

Интервальные оценки суммарного содержания антиоксидантов при разных способах проведения анализа

В.И. Вершинин

ФГАОУ ВО «Омский государственный университет им. Ф.М. Достоевского»,
Российская Федерация, 644077, г. Омск, пр. Мира, 55а

Адрес для переписки: Вершинин Вячеслав Исаакович. E-mail: vyvershinin@yandex.ru

Поступила в редакцию 06 декабря 2023 г., после доработки – 04 января 2024 г.

Определение суммарного содержания (c_z) однотипных аналитов, выраженного в пересчете на стандартное вещество X_{st} – широко применяемая, но метрологически некорректная измерительная процедура, ведущая к большим систематическим погрешностям (неопределенности типа В). Альтернативой является интервальная оценка c_z (В.И. Вершинин и соавт., 2016), не требующая пересчета на X_{st} и намного меньше, чем интегральные показатели, зависящая от природы и соотношения компонентов искомой группы, присутствующих в пробе. Такие оценки применяют для определения суммарного содержания антиоксидантов (АО) в пищевых продуктах. Однако не ясно, как зависят эти оценки от выбора группового реагента и методики измерений. Чтобы найти ответ на этот вопрос, готовили и анализировали смеси АО с известными значениями c_z порядка 10^{-5} – 10^{-4} моль/л. Обобщенные сигналы измеряли спектрофотометрическим методом по методикам Фолина-Чокальтеу (ФЧ) и FRAP, а затем вычисляли и сопоставляли традиционные и интервальные оценки c_z . Для всех модельных смесей действительные значения c_z оказались в границах вычисленных интервалов, причем в случае ФЧ интервалы были шире и сдвинуты в сторону больших значений c_z . Методику FRAP модифицировали (выражение концентрации АО в моль-экв/л, уменьшение времени экспозиции, замена вспомогательного реагента), что сблизило коэффициенты чувствительности индивидуальных АО и втрое уменьшило относительную ширину интервалов. Модифицированную методику FRAP использовали для группового анализа вин, чайных настоев и соков. Получены и сопоставлены интервальные оценки c_z . Обсуждаются нерешенные проблемы и актуальные направления исследований в области интервальных оценок.

Ключевые слова: групповой анализ, пищевые продукты, общее содержание антиоксидантов, методика FRAP, методика Фолина-Чокальтеу, интегральные показатели, интервальные оценки.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2024, vol. 28, no. 1, pp. 16-26

DOI: 10.15826/analitika.2024.28.1.002

Interval estimates of total content of antioxidants for different analytical assays

V. I. Vershinin

Dostoevsky Omsk State University, 55a Mira Ave., Omsk, 644077, Russian Federation

Corresponding author: Viacheslav I. Vershinin, E-mail: vyvershinin@yandex.ru

Submitted 16 December 2023, received in revised form 04 January 2024

Determination of total content (c_z) of similar analytes recalculated to the standard substance X_{st} is a commonly used but metrologically incorrect measuring procedure leading to significant systematic errors (B-type uncertainty). Interval estimate c_z is an alternative method (V.I. Vershinin et al., 2016) not requiring recalculation to X_{st} and, in difference from calculating total indices, slightly depending on the nature and ratio of the sought group components present in the sample. Such estimates are used for evaluating total content of antioxidants (AO) in foodstuffs. However, the dependence of these estimates on the choice of group reagent and signal measuring procedure is uncertain. To address this question, model mixtures of AO with known c_z values ranging from 10^{-5} to 10^{-4} mol/L were prepared and examined. Generalized signals were measured spectrophotometrically using Folin-Ciocalteu (F-C) and FRAP assays, and traditional and interval estimates

of c_{Σ} were calculated and compared. The true values of c_{Σ} were within the respective intervals for all model mixtures; in case of F-C assay the intervals were wider and shifted towards higher c_{Σ} values. The FRAP procedure was modified by using AO-concentrations in mol-eq/L, reducing the reaction time and substituting the auxiliary reagent. This modification successfully leveled the sensibility coefficients of individual AOs and made the relative width of intervals three times as narrower. Modified FRAP assay was used for group analysis of wines, black tea infusions and juices. Corresponding interval estimates of c_{Σ} were obtained and compared. Unresolved issues and future research directions related to interval estimates are discussed.

Key words: group analysis, foodstuffs, total content of antioxidants, FRAP assay, Folin-Ciocalteu assay, total indices, interval estimates.

ВВЕДЕНИЕ

Суммарные содержания (c_{Σ}) однотипных органических соединений обычно определяют, не разделяя аналиты. Для этого измеряют обобщенный сигнал этих соединений (A_{Σ}), например, оптическую плотность при выбранной длине волны; строят градуировку по растворам стандартного вещества $X_{\text{ст}}$ и по ней находят интегральный показатель группового состава (ИП), например общий белок или фенольный индекс. Значения ИП (c^*) выражают в единицах концентрации $X_{\text{ст}}$. При правильном выборе $X_{\text{ст}}$ $c^* \approx c_{\Sigma}$ [1]. Однако оценка c_{Σ} в единицах измерения другой физической величины метрологически некорректна и ведет к большим систематическим погрешностям (неопределенность типа В) [2]. Относительные погрешности (δc) нередко составляют десятки и даже сотни процентов

$$\delta c = 100 (c^* - c_{\Sigma}) / c_{\Sigma} \quad (1)$$

Проблема правильности результатов группового анализа особенно актуальна при определении суммарного содержания ЕТ-антиоксидантов в пищевых продуктах. В отличие от НАТ-антиоксидантов, ЕТ-антиоксиданты (например, флавоноиды) являются сильными восстановителями и связывают активные формы кислорода не за счет переноса протонов, а за счет переноса электронов [3]. Для оценки суммарного содержания ЕТ-антиоксидантов раствор пробы обрабатывают групповым реагентом-окислителем, что приводит к образованию окрашенных продуктов и формированию обобщенного сигнала. Результатами анализа являются интегральные показатели антиоксидантной активности (емкости), выраженные в пересчете на аскорбиновую кислоту, галловую кислоту, тролокс и др. Примерами могут быть показатели FRAP, TEAC, F-C, CUPRAC и другие (см. обзор [4]). Для единичной пробы разные показатели антиоксидантной активности не равны друг другу, а для совокупности проб зачастую не коррелируют друг с другом [5]. Значение любого ИП зависит не только от c_{Σ} и выбора $X_{\text{ст}}$, но и от природы и соотношения компонентов искомой группы, присутствующих в пробе. При переходе к другой пробе эти характеристики меняются, что и порождает неопределенность типа В, которую следует оценивать нестатистическими методами [2]. Это не мешает сопоставлять по значениям ИП суммарные содержания АО в однотипных объектах, например в разных образцах черного чая, так как

набор индивидуальных АО в этих образцах приблизительно постоянен [6]. Однако сопоставлять таким образом разнотипные объекты опасно, так как они могут содержать разные наборы АО. Та же причина мешает сопоставлять найденные в лаборатории значения c^* с нормативными значениями c_{Σ} . Очевидно, экспрессные и прецизионные методики измерения антиоксидантной активности не позволяют надежно контролировать суммарное содержание АО в пищевых продуктах. Нужны альтернативные способы, не требующие выражения результата анализа в единицах концентрации $X_{\text{ст}}$.

Одним из таких способов является расчет интервалов возможных значений c_{Σ} [7]. В отличие от ИП, при фиксированном значении c_{Σ} результат анализа, выраженный в интервальной форме, почти не зависит от природы и соотношения компонентов искомой группы, присутствующих в единичной пробе. Это повышает надежность оценки суммарного содержания АО, поэтому интервальные оценки используют в анализе пищевых продуктов [8, 9]. Однако не ясно, в какой степени эти оценки зависят от выбора группового реагента и способа измерения обобщенного сигнала. Не ясно также, как уменьшить относительную ширину интервала возможных значений c_{Σ} . Цель данного исследования - получить ответы на эти вопросы.

В ходе эксперимента анализировали модельные смеси ЕТ-антиоксидантов и пищевые продукты. Аналитические сигналы измеряли по двум методикам, часто применяемым в анализе пищевых продуктов, - по методике Фолина-Чокальтеу (ФЧ, F-C) [10] и по методике FRAP (ferric reducing antioxidant power) [11, 12]. Для каждой пробы находили интервалы возможных значений c_{Σ} , сопоставляя их между собой и с величиной соответствующего ИП. Ранее подобные исследования не проводились, в отличие от многочисленных работ, посвященных сопоставлению разных ИП [5, 6] или разных пищевых продуктов [13].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методики. Использовали 7 индивидуальных антиоксидантов ЕТ-типа, в основном полифенолов; а именно, кверцетин (КВ), рутин (РТ), катехол (КТ), резорцин (РЗ), а также галловую (ГК), аскорбиновую (АК) и феруловую (ФК) кислоты. Исходные растворы готовили по точным навескам реактивов х.ч. Рабочие растворы готовили в день употребления, разбавляя исходные бидистиллиро-

Таблица 1

Состав (c_{Σ} , мкМ и мкЭ) некоторых модельных смесей

Table 1

Composition of some model mixtures (c_{Σ} , $\mu\text{mol/L}$ and $\mu\text{mol-eq/L}$)

Номер смеси	c_i , мкМ					c_{Σ} , мкМ	c_{Σ} , мкЭ
	АК	ГК	КВ	КТ	РЗ		
1	23	12	12	0	0	47	142
2	45	43	0	0	0	88	219
3	0	43	48	0	0	91	369
4	23	0	24	28	0	75	222
5	0	43	24	0	25	92	299
6	23	23	0	14	25	85	193
7	45	12	24	14	12	107	298

ванной водой. Реактив Фолина-Чокальтеу (PanReas, Испания) перед анализом разбавляли в 10 раз дистиллированной водой. В методике FRAP применяли окислительный раствор, содержащий ионы Fe^{3+} и *o*-фенантролин [11]; в части опытов *o*-фенантролин заменяли на дипиридил, при этом длину волны, при которой измеряли сигналы антиоксидантов, не меняли. Реакции, в которых антиоксиданты восстанавливали реагент-окислитель до окрашенных продуктов, проводили в водных растворах при 20–25 °С при pH 10.5 (ФЧ) и pH 3.5 (FRAP). Окислитель всегда вводили в большом избытке относительно АО. Сигналы измеряли через 60 или 10 минут после смешивания реагентов. Оптические плотности окрашенных растворов (A_{ip} или $A_{\Sigma p}$) измеряли при 765 нм (ФЧ) или 520 нм (FRAP) с помощью спектрофотометра КФК-3-01. Все опыты повторяли трижды, оптические плотности усредняли, вносили поправку на холостой опыт и, в случае необходимости, пересчитывали на значения, отвечающие кювете с толщиной слоя 1.00 см. Аддитивность сигналов при выбранной длине волны проверяли с помощью 3S-критерия, как описано в работе [14]. Для каждого АО строили два градуировочных графика; используя методику [10] (один из вариантов ФЧ) и методику [12] (один из вариантов FRAP). Методом наименьших квадратов рассчитывали линейные регрессии вида $A_{ip} = a + K_i c_{ip}$, где c_{ip} – концентрация *i*-го АО в конечном разбавлении, выраженная в мкмоль/л (далее мкМ) или в мкмоль-экв/л (далее мкЭ). Коэффициент K_i характеризует чувствительность определения *i*-го АО по данной методике. Полученные градуировки охватывали область от 1 до 20 мкМ. Коэффициенты линейной корреляции (r) и пределы обнаружения (c_{min}) рассчитывали по общеизвестным формулам.

Объекты анализа. Модельные смеси АО готовили, смешивая в мерной колбе рассчитанные объемы исходных растворов и доводя до метки бидистиллированной водой. Смеси содержали от 2 до 5 индивидуальных АО, соотношение их молярных концентраций в любой смеси не превышало 10 : 1. Было приготовлено более 20 смесей с известными значениями c_{Σ} . Примером могут быть 7 смесей, составы которых показаны в табл. 1. Для выражения c_{Σ} в мкЭ молярные концентрации компонентов

смеси умножали на число электронов, отдаваемых молекулой этого компонента групповому реагенту. Так, при использовании FRAP молекула АК теряет два электрона, а молекула ГК – три электрона, поэтому суммарная молярная концентрация АО в смеси № 2 составляет: $c_{AK} + c_{ГК} = 88$ мкМ, а суммарная нормальная концентрация АО в той же смеси равна $2 c_{AK} + 3 c_{ГК} = 219$ мкЭ.

Анализируемую смесь смешивали с реагентами и растворителем так, чтобы суммарное содержание АО в конечном разбавлении ($c_{\Sigma p}$) не превышало 10 мкМ. В большинстве случаев $c_{\Sigma p} = c_{\Sigma} / 10$. Образцы пищевых продуктов (торговые марки заменены условными номерами) приобретали в торговой сети г. Омска, чайные настои готовили по ISO 3103-2019. Вина и соки перед анализом разбавляли дистиллированной водой в 10, 20 или 100 раз. Результаты анализа смесей и пищевых продуктов выражали как в традиционной форме (в пересчете на ГК или АК), так и в виде интервалов возможных значений c_{Σ} ; в обоих случаях учитывали предварительное разбавление растворов. Относительные погрешности анализа модельных смесей рассчитывали по формуле (1). Результаты анализа разбавленных пищевых продуктов проверяли методом «введено–найдено», используя добавки разных индивидуальных АО.

Расчет интервалов. Основным источником погрешностей группового анализа является внутригрупповая селективность сигналов, т. е. различная чувствительность определения компонентов искомой группы [1]. Примененный в данной работе алгоритм [7] учитывает именно этот источник. Для интервальной оценки c_{Σ} надо: 1) измерить обобщенный сигнал компонентов искомой группы, присутствующих в данной пробе; 2) выявить минимальный (K_1) и максимальный (K_m) коэффициенты чувствительности при определении соединений искомой группы (независимо от их присутствия в данной пробе). Границы интервалов можно рассчитать по значению ИП [7-9], но в данной работе этот способ не применяли, а использовали более простую формулу (2):

$$A_{\Sigma p} / K_m \leq c_{\Sigma p} \leq A_{\Sigma p} / K_1. \quad (2)$$

Условиями применимости формулы (2) являются: выполнение закона Бугера-Ламберта-Бера,

ненулевые значения K_1 для всех компонентов искомой группы, аддитивность сигналов, отсутствие матричных эффектов, статистическая незначимость случайных погрешностей (неопределенности типа А), а также некоторые другие условия, обычные для спектрофотометрического анализа [7]. По значениям $c_{\Sigma p}$, найденным по формуле (2) для предельно разбавленных (окрашенных) растворов, находили значения c_{Σ} , характеризующие нижнюю и верхнюю границы искомого интервала применительно к исходной пробе, при этом учитывали разбавление пробы в ходе анализа. Найденные интервалы возможных значений c_{Σ} выражали и по-другому – с указанием середины и полуширины этого интервала ($c_{\Sigma sp} \pm \Delta c$), аналогично традиционной записи доверительных интервалов. Следует учесть, что значения c^* , выраженные в пересчете на стандартные вещества, входящие в искомую группу, должны находиться в границах интервала возможных значений, но не обязательно в его середине.

Качество интервальных оценок характеризовали с помощью параметра W – отношения полуширины интервала возможных значений (Δc) к значению c_{Σ} , отвечающему середине этого интервала [7, 8]. Абсолютную ширину полученных интервалов ($2\Delta c$) сопоставляли с шириной доверительных интервалов, рассчитанных по Стьюденту ($n = 3, P = 0.95$) с учетом сходимости повторных измерений c^* по выбранной методике.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ однокомпонентных модельных растворов. Обе методики дают хорошо воспроизводимые аналитические сигналы ($S_r < 0.03$). Оптические плотности растворов индивидуальных АО, измеренные по методике FRAP, были приблизительно аддитивны (отклонения от аддитивности при большом избытке окислителя статистически незначимы). Для методики ФЧ отклонения от аддитивности сигналов в ряде случаев были значимы, но малы по модулю – меньше

15 % от среднего значения суммарного сигнала. Во всех случаях градуировочные графики в координатах $A_i - c_i$ были прямолинейны ($r > 0.98$) вплоть до 10 мкМ. В области 10 - 20 мкМ градуировки начинают искривляться. Все графики проходят через начало координат (значения a незначимы). Аналогичные графики строили, выражая концентрации АО в мкЭ. Пределы обнаружения индивидуальных АО не превышают 1 мкМ, причем для большинства АО методика FRAP чувствительнее, чем ФЧ. Если концентрации АО измерять в мкМ, то по обеим методикам с наибольшей чувствительностью определяется кверцетин, а с наименьшей – феруловая кислота (рис. 1, табл. 2).

В каждой колонке табл. 2 выделены шрифтом значения K_1 и K_m , использовавшиеся для расчета интервальных оценок. Внутригрупповая селективность сигналов для каждой методики характеризуется безразмерным параметром $T = K_m/K_1$. Видно, что внутригрупповая селективность сильнее проявляется в методике ФЧ ($T = 4.5$). Методика FRAP и особенно ее модифицированные варианты FRAP-1 и FRAP-2 имеют гораздо меньшую селективность.

Анализ модельных смесей. Определяя традиционным способом суммарное содержание АО в модельных смесях известного состава, его выражали в пересчете на галловую кислоту (ФЧ) или на аскорбиновую кислоту (FRAP), что приводило к меньшим (по модулю) систематическим погрешностям, чем применение других стандартов. Результаты анализа некоторых модельных смесей (значения c^*) приведены в табл. 3. Нумерация смесей во всех таблицах совпадает. Погрешности анализа остальных модельных смесей были примерно такими же, как погрешности анализа смесей №№ 1 - 7. Суммарные содержания АО определялись с хорошей сходимостью ($S_r < 0.03$). Однако для обеих методик пересчет обобщенных сигналов на X_{Σ} приводил к неправильным результатам группового анализа, хотя по отдельности те же АО определялись

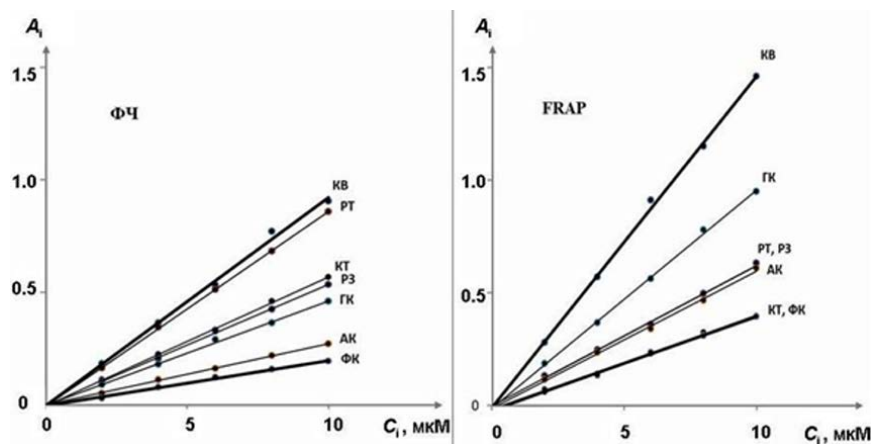


Рис. 1. Градуировочные графики для определения молярных концентраций индивидуальных АО (C_i , мкМ) по методикам ФЧ (слева) и FRAP (справа)

Fig. 1. Calibration dependences for determining molar concentrations of individual antioxidants (c_i , $\mu\text{mol/L}$) using F-C (left) and FRAP (right) assays

Таблица 2

Коэффициенты чувствительности для определения индивидуальных АО по разным методикам и при разных способах представления концентраций

Table 2

Sensitivity coefficients for determining individual antioxidants using different assays with various ways of expressing concentrations

АО	$10^3 K_i, \text{ мкМ}^{-1}$		$10^3 K_i, \text{ мкЭ}^{-1}$	
	ФЧ	FRAP	FRAP-1	FRAP-2
КВ	90.5	146.3	29.3	17.1
РТ	86.5	62.4	15.6	19.1
КТ	56.4	40.8	20.4	17.6
РЗ	54.4	62.0	31.0	16.9
ГК	46.3	97.2	32.4	23.1
АК	27.2	60.4	30.2	20.4
ФК	20.1	40.0	40.0	24.2
<i>T</i>	4.5	3.7	2.6	1.4

правильно ($\pm 5\%$). Методика ФЧ обычно давала сильно завышенные результаты, а методика FRAP – завышенные или заниженные, смотря по составу смеси. Систематические погрешности группового анализа намного превышали уровень случайных

погрешностей и отклонений от аддитивности. Для отдельных смесей систематические погрешности по модулю достигали 60 % (ФЧ) и 35 % (FRAP). Меньшая точность методики ФЧ по сравнению с FRAP объясняется большей внутригрупповой селективностью аналитических сигналов.

Интервальные оценки суммарного содержания АО в модельных смесях. В табл. 4 приведены интервалы возможных значений c_{Σ} (в мкМ), рассчитанные по значениям K_i и K_m . Одновременно рассчитывали относительную ширину каждого интервала (W).

Как видно из табл. 4, интервалы, полученные по методике ФЧ, сдвинуты в сторону больших значений c_{Σ} . Относительная ширина интервалов зависит от выбора методики, но не зависит от состава пробы и суммарного содержания антиоксидантов. Несложные алгебраические преобразования формулы (2) позволили нам установить зависимость W от параметра T , характеризующего внутригрупповую селективность сигналов:

$$W = (T - 1) / (T + 1) \quad (3)$$

Полученные в эксперименте значения W приближительно равны значениям W , вычислен-

Таблица 3

Результаты и погрешности определения суммарного содержания АО в модельных смесях в пересчете на молярные концентрации стандартных веществ

Table 3

Results and the errors of determining total content of antioxidants in model mixtures recalculated to molar concentrations of standard substances

Номер смеси	$C_{\Sigma}, \text{ мкМ}$	ФЧ		FRAP	
		Найдено, мкМ	δс, % отн	Найдено, мкМ	δс, % отн
1	47	62.0 ± 1.8	32	45 ± 2	- 4
2	88	59.1 ± 0.8	- 33	66 ± 3	- 25
3	91	133 ± 3	46	112 ± 3	21
4	75	110 ± 6	47	73 ± 2	- 3
5	92	138 ± 3	50	106 ± 4	14
6	85	99 ± 2	16	89 ± 5	5
7	107	116 ± 3	21	95 ± 5	- 11

Таблица 4

Интервальные оценки суммарного содержания АО в модельных смесях, полученные по методикам ФЧ и FRAP с использованием молярных концентраций

Table 4

Interval estimates of total content of antioxidants in model mixtures obtained employing F-C and FRAP assays using molar concentrations

Номер смеси	$c_{\Sigma}, \text{ мкМ}$	A_{Σ}		Интервальные оценки $c_{\Sigma}, \text{ мкМ}$		W	
		ФЧ	FRAP	ФЧ	FRAP	ФЧ	FRAP
1	47	0.288	0.272	32 – 143	19 – 68	0.63	0.56
2	88	0.274	0.399	30 – 136	27 – 99	0.64	0.57
3	91	0.617	0.676	68 – 307	46 – 169	0.64	0.57
4	75	0.510	0.440	56 – 254	30 – 110	0.64	0.57
5	92	0.640	0.640	71 – 318	44 – 160	0.63	0.57
6	85	0.459	0.537	51 – 229	37 – 134	0.64	0.57
7	107	0.538	0.574	60 – 268	39 – 143	0.63	0.57

ным для той же методики по формуле (3). Судя по относительной ширине интервалов, методика FRAP дает несколько лучшие оценки суммарного содержания АО, чем методика ФЧ, это отмечали и другие авторы. Однако в обоих случаях абсолютная ширина интервала возможных значений c_{Σ} на порядок и более превышает ширину доверительных интервалов, рассчитанных по формуле Стьюдента и приведенных в табл. 3. Этого и следовало ожидать: в отличие от элементного и молекулярного анализа, систематические погрешности группового анализа обычно намного превышают уровень случайных погрешностей, особенно при использовании ИП [15]. Поэтому традиционное выражение суммарных содержаний АО в виде узких доверительных интервалов, не учитывающих систематические погрешности, ведет к переоценке реальной точности группового анализа. С другой стороны, интервальные оценки, полученные с применением FRAP и особенно ФЧ, представляются слишком широкими. Частичное перекрытие, а иногда и полное наложение интервалов, характеризующих разные объекты анализа, мешают сопоставлять эти объекты по суммарному содержанию АО. Очевидно, для широкого применения интервальных оценок следует оптимизировать соответствующие методики группового анализа. Способы оптимизации таких методик детально обсуждаются в монографии [16]. Параметром оптимизации может быть либо относительная ширина интервалов (W), либо параметр $T = K_m / K_1$.

Оптимизация методики FRAP. При прочих равных условиях чувствительность определения любого антиоксиданта-восстановителя зависит от числа электронов (m), отдаваемых молекулой АО групповому реагенту-окислителю. Применение нормальных концентраций снижает чувствительность определения многоэлектронных АО (например, КВ), не меняя чувствительности определения одноэлектронных АО, например, ФК (рис.2). Внутригрупповая селективность снижается, а точность оценки в виде

ИП повышается [12]. Этот прием довольно часто используют при определении суммы антиоксидантов [3, 4]. Мы применили его для расчета интервальных оценок. К сожалению, химизм взаимодействия антиоксидантов с реагентом Фолина-Чокальтеу недостаточно изучен, значения m точно не известны; поэтому применять нормальные концентрации для оптимизации этой методики мы не могли. Напротив, для методики FRAP значения m известны, их неоднократно определяли разными способами [11, 17 и др.]. Судя по литературным данным, для КВ m равно 5, для РТ – 4, для ГК – 3, для КТ, РЗ и АК – 2, а для ФК – 1. Используя эти значения m , мы выражали суммарные содержания АО в модельных смесях в виде нормальных концентраций (табл.1, последний столбец). Пример соответствующего расчета приведен в начале статьи.

Переход к новым градуировкам изменил как коэффициенты K_1 и K_m так и их соотношение (табл. 2). В новых координатах с наименьшей чувствительностью определяется рутин, с наибольшей – феруловая кислота. Методика, аналогичная методике FRAP, но нацеленная на расчет нормальных концентраций, далее обозначается как методика FRAP-1. Переход к FRAP-1 снизил параметр T с 3.7 до 2.6 единиц, что уменьшило относительную ширину интервалов с 0.57 до 0.44. Степень наложения интервалов для разных смесей также уменьшилась. При этом действительные значения c_{Σ} , выраженные в мкЭ, во всех случаях оставались внутри соответствующих интервалов (табл. 5).

Применение нормальных концентраций снизило, но не полностью устранило внутригрупповую селективность сигналов, поскольку ее формируют не только различия в стехиометрии взаимодействия АО с групповым реагентом, но и другие факторы. Известно, что при использовании методики FRAP индивидуальные АО реагируют с ионами Fe^{3+} с разной скоростью [18]. Кроме того, некоторые АО через 20 - 30 мин после начала реакции вступают

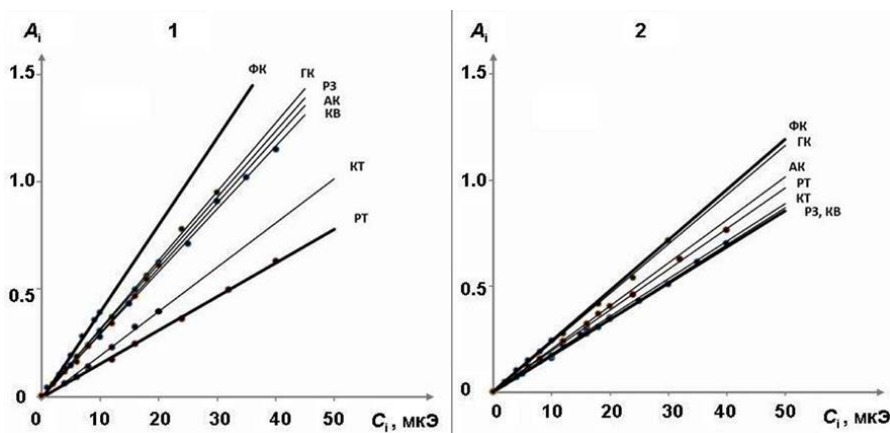


Рис. 2. Градуировочные графики для определения нормальных концентраций АО (c_i , мкЭ) в однокомпонентных растворах по методике FRAP до (1) и после (2) ее модификации

Fig. 2. Calibration dependences for determining normal concentrations of individual antioxidants (C_i , $\mu\text{mol-eq/L}$) in single-component solutions using FRAP assay before (1) and after (2) its modification

Таблица 5

Интервальные оценки содержания АО в модельных смесях, полученные с помощью нормальных концентраций по методике FRAP до (1) и после (2) ее модификации

Table 5

Interval estimates of total content of antioxidants in model mixtures obtained using normal concentrations according to FRAP assay before (1) and after (2) its modification

Номер смеси	c_{Σ} , мкЭ	A_{Σ}	Интервальные оценки c_{Σ} , мкЭ		W	
			1	2	1	2
1	142	0.272	68 – 174	112 – 161	0.44	0.18
2	219	0.399	100 – 256	165 – 236	0.44	0.19
3	369	0.676	169 – 433	279 – 400	0.44	0.18
4	222	0.440	110 – 282	182 – 260	0.44	0.18
5	299	0.640	160 – 410	264 – 378	0.44	0.18
6	193	0.537	134 – 344	222 – 318	0.44	0.18
7	298	0.574	143 – 368	239 – 340	0.44	0.17

во вторичные реакции, увеличивающие или уменьшающие их сигналы [19]. На формирование сигнала влияет и природа железосвязывающего реагента [20], и присутствие посторонних веществ [21]. В ходе настоящего исследования методику FRAP модифицировали, заменяя о-фенантролин дипиридиллом и сокращая время экспозиции до 10 мин. В новой методике (далее FRAP-2), как и в методике FRAP-1, использовали нормальные концентрации. Более подробно эта методика изложена в статье [8].

Переход к методике FRAP-2 привел к уменьшению параметра T до 1,4, а относительной ширины интервалов до $W = 0,18$. Следует отметить, что после модификации методики сходимость измерения сигналов несколько ухудшилась ($S_r \approx 0,05$), но на интервальные оценки c_{Σ} это не повлияло. Методику FRAP-2 в дальнейшем применяли для группового анализа пищевых продуктов.

Анализ пищевых продуктов. Анализ вин, чайных настоев и других пищевых продуктов проводили после их предварительного разбавления, но в табл.6 результаты анализа приведены в пересчете на исходный (неразбавленный) продукт. Соответствующие значения c^* входят в интервалы возможных значений c_{Σ} . Значения c^* по порядку

величины соответствуют данным других исследователей, применявшим разные варианты FRAP в анализе аналогичных продуктов [9, 12, 22 и др.]. Так, по данным [23] суммарное содержание АО в красных сухих винах в среднем составляет 12,3 миллимоль-экв/л (в пересчете на ГК). По нашим данным (5 образцов) суммарное содержание АО в красных сухих винах находится в пределах от 5 до 22 миллимоль-экв/л.

Судя по данным, приведенные в табл. 6, результаты группового анализа пищевых продуктов по методике FRAP-2, выраженные в пересчете на АК, лежат примерно посередине соответствующих интервалов. Это не случайно, чувствительность определения АК по этой методике примерно равна полусумме K_1 и K_m , поэтому выбор АК в качестве стандарта минимизирует систематические погрешности анализа [1].

Анализ тех же пищевых продуктов по методике ФЧ приводил к гораздо более высоким значениям c^* и сильному сдвигу интервалов в сторону больших c_{Σ} . Ту же закономерность наблюдали и в анализе модельных смесей (см. табл. 3), но в анализе пищевых продуктов она проявляется сильнее. Для вин метод ФЧ приводит к значениям c^* , которые превышают

Таблица 6

Результаты анализа некоторых пищевых продуктов по методике FRAP-2 в пересчете на АК и в виде интервальных оценок

Table 6

Results of analysis of some foodstuffs by FRAP-2 method recalculated on ascorbic acid and as corresponding interval estimates

Продукт	Суммарное содержание АО, 10^3 мкЭ		
	c^*	Интервальные оценки c_{Σ}	
Вино красное сухое, тип 1	22 ± 1	19 – 27	23 ± 4
Вино красное сухое, тип 2	9.4 ± 0.6	7.9 – 11.3	9.6 ± 1.7
Вино красное сухое, тип 3	5.6 ± 0.2	4.7 – 6.8	5.8 ± 1.1
Настой чая черного (листового), тип 1	3.9 ± 0.3	2.9 – 4.7	3.8 ± 0.9
Настой чая черного (листового), тип 2	3.1 ± 0.4	2.6 – 3.7	3.2 ± 0.6
Настой низкосортного черного чая, тип 3	0.83 ± 0.29	0.70 – 1.0	0.85 ± 0.15
Сок яблочный	0.44 ± 0.01	0.37 – 0.53	0.45 ± 0.07
Пиво светлое	0.28 ± 0.02	0.23 – 0.33	0.28 ± 0.05

Таблица 7

Проверка результатов анализа некоторых пищевых продуктов по методике FRAP-2 (способ «введено-найдено»)

Table 7

Verification of results of analysis of certain foodstuffs by FRAP-2 assay ("added-found" procedure)

Пищевой продукт	Добавка АО, мкЭ	Найдено в пересчете на АК, мкЭ			$\delta C_{д}, \%$	Интервальные оценки, мкЭ		
		без добавки	с добавкой	в добавке		без добавки	с добавкой	в добавке
Вино красное сухое, тип 4 (1:20)	114 (ГК)	360	461	101	- 11	346 - 491	442 - 627	96 - 136
	106 (РЗ)		479	119	12		449 - 637	103 - 146
	100 (КТ)		454	94	- 6		438 - 622	92 - 131
Настой чая черного тип 6 (1:10)	114 (ГК)	154	249	95	-17	113 - 160	215 - 305	98 - 139
	106 (РЗ)		250	96	-9		202 - 287	89 - 127
	100 (КТ)		256	102	2		199 - 283	86 - 123

значения c^* , полученные по методике FRAP, в 2 - 3 раза, тогда как для большинства модельных смесей это соотношение составляло 1.3 – 1.5. Дело в том, что в методике ФЧ на сигналы фенольных АО накладываются сигналы некоторых углеводов, белков и других слабых восстановителей, присутствующих в пищевых продуктах [10]. По-видимому, именно это обстоятельство приводит к сильно завышенным результатам анализа пищевых продуктов. Кроме того, применение методики ФЧ приводит к более широким интервалам ($W > 0.6$). Использовать их для сравнения однотипных продуктов нельзя: соответствующие интервалы почти полностью налагаются друг на друга. Напротив, при использовании методики FRAP-2 интервалы возможных значений c_{Σ} для пищевых продуктов являются довольно узкими ($W \approx 0.18$). По этим интервалам вполне можно отличать высокосортные виды пищевых продуктов от низкосортных или фальсифицированных. Надежно различать продукты близкого качества не удастся из-за частичного перекрытия интервалов.

Используя интервальные оценки в групповом анализе пищевых продуктов, надо принимать во внимание наличие примесей, связывающих АО (альбумины и др. [23]) или замедляющих взаимодействие АО с окислителем [24]. В чайных настоях ингибирующих примесей почти нет, но в винах они имеются (тарtrato и другие комплексанты). В присутствии комплексантов коэффициенты чувствительности при определении АО достоверно снижаются [25]. Чтобы снизить или полностью исключить влияние этого фактора на результаты группового анализа, надо сильно разбавлять пробу перед выполнением анализа [22], либо заранее определять коэффициенты K_1 и K_m в присутствии компонентов матрицы. Проводя анализ по методике FRAP-2, мы предварительно разбавляли красные сухие вина в 20 или в 100 раз, что практически снимало влияние комплексантов [25]. Продукты с низким содержанием комплексантов (соки, пиво, чайные настои) разбавляли в 10 раз.

Для подтверждения правильности интервальных оценок использовали метод «введено – найдено» (табл. 7). Независимо от того, какие именно индивидуальные АО добавляли в пищевые продукты, интервальные оценки суммарного содержания АО

в предварительно разбавленном продукте сдвигались примерно на значение введенной добавки, что подтверждает правильность этих оценок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что интервальные оценки суммарного содержания однотипных антиоксидантов в пищевых продуктах, как и значения интегральных показателей антиоксидантной активности (емкости), зависят от способов формирования и измерения обобщенного аналитического сигнала. В частности, относительная ширина интервалов зависит от природы группового и вспомогательного реагентов, времени экспозиции и способа представления суммарной концентрации АО. Это открывает возможность целенаправленной оптимизации методик группового анализа. Модификация методики FRAP позволила снизить внутригрупповую селективность сигналов АО (снижение T с 3.7 до 1.4), что и привело к уменьшению относительной ширины интервалов с $W = 0.56$ до $W \approx 0.18$. Естественно, снижение внутригрупповой селективности сигналов повышает и точность оценки c_{Σ} в пересчете на стандартное вещество. Однако несомненными преимуществами интервальных оценок остаются слабая зависимость оценки от природы присутствующих в пробе компонентов искомой группы, исключение субъективного выбора стандартного вещества, наглядное представление неопределенности результатов группового анализа и метрологическая корректность соответствующих методик.

Существуют проблемы, затрудняющие в настоящее время широкое применение интервальных оценок, в частности, для определения суммы ЕТ-антиоксидантов в пищевых продуктах. Можно назвать несколько нерешенных проблем.

1. Алгоритм [7] учитывает лишь один из факторов, определяющих интервальные оценки суммарных содержаний. А именно, внутригрупповую селективность сигналов. При определении суммы АО это наиболее значимый фактор, однако для правильной оценки c_{Σ} надо учитывать и другие факторы, особенно отклонения от аддитивности сигналов и матричные эффекты. В противном

- случае действительные содержания АО могут оказаться вне вычисленных интервалов.
- Даже без учета дополнительных факторов интервалы возможных значений c_x слишком широки. Необходимо снизить внутригрупповую селективность сигналов хотя бы до уровня $T = 1.2$, что позволит находить суммарное содержание однотипных аналитов с погрешностями, не превышающими 10 % отн.
 - Разработчики методик группового анализа находят коэффициенты K_1 и K_m по небольшим выборкам модельных соединений, а следовало бы использовать все или хотя бы наиболее распространенные компоненты каждой группы, выделенные с учетом их относительного содержания в объектах анализа [7, 16]. Чем большая выборка модельных соединений используется для поиска K_1 и K_m , тем надежнее интервальные оценки. При этом искомые группы аналитов не должны быть слишком обширными и внутренне неоднородными [15]. Так, вместо суммы всех антиоксидантов или суммы ЕТ-антиоксидантов лучше определять суммарные содержания АО, входящих в несколько сравнительно узких групп. В каждую из них должны входить АО, родственные по структуре и сходные по реакционной способности, но отличающиеся по этим признакам от других групп АО. Примером могут быть группы тиолов или антоцианов. Проблема в том, чтобы найти групповые реагенты, специфические для каждой такой группы и обеспечивающие примерно одинаковую чувствительность определения всех компонентов этой группы.
 - Использование нормальных (а не массовых или молярных) концентраций для расчета интервальных оценок позволяет более точно определять суммарное содержание однотипных реакционноспособных соединений, в частности ЕТ-антиоксидантов. Но от аналитиков нередко требуют найти не концентрацию, а массовую долю антиоксидантов! Чтобы рассчитать массовую долю, придется выбрать некоторый АО в качестве стандартного вещества, что приведет к потере перечисленных выше преимуществ интервальных оценок. Кроме того, для расчета нормальных концентраций надо знать стехиометрию взаимодействия всех аналитов с групповым реагентом, а она для многих методик (например, для методики ФЧ) недостаточно изучена.

Очевидно, для решения перечисленных проблем и развития системы интервальных оценок необходимы новые исследования. Их актуальность и практическая значимость не вызывают сомнений.

БЛАГОДАРНОСТИ

В проведении эксперимента и/или подготовке материалов для публикации принимали участие к.х.н. Н.С. Бриленок и студенты ОмГУ Е.В. Белова, М.В. Бахарева, И.С. Петракова и Л.С. Баженова. В обсуждении результатов исследования участво-

вала д.х.н. И.В. Власова. Всем им автор приносит глубокую благодарность.

ACKNOWLEDGMENTS

Dr. N.S. Brilenok, and students E.V. Belova, M.V. Bakhareva, I.S. Petrakova and L.S. Bazhenova participated in the experimental work or data processing and Prof. I.V. Vlasova took part in the discussion of the results of investigation. The author deeply thanks them all.

ЛИТЕРАТУРА

- Vershinin V.I. Total indices as a tool to estimate sum content of similar analytes // *Talanta*. 2015. V. 131, № 1. P. 293-300.
- EURACHEM/CITAC Guide "Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement" Third Edition. QUAM. 2012 P 1. 138 p.
- Karadag A., Ozcelik B., Saner S. Review of methods to determine antioxidant capacities // *Food Anal. Methods*. 2009. V. 2. P. 41-60.
- Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds / R. Apak [et al.] // *Molecules*. 2007. № 12. P. 1496-1547.
- Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assays: a comparative study / B. Ou [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* 2002. V. 50, № 11. P. 3122-3128.
- Определение галловой кислоты, катехина, эпикатехина и кофеина в экстрактах черного чая / Мареева Д.О. [и др.] // *Аналитика и контроль*. 2015. Т. 19, № 4. С. 323-330.
- Вершинин В.И., Исаченко Н.А., Бриленок Н.С. Методология анализа неразделенных смесей. Интервальные оценки суммарного содержания однотипных аналитов // *Ж. аналит. химии*. 2016. Т. 71, № 4. С. 369-376.
- Определение суммарного содержания фенольных антиоксидантов в чае с применением разных вариантов метода FRAP / Цюпко Т.Г. [и др.] // *Аналитика и контроль*. 2019. Т. 19, № 1. С. 143-151.
- Применение интервальных оценок суммарного содержания антиоксидантов для анализа соковой продукции методом CUPRAC с использованием системы Cu(II) – NC – PMM / Дамзина А.А. [и др.] // *Аналитика и контроль*. 2023. Т.27, № 2. С.90-100.
- Singleton V.L., Orthofer R, Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substances by means of Folin-Ciocalteu reagent // *Methods Enzymol*. 1999. V. 299. P. 152-178.
- 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.
- Определение суммарного содержания антиоксидантов методом FRAP / Т.Г. Цюпко [и др.] // *Аналитика и контроль*. 2011. Т. 15, № 3. С. 287-298.
- The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide / M.H. Carlsen [et al.] // *Nutritional J*. 2010. V. 9, № 3.
- Вершинин В.И., Власова И.В., Цюпко Т.Г. Выявление отклонений от аддитивности в спектрофотометрическом анализе неразделенных смесей // *Методы и объекты хим. анализа*. 2010. Т. 5, № 4. С. 225-233.
- Вершинин В.И. Методологические аспекты группового анализа органических веществ // *Ж. аналит. химии*. 2023. Т. 78, № 2. С.129-143.

16. Вершинин В.И. Определение суммарного содержания однопипных веществ (теория интегральных показателей). Омск: ОмГУ, 2016. 288 с.
17. Зиятдинова Г.К., Низамова А.М., Будников Г.К. Гальваностатическая кулонометрия в анализе природных полифенолов и ее применение в фармации // Ж. аналит. химии. 2010. Т. 65, № 11. С. 1202-1206.
18. Pulido R., Bravo L., Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified FRAP assay // *J. Agric. and Food Chem.* 2000. V. 48, № 8. P. 3396-3402.
19. Параметры антиоксидантной активности соединений: относительная антиоксидантная активность чая / Анисимович И.П. [и др.]. // Научные ведомости. Серия "Естественные науки". 2010. Т. 80, № 9. С. 104-110.
20. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents / Berker K. [et al.] // *Talanta*. 2007. V. 72, № 3. P. 1157-1165.
21. Тарасов А.В., Заворохина Н.В., Чугунова О.В. Исследование потенциально мешающих веществ при потенциометрическом определении антиоксидантной активности в пищевых системах // Техника и технология пищевых производств. 2023. № 3. С. 504-512.
22. Оценка антиоксидантной активности пищевых продуктов с применением индикаторной системы на основе фенантролиновых комплексов железа / Т.Г. Цюпко [и др.] // Известия ВУЗов. Пищевая технология. 2011. № 5-6. С. 84-87
23. Simonetti P., Pietta P., Testolin G. Polyphenol content and total antioxidant potential of selected Italian wines // *J. Agric. Food Chem.* 1997. V. 45, № 4. P. 1152-1155.
24. 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. 334-340.
25. Бриленок Н.С., Вершинин В.И., Бахарева М.В. Оценка антиоксидантной активности полифенолов по методу FRAP в присутствии комплексантов // Аналитика и контроль. 2016. Т. 20, № 3. С. 209-217.
7. Vershinin V.I., Isachenko N.A., Brilenok N.S. Methodology of analysis of unseparated mixtures: Interval estimates of the total concentrations of similar analytes. *J. Anal. Chem.*, 2016. vol. 71, no. 4, pp. 351-358. doi: 10.1134/S1061934816040080.
8. Tsytko T.G., Brilenok N.S., Guschaeva K.S., Vershinin V.I. [Determination of the total phenol antioxidants content in tea samples using different variations of FRAP assay]. *Analitika i kontrol' [Analytics and Control]*, 2019, vol. 19, no. 1, pp. 143-151. doi: 10.15826/analitika.2019.23.1.011. (in Russian).
9. Damzina A.A., Gavrilenko N.A., Saranchina N.V., Gavrilenko M.A. [Application of interval estimations of the total content of antioxidants for the analysis of juice products by the CUPRAC method using the Cu(II) – NC–PMM system]. *Analitika i kontrol' [Analytics and Control]*, 2023, vol. 27, no 2, pp. 90-100. doi:10.15826/analitika.2023.27.2.002. (in Russian).
10. Singleton V.L., Orthofer R, Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substances by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, 1999, vol. 299, pp. 152-178.
11. 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. vol. 239, no. 1, pp. 70-76.
12. Tsytko T.G., Petrakova I.S., Brilenok N.S. Nikolaeva N.A., Chuprinina D.A. [Determination of total content of antioxidants by frap assay]. *Analitika i kontrol' [Analytics and Control]*, 2011, vol. 15, no 3, pp. 287-298. (in Russian).
13. Carlsen M.H., Halvorsen B.L., Holte K., Bohn S.K., Dragland S., Sampson L., Willey 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. *Nutr J.*, 2010. vol. 9, no. 3. doi: 10.1186/1475-2891-9-3.
14. Vershinin V.I., Vlasova I.V., Tsytko T.G. [Detection of deviations from additivity in spectrophotometric analysis of unseparated mixtures]. *Metody i ob'ekty khimicheskogo analiza [Methods and objects of chemical analysis]*, 2010, vol. 5, no. 4, pp. 225-233. (in Russian).
15. Vershinin V.I. Methodological aspects of group analysis of organic substances. *J. Anal. Chem.*, 2023, vol. 78, no. 2, pp. 174-186. doi: 10.31857/S0044450223020147.
16. Vershinin V.I. *Opredelenie summarnogo sodержaniia odnotipnykh veshchestv (teoriia integral'nykh pokazatelei) [Determination of the total content of the similar substances (the theory of total indices)]*. Омск: Publishing house OmSU, 2016. 288 p. (in Russian).
17. Ziyatdinova G.K., Nizamova A.M., Budnikov G.K. Galvanostatic coulometry in the analysis of natural polyphenols and its use in pharmacy. *J. Anal. Chem.*, 2010. vol. 65, no. 11, pp. 1176-1180. doi: 10.1134/S1061934810110146.
18. Pulido R., Bravo L., Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified FRAP assay. *J. Agric. and Food Chem.*, 2000, vol. 48, no. 8, pp. 3396-3402. doi: 10.1021/jf9913458.
19. Anisimovich I.P., Deineka V.I., Deineka L.A., Frolov P.A., Mjasnikova P.A. [Antioxidant activity parameters of the substances: relative antioxidant activity of tea]. *Nauchnie ведомosti. Serija Estestvennie nauki [Scientific records. Natural sciences]*, 2010. vol. 80, no 9, pp. 104-110. (in Russian).
20. 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 (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 2007. vol. 72, no. 3, pp. 1157-1165. doi:10.1016/j.talanta.2007.01.019.
21. Tarasov A.V., Zavorokhina N.V., Chugunova O.V. [Potential interfering substances and potentiometric antioxidant activity

REFERENCES

- Vershinin V.I. Total indices as a tool to estimate sum content of similar analytes. *Talanta*, 2015. vol. 131, no. 1, pp. 293-300. doi: 10.1016/j.talanta.2014.07.102.
- EURACHEM/CITAC Guide "Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement" Third Edition. QUAM. 2012P1. 138 p.
- Karadag A., Ozelcik B., Saner S. Review of methods to determine antioxidant capacities // *Food Anal. Methods*, 2009. V. 2. P. 41-60. doi: 10.1007/s12161-008-9067-7.
- Apak R., Guclu K., Demirata B., Ozyrek M., Celic S.E., Bektaolu B., Berker K.I., Ozyurt D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds. *Molecules*, 2007, vol. 12, no. 7, pp. 1496-1547.
- Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J.A., Deemer E.K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assays: a comparative study. *J. Agric. Food Chem.*, 2002. vol. 50, no. 11, pp. 3122-3128. doi: 10.1021/jf0116606.
- Mareeva D.O., Tsytko T.G., Milevskaia V.V., Temerdashev A.Z. [HPLC determination and estimation of gallic acid, catechin, caffeine and epicatechin content in black tea extracts]. *Analitika i kontrol' [Analytics and Control]*, 2015, vol. 19, no. 4, pp. 323-330 doi: 10.15826/analitika.2015.19.4.011. (in Russian).

- tests in food systems]. *Tekhnika i tekhnologiya pishchevykh proizvodstv [Food Processing: Techniques and Technology]*, 2023, no. 3. pp. 504-512. doi: <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-3-2452>. (in Russian).
22. Tsupko T.G., Chuprinina D.A., Nikolaeva N.A., Voronova O.B., Temerdashev Z.A. [Evaluation of antioxidant activity of foodstuffs using of indicator system based on phenanthroline complexes of iron]. *Izvestiya vuzov. Pishchevaia promyshlennost' [Proceedings of the universities. food processing industry]*, 2011, no. 5-6, pp. 84-87. (in Russian).
23. Simonetti P., Pietta P., Testolin G. Polyphenol content and total antioxidant potential of selected Italian wines. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, vol. 45, no. 4, pp. 1152–1155. doi: <https://dx.doi.org/10.1021/jf960705d>
24. 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, vol. 4, no. 3, pp. 334-340. doi: [10.1007/s12161-010-9174-0](https://doi.org/10.1007/s12161-010-9174-0)
25. Brilenok N.S., Vershinin V.I., Bakhareva M.V. [Evaluation of polyphenols antioxidant capacity in the presence of complexants by FRAP assay] *Analitika i kontrol' [Analytics and Control]*, 2016, vol. 20, no. 3, pp. 209-217. doi: [10.15826/analitika.2016.20.3.004](https://doi.org/10.15826/analitika.2016.20.3.004). (in Russian).
21. Tarasov A.V., Zavorokhina N.V., Chugunova O.V. Potential interfering substances and potentiometric antioxidant activity tests in food systems. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2023. № 3. P. 504-512 (in Russian). doi: <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-3-2452>
22. Tsupko T.G., Chuprinina D.A., Nikolaeva N.A., Voronova O.B., Temerdashev Z.A. Evaluation of antioxidant activity of foodstuffs using of indicator system based on phenanthroline complexes of iron / *Izvestiya vuzov. Pishchevaia promyshlennost' [Proceedings of the universities. food processing industry]*. 2011. no. 5-6, pp. 84-87 (in Russian).
23. Simonetti P., Pietta P., Testolin G. Polyphenol content and total antioxidant potential of selected Italian wines. *J. Agric. Food Chem.* 1997. vol. 45, no. 4, pp. 1152–1155.
24. 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. vol. 4, no. 3, pp. 334-340.
25. Brilenok N.S., Vershinin V.I., Bakhareva M.V. Evaluation of polyphenols antioxidant capacity in the presence of complexants by FRAP assay // *Analitika i kontrol' [Analytics and Control]*, 2016, vol. 20, no. 3, pp. 209-217 (in Russian). doi: [10.15826/analitika.2016.20.3.004](https://doi.org/10.15826/analitika.2016.20.3.004)