей степени, чем влияние вина.

Наблюдаемые эффекты легко объяснить, если учесть, что в винах содержатся не только антиоксиданты, но и комплексанты, в частности винная кислота [1, 11, 20]. В условиях анализа вина по ме-

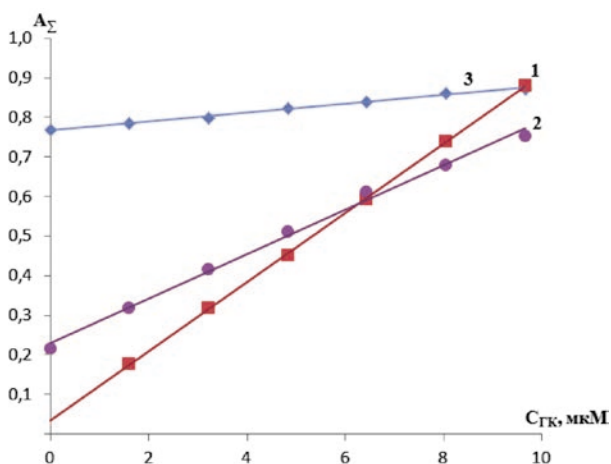


Рис. 2. Влияние содержания вина «Cabernet Merlot» на чувствительность определения ГК: 1 – без вина, 2 – в присутствии 2.0 cm^3 вина (разбавление 1 : 100), 3 – в присутствии 2.0 cm^3 вина (1 : 10)

Fig. 2. Influence of «Cabernet Merlot» wine on the determination sensitivity of gallic acid: 1 – without wine, 2 – in the presence of 2.0 cm^3 of wine (dilution 1 : 100), 3 – in the presence of 2.0 cm^3 of wine (1 : 10)

Таблица 7

Результаты анализа некоторых пищевых продуктов по градуировочному графику (А) и по способу добавок (Б)

Table 7

Results of foodstuffs analysis by a calibration curve (A) and method of additives (B)

| Продукт и торговая марка | Разбавление | Объем аликвот, см ³ | АОА (мМ), в пересчете на ГК | | W, % | |
|---|-------------|--------------------------------|-----------------------------|-------------|------|-----|
| | | | А | Б | А | Б |
| Вино красное сухое «Cabernet-Merlot» | 1:100 | 2.0 | 10.6 ± 0.6 | 12.5 ± 0.9 | 2.0 | 3.0 |
| Вино белое полусладкое «Lieb Arau Liedlein» | 1:100 | 2.0 | 6.2 ± 0.3 | 6.9 ± 0.1 | 1.8 | 1.6 |
| | | 4.0 | 5.2 ± 0.2 | 6.8 ± 0.4 | 1.5 | 2.6 |
| Вино красное сухое «Каберне» | 1:100 | 4.0 | 6.3 ± 0.2 | 7.2 ± 0.1 | 1.5 | 0.6 |
| Настой чая черного (листового) «Ahmad tea» | 1:100 | 2.0 | 3.9 ± 0.3 | 4.3 ± 0.3 | 3.0 | 3.0 |
| Настой чая черного (листового) «Lipton» | 1:100 | 4.0 | 3.4 ± 0.4 | 3.7 ± 0.5 | 4.6 | 4.9 |
| Сок яблочный «J7» | - | 1.5 | 0.44 ± 0.01 | 0.66 ± 0.04 | 0.9 | 2.3 |
| Пиво светлое «Carlsberg» | - | 1.0 | 0.28 ± 0.02 | 0.52 ± 0.06 | 2.5 | 4.6 |

тоту FRAP винная кислота и ее анионы (тарtrate) не восстанавливают железо(III), но связывают его в довольно прочный комплекс [17]. Отметим, что некоторые компоненты пищевых продуктов (танины, салицилаты) могут выступать и в качестве антиоксидантов, и в качестве комплексантов.

Очевидно, присутствие комплексантов в пищевых продуктах должно приводить к заниженным результатам определения АОА по градуировочному графику. Как и в случае анализа модельных смесей, это влияние может быть уменьшено, если использовать способ добавок. Данное предположение было подтверждено в эксперименте (табл. 7). При прочих равных условиях способ добавок приводил к более высоким значениям АОА исследованных продуктов, чем анализ по градуировочному графику. Различия средних статистически достоверны, за исключением данных по настоям черного чая. Приблизительная правильность результатов анализа, полученных по способу доба-

вок, была подтверждена с применением способа «введено-найденно» (табл. 8).

Заключение

Полученные нами данные показывают, что традиционные методики оценки антиоксидантной активности пищевых продуктов по методу FRAP, основанные на применении градуировочных графиков и не включающие операции отделения комплексантов или сильного разбавления исходной пробы, могут приводить к заниженным значениям АОА. Причем действительный уровень антиоксидантной активности пищевого продукта в присутствии комплексантов не снижается, в отличие от известного эффекта снижения АОА в присутствии белков [15]. Дело в том, что комплексанты действуют по иному механизму, их влияние объясняется связыванием аналитического реагента (ионов железа), а не самого субстрата. Следовательно, влияние комплексантов проявляется только при опре-

Таблица 8

Проверка правильности результатов анализа пищевых продуктов по способу «введено-найденно»

Table 8

Accuracy of foodstuffs analysis: testing with the *added-found standard technique*

| Пищевой продукт | АОА ^а , мг/дм ³ | Добавка ГК, мг/дм ³ | Найдено с добавкой, мг/дм ³ | Найдено в добавке, мг/дм ³ | Погрешность δ С, % |
|---|---------------------------------------|--------------------------------|--|---------------------------------------|---------------------------|
| Вино красное сухое «Cabernet-Merlot» | 22.5 ± 1.0 | 7.1 | 28.8 ± 0.6 | 6.3 ± 1.2 | -11 |
| Вино белое полусладкое «Lieb Arau Liedlein» | 13.3 ± 0.9 | 7.1 | 20.0 ± 1.4 | 6.7 ± 1.7 | -5.6 |
| Настой чая черного «Ahmad tea» | 9.6 ± 0.7 | 7.1 | 15.9 ± 0.4 | 6.3 ± 0.8 | -11 |

Примечание: АОА^а - антиоксидантная активность продукта, разбавленного в 100 раз, в пересчете на ГК.

делении показателя АОА, а не в условиях *in vivo*, когда ионы Fe(III) отсутствуют или их концентрация ничтожно мала.

Систематическая составляющая общей неопределенности АОА, обусловленная влиянием комплексантов (величина δC_z) может быть существенно уменьшена, если определять АОА по способу добавок. Это позволяет разработать, аттестовать и использовать в практике новые методики оценки АОА пищевых продуктов, устойчивые к присутствию комплексантов. Результаты соответствующих исследований будут приведены в следующих сообщениях.

Следует подчеркнуть, что влияние комплексантов, содержащихся в пищевых продуктах, на результаты определения АОА проявляется только при достаточно высокой концентрации Z (более 10^{-5} М в конечном разбавлении). Если априорно известно, что анализируемый продукт содержит очень мало комплексантов или вовсе не содержит их, применять трудоемкий способ добавок нецелесообразно. Правильные значения АОА в таких случаях легко получить и по градуировочному графику. С другой стороны, даже применение способа добавок не может гарантировать правильную оценку суммарного содержания полифенолов, поскольку для этого надо устранить и вторую составляющую общей неопределенности (величину δC_0), связанную с разной чувствительностью определения индивидуальных полифенолов по методу FRAP. Пути решения этой, намного более сложной задачи обсуждаются в работе [21]

Благодарности

Авторы выражают благодарность докторам химических наук Х.З. Брайниной и И.В. Власовой за участие в обсуждении полученных данных. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 16-43-550479, 2016 г.) и Минобрнауки (в рамках госзадания № 2014/147, 2016 г.).

Acknowledgements

The authors thank Doctors of Chemistry Kh.Z. Braynina and I.V. Vlasova for their participation in the discussion of the obtained data. This work was financially supported by RFBR (grant 16-43-550479, 2016) and the Ministry of Education (in the framework of state job-number 2014/147, 2016).

ЛИТЕРАТУРА

1. Природные антиоксиданты. Содержание в пищевых продуктах и их влияние на здоровье и старение человека / Я.И. Яшин [и др.]. М.: Транслит, 2009. 212 с.
2. 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, № 1. P. 70-76.

3. Определение суммарного содержания антиоксидантов методом FRAP / Т.Г.Цюпко [и др.] // *Аналитика и контроль.* 2011. Т. 15, № 3. С. 287-298.
4. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine and ferricyanide reagents / K.I. Berker [et al.] // *Talanta.* 2007. V. 72. P. 1157-1165.
5. A novel antioxidant assay of ferric reducing capacity measurement using ferrozine as the colour forming complexation reagent / K.I. Berker [et al.] // *Anal. Methods.* 2010. V. 2. P. 1770-1778.
6. Определение антиоксидантной активности сухих красных вин для оценки их качества / Т.Г. Цюпко [и др.] // *Зав. лаборатория. Диагностика материалов.* 2008. Т. 74, № 6. С. 14-20.
7. Оценка антиоксидантной активности пищевых продуктов с использованием индикаторной системы на основе фенантролиновых комплексов железа / Т.Г. Цюпко [и др.] // *Известия вузов. Пищевая промышленность.* 2011, № 5. С. 84-87.
8. Benzie, I.F.F., Szeto Y.T. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing / antioxidant power assay // *J. Agric. and Food Chem.* 1999. V. 47, № 2. P. 633-636.
9. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide / M.H. Carlsen [et al.] // *Nutritional Journal.* 2010. V. 9, № 1.
10. Vershinin V.I., Brilenok N.S., Tsytko T.G. Methodology of the spectrophotometric analysis of organic mixtures: error of estimating total analyte concentrations taking into account their sensitivity coefficients // *J. Analyt. Chem.* 2012. V. 67, № 7. P. 649-654.
11. Karadag A., Oselic B., Saner S. Review of methods to determine antioxidants capacities // *Food analytical methods.* 2009. № 2. P. 41-60.
12. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay / R. Apak [et. al.] // *Molecules.* 2007. V.19, № 7. P. 1496 -1547.
13. Определение антиоксидантной активности ряда пищевых продуктов с использованием индикаторной системы Fe(III) / Fe(II) – органический реагент / З. А.Темердашев и [др.] // *Зав. лаборатория. Диагностика материалов.* 2006. Т. 72, № 11. С. 12-16.
14. ГОСТ 19885-74. Чай. Методы определения содержания танина и кофеина. М.: Стандартинформ. 2009. 5 с.
15. Ziyatdinova G., Nizamova A., Budnikov H. Novel coulometric approach to evaluation of total free polyphenols in tea and coffee beverages in presence of milk proteins // *Food Anal. Meth.* 2011. V. 4, № 3. P. 334.
16. Бабко А.К. Физико-химический анализ комплексных соединений в растворах (оптический метод). Киев: АН УССР, 1955. 328 с.
17. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. М.: Химия, 1989. 448 с.
18. Вершинин В.И., Власова И.В., Цюпко Т.Г. Выявление отклонений от аддитивности в спектрофотометрическом анализе неразделенных смесей // *Методы и объекты химического анализа,* 2010. Т. 5, № 3. С. 130 -138.
19. Гармаш А.В., Сорокина Н.М. Метрологические основы аналитической химии. М.: МГУ. 2012. С. 26-27.
20. Рогинский, В.А. Фенольные антиоксиданты. Реакционная способность и эффективность. М.: Наука, 1988. 247 с.
21. Vershinin V.I. Total indices as a tool to estimate sum content of similar analytes. Review // *Talanta.* 2015. V. 131, № 1. P. 293-300.

REFERENCES

1. Yashin Ya.I., Ryzhnev V.Yu., Yashin A.Ya., Chernousova N.I. *Prirodnye antioksidanty. Soderzhanie v pishchevykh produktakh i ikh vliianie na zdorov'e i starenie cheloveka* [Natural antioxidants. The content in foods and their effect on the health of the human and aging]. Moscow, Translit publ., 2009, 212 p. (in Russian).
2. Benzie I.F.F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 1996, vol. 239, no. 1, pp.70-76.
3. Tsiupko T.G., Petrakova I.V., Brilenok N.V., Nikolaeva N.A., Chuprynina D.A., Temerdashev Z.A., Vershinin V.I. [Determination of the total content of antioxidants by FRAP assay], *Analitika i kontrol* [Analytics and control], 2011, vol. 15, no. 3, pp. 287-298 (in Russian).
4. Berker K.I., Guclu K., Tor I., Apak R. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine and ferricyanide reagents]. *Talanta*, 2007, vol. 72, pp. 1157-1165. doi: 10.1016/j.talanta.2007.01.019
5. Berker K.I., Guclu K., Demirata B., Apak R. A novel antioxidant assay of ferric reducing capacity measurement using ferrozine as the colour forming complexation reagent. *Analytical Methods*, 2010, vol. 2, pp.1770-1778. doi: 10.1039/c0ay00245c
6. Tsiupko T.G. [Determination of the antioxidant activity of dry red wines for assessment of their quality]. *Zavodskaya laboratoriya. Diagnostika materialov* [Factory laboratory. The diagnosis materials], 2008, vol. 74, no. 6, pp.14-20 (in Russian).
7. Tsiupko T.G., Chuprynina D.A., Nikolaeva N.A., Voronova O.B., Temerdashev Z.A. [Evaluation of antioxidant activity foodstuff using a system based on iron complexes fenantrolinatyh]. *Izvestiya vuzov. Pishchevaia promyshlennost'* [Proceedings of the universities. food processing industry], 2011, no. 5, pp. 54-57 (in Russian).
8. Benzie I.F.F., Szeto Y.T. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing / antioxidant power assay. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 1999, vol. 47, no. 2, pp. 633-636. doi:10.3989/gya.2008.v59.i3.516
9. Carlsen M.H., Bohn S.K., Dragland S., Sampson L., Willet C., Senoo H., Umezono Y., Sanada C., Barikmo I., Berhe N., Willett W.C., Phillips K.M., Jacobs D.R., Blomhoff R. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutritional Journal*, 2010, vol. 9, no. 1. Available at: <http://www.nutritionj.com/content/9/1/3>. doi: 10.1186/1475-2891-9-3.
10. Vershinin V.I., Brilenok N.S., Tsytko T.G. Methodology of the spectrophotometric analysis of organic mixtures: error of estimating total analyte concentrations taking into account their sensitivity coefficients. *Journal Analytical Chemistry*, 2012, vol. 67, no. 7, pp. 649-654. doi: 10.1134/S1061934812010052.
11. Karadag A., Oselic B., Saner S. Review of methods to determine antioxidants capacities. *Food analytical methods*, 2009, no. № 2, pp. 41-60. doi: 10.1007/s12161-008-9067-7.
12. Apak R., Guclu K., Demirata B., Ozyurek M., Celik S.E., Bektasoglu B., Berker K.I., Ozyurt D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 2007, vol.19, no. 7, pp.1496 -1547.
13. Temerdashev Z. A., Khrapko N. V., Tsiupko T. G., Voronova O. B., Balaba A. N. [Determination of antioxidant activity of food using systems Fe (III) / Fe (II) - organic reagent], *Zavodskaya laboratoriya. Diagnostika materialov* [Factory laboratory. The diagnosis materials], 2006, vol. 72, no. 11, pp. 12-16 (in Russian).
14. GOST 19885-74. *Chai. Metody opredeleniia soderzhaniiia tannina i kofeina*. [State Standart 19885-74. Tea. Methods for determination of tannin and caffeine]. Moscow. Standartinform Publ., 2009. 5 p. (in Russian).
15. Ziyatdinova G., Nizamova A., Budnikov H. Novel coulometric approach to evaluation of total free polyphenols in tea and coffee beverages in presence of milk proteins. *Food Analytical Methods*, 2011, vol. 4, no. 3, p. 334. doi: 10.1007/s12161-010-9174-0
16. Babko A.K. *Fiziko-khimicheskii analiz kompleksnykh soedinenii v rastvorakh (opticheskii metod)* [Physico-chemical analysis of complex compounds in solutions (optical method)]. Kiev, AN USSR publ., 1955. 328 p. (in Russian).
17. Lur'e Yu.Yu. *Spravochnik po analiticheskoi khimii* [Guide to analytical chemistry]. Moscow, Khimiia publ., 1989. 448 p. (in Russian).
18. Vershinin V.I., Vlasova I.V., Tsiupko T.G. [Detection of deviations from additivity in spectrophotometric analysis of unseparated mixtures]. *Metody i ob'ekty khimicheskogo analiza* [Methods and objects of the chemical analysis], 2010, vol. 5, no. 3, pp. 130 -138 (in Russian).
19. Garmash A.V., Sorokina N.M. *Metrologicheskie osnovy analiticheskoi khimii* [Metrological basics of the analytical chemistry]. Moscow, MGU publ., 2012. pp. 26-27 (in Russian).
20. Roginskii V.A. *Fenol'nye antioksidanty. Reaktivnost' i effektivnost'* [Phenolic antioxidants. Reactivity and efficiency]. Moscow, Nauka, 1988. 247 p. (in Russian).
21. Vershinin V.I. Total indices as a tool to estimate sum content of similar analytes. Review. *Talanta*, 2015, vol.131, no. 1, pp. 293-300. doi: 10.1016/j.talanta.2014.07.102