

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММАРНОГО СОДЕРЖАНИЯ АНТИОКСИДАНТОВ МЕТОДОМ FRAP

**Т.Г. Цюпка¹, И.С. Петракова², Н.С. Бриленок², Н.А. Николаева¹,
Д.А. Чупрынина¹, З.А. Темердашев¹, В.И. Вершинин²**

¹ Кубанский государственный университет
Россия, 350040, г. Краснодар, ул. Ставропольская, 149
tsypko@inbox.ru

² Омский государственный университет им. Ф.М. Достоевского
Россия, 644077, г. Омск, Мира, 55^а
vyvershinin@yandex.ru

Поступила в редакцию 3 июня 2011 г.

Выполнен обзор публикаций по определению суммарной антиоксидантной активности пищевых продуктов и других объектов методом FRAP. Оптимизировано влияние разных факторов на величину аналитического сигнала. Результаты анализа модельных смесей антиоксидантов (полифенолов) отличаются от суммарного содержания компонентов (в моль/л) в основном из-за разной стехиометрии взаимодействия компонентов с реагентом-окислителем. Для уменьшения систематической погрешности надо выражать результат анализа не в молях или миллиграммах, а в моль-эквивалентах стандартного вещества.

Ключевые слова: спектрофотометрический анализ, определение антиоксидантов, антиоксидантная активность, полифенолы, интегральные показатели.

Цюпка Татьяна Григорьевна – кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры аналитической химии КубГУ.

Область научных интересов – анализ объектов окружающей среды, интегральные показатели, определение антиоксидантов, антиоксидантная активность.

Автор 20 опубликованных работ.

Петракова Инна Сергеевна – студент кафедры аналитической химии ОмГУ.

Область научных интересов – интегральные показатели, антиоксидантная активность.

Бриленок Наталья Сергеевна – студент кафедры аналитической химии ОмГУ.

Область научных интересов – интегральные показатели, определение антиоксидантов.

Николаева Наталья Александровна – аспирант кафедры аналитической химии КубГУ.

Область научных интересов – анализ пищевых продуктов, интегральные показатели, определение антиоксидантов, антиоксидантная активность.

Автор 2 опубликованных работ.

Чупрынина Дарья Александровна – аспирант кафедры аналитической химии КубГУ.

Область научных интересов – анализ пищевых продуктов, интегральные показатели, определение антиоксидантов, антиоксидантная активность.

Автор 2 опубликованных работ.

Темердашев Зауаль Ахлоевич – доктор химических наук, профессор, зав. кафедрой аналитической химии КубГУ.

Области научных интересов – анализ объектов окружающей среды, разработка аналитических схем контроля.

Автор более 180 опубликованных работ, в том числе ряда монографий и патентов.

Вершинин Вячеслав Исаакович – доктор химических наук, профессор, зав. кафедрой аналитической химии ОмГУ.

Области научных интересов – анализ неразделенных смесей органических соединений; математические аспекты химического анализа; история, методология и методика преподавания аналитической химии.

Автор более 180 опубликованных работ, в том числе ряда монографий, учебников и патентов.

Введение

Интерес к антиоксидантам (АО) вызван их способностью блокировать воздействие свободных радикалов и защищать человека от ряда опасных заболеваний [1]. Созданы методики определения индивидуальных АО в пищевых продуктах, в крови, тканях, лекарственных растениях и биологически активных добавках [2]. Не менее важны методики определения суммарного содержания АО (ΣC_{AO}), основанные на применении ВЭЖХ или капиллярного электрофореза. Возможно и спектрофотометрическое определение ΣC_{AO} без разделения смеси АО, при этом результат рассчитывают с помощью хемометрических алгоритмов [3]. К сожалению, недостаточная изученность природных смесей АО и трудоемкость получения многомерных градуировок препятствуют широкому применению таких методик. На практике вместо ΣC_{AO} обычно определяют суммарную антиоксидантную активность (АОА) изучаемых смесей [4]. Этот интегральный показатель также называют суммарной антиоксидантной емкостью (Total Antioxidant Capacity - TAC).

Показатель АОА определяют электрохимическими, оптическими и кинетическими методами, проводя модельные реакции с участием окислителей или веществ, генерирующих радикалы (см. обзоры [5-9]). Часто АОА определяют фотометрическим методом FRAP (*Ferric Reducing/Antioxidant Power*), вводя в избытке ионы Fe^{3+} и фотометрический реагент - трипиридилтриазин, 1,10-фенантролин, 2,2'-дипиридил и др. Под действием АО (восстановителей) образуется интенсивно окрашенный комплекс железа(II) с реагентом. Окраска развивается медленно, поэтому аналитический сигнал измеряют через 10 минут после смешивания реагентов, не дожидаясь установления равновесия. АОА находят по градуировочному графику, предварительно построенному по растворам стандартного вещества $X_{ст}$. Как правило, АОА выражают в пересчете на $X_{ст}$, то есть указывают массу или число молей $X_{ст}$, которые в данных условиях дают такой же аналитический сигнал, что и 1 г изучаемого объекта. В качестве $X_{ст}$ используют распространенные в природе антиоксиданты – кверцетин, рутин и др., либо синтетический аналог витамина Е – тролокс. Величина АОА зависит не только от состава пробы, но и от выбора $X_{ст}$, а также от условий измерения сигнала.

Однако при использовании одной и той же методики для совокупности однотипных объектов легко определяемый показатель АОА прямо пропорционален ΣC_{AO} . Именно поэтому метод FRAP позволяет судить об относительной ценности разных вин, разных сортов чая и других источников поступления антиоксидантов в организм человека.

Индикаторные системы на основе комплексов железа применяют для фотометрического определения восстановителей довольно давно [10], но для определения суммы АО – лишь с 1996 г., когда I.F. Benzie и J.J. Strain разработали экспрессный способ оценки АОА плазмы крови [11]. Стандартным веществом в методике [11] служили ионы Fe^{2+} . Изначально термин «FRAP assay» относили лишь к методикам, в которых используется трипиридилтриазин [11-14]. Позднее этот термин стали применять и к методикам, основанным на получении окрашенных комплексов $Fe(II)$ с другими реагентами [15-27]. Индикаторные системы на основе комплексов железа применяют для оценки содержания АО не только в фотометрическом, но и в кулонометрическом [16,17], проточно-инжекционном анализе [18], а также в тест-методах [22,28]. Созданы аналоги метода FRAP, в которых вместо железа(III) окислителем служат соединения $Cu(II)$, $Ce(IV)$ или $Ru(IV)$, Наиболее известен метод CUPRAC, предложенный турецкими аналитиками [26, 29]. В России метод FRAP обычно используют в модификации [21], выражая АОА объектов (например, сухих красных вин) в пересчете на аскорбиновую кислоту [24].

Опубликованы уже сотни работ, в которых биологи, медики и специалисты по технологии пищевых продуктов приводят значения АОА, полученные методом FRAP. Пример – исследования норвежских ученых, создавших базу данных, которая включает 3100 пищевых продуктов и родственных им объектов [27]. Преимущества метода FRAP по сравнению с другими вариантами определения АОА – экспрессность и низкая стоимость единичного анализа, простота оборудования, хорошая сходимость результатов. Это один из немногих методов, обеспечивающих возможность прямого (даже автоматизированного [12]) измерения суммарного содержания АО на уровне 10^{-6} - 10^{-3} моль/дм³. Однако с помощью FRAP трудно определять липофильные АО [5, 7]. Некоторые известные АО (глутатион) не

определяются [9, 14]. С другой стороны, не все определяемые этим методом восстановители активны по отношению к свободным радикалам в условиях *in vivo* [26], что связано с большей кислотностью модельной системы.

Химизм, кинетику и механизм процессов, протекающих при определении АОА методом FRAP, изучали лишь немногие авторы (см. табл. 1), публикаций обзорного типа вообще не было. Плохо проработаны и метрологические

Таблица 1

Развитие метода FRAP и его применение для определения антиоксидантной активности разных объектов

Авторы и ссылка	Год	Реагент	$X_{ст}$	Объекты анализа	Примечания
Benzie, Strain [11]	1996	TPTZ	Fe(II)	Плазма крови	$t = 4$ мин. Изучены стехиометрия реакции и аддитивность.
Benzie, Strain [12]	1999	TPTZ	Fe(II), АК	Чай, вино	Определение АОА, обусловленной полифенолами.
Benzie, Szeto [13]	1999	TPTZ	Fe(II)	Чай	Сопоставлены значения АОА разных сортов чая
Pulido, Bravo, Saura-Calixto [14]	2000	TPTZ	Fe(II)	Модельные растворы	$t = 30$ мин. Выявлено влияние неводного растворителя.
Arya, Jain, Mahajan [15]	2002	DPA	АК	Растения	
Kleszczewsky, Kleszczewska [18]	2002	DIP	АК	Кровь, ткани	Метод ПИА. Проверено влияние посторонних веществ.
Firuzi, Lacanna, Petrucci e.a.[19]	2004	TPTZ	Fe(II)	Модельные растворы	Изучена чувствительность определения разных АО как функция их структуры и редокс-потенциала.
Katalinić, Milos, Modun e.a. [20]	2004	TPTZ	КТ	Разные вина	Сопоставлены разные методы определения АОА вин
Темердашев, Цюпко и др. [21]	2006	DIP, PHEN	АК	Модельные смеси	$t = 60$ мин. Применен стоп-раствор. Проверка аддитивности.
Логонова, Коновалова [22]	2007	DIP	-	Лекарств. препараты	Тест-метод.
Berker, Guclu, Tor e.a. [23]	2007	DIP, PHEN, TPTZ, $Fe(CN)_6^{3-}$	Fe(II)	Модельные растворы	Сопоставлены 6 вариантов метода. Выявлена неаддитивность аналитического сигнала при работе с $Fe(CN)_6^{3-}$
Цюпко, Темердашев и др. [24]	2008	PHEN	АК	Красные сухие вина	Корреляция АОА с другими показателями качества вин
Berker, Guclu, Demirata, Aрак [25]	2010	FZ	Fe(II)	Модельные смеси	Изучена чувствительность определения разных АО.
Вершинин, Власова, Цюпко [30]	2010	DIP, PHEN	АК	Модельные смеси	Выявлена неаддитивность сигнала при недостатке окислителя
Анисимович, Дейнека и др. [33]	2010	DIP	Fe(II)	Модельные растворы	Предложены кинетические параметры оценки АОА.

Примечания: условно обозначено: ПИА – проточно-инжекционный анализ. TPTZ – трипиридилтриазин, DIP – 2,2'-дипиридил, PHEN – о-фенантролин, DPA – пиридиндикарбоновая кислота, FZ – феррозин, АК – аскорбиновая кислота, КТ – катехол, t – время экспозиции, мин.

аспекты этого анализа. Неизвестны значения пределов обнаружения индивидуальных АО, не стандартизованы условия измерений. Ввиду отсутствия стандартных образцов с аттестованным содержанием АО большое внимание уделяется сравнению результатов, полученных методом FRAP и методами, основанными на торможении радикальных реакций, однако выводы разных авторов противоречат друг другу. Некоторые авторы сопоставляют результаты, полученные при варьировании концентрационных условий [30], времени экспозиции [14], а также для разных фотометрических реагентов [23] или разных $X_{ст}$ [31]. Наиболее важной проблемой представляется то, что результат анализа (показатель АОА) является лишь приближительной и субъективной (зависящей от выбора $X_{ст}$, концентрационных условий и времени экспозиции) оценкой суммарного содержания аналитов. Непредсказуемые отличия АОА от $\Sigma C_{АО}$ затрудняют интерпретацию результатов анализа и не позволяют использовать их для сравнения разнотипных объектов. Эти отличия следует считать погрешностью оценки $\Sigma C_{АО}$ (такой подход рекомендован и для других интегральных показателей [32]).

Цель настоящей работы – выявить источники и найти способы уменьшения вышеуказанной систематической погрешности, чтобы метод FRAP после его модификации можно было использовать не только для оценки АОА, но и для точного определения суммарного содержания антиоксидантов-восстановителей, в частности полифенолов. Мы также попытались выявить влияние разных факторов на величину аналитических сигналов отдельных АО и на результаты анализа их модельных смесей. Изучение селективности и переход к анализу реальных объектов требуют отдельного исследования, в данной статье эти вопросы не рассматриваются.

Материалы и методика исследований

Использовали 10 известных антиоксидантов: кверцетин (**КВ**), рутин (**РТ**), катехол (пирокатехин, **КТ**), эпикатехин (**ЭП**), галловую (**ГК**), феруловую (**ФК**), протокатеховую (**ПКК**), мочевую (**МК**) и кофейную (**КК**) кислоты, а также аскорбиновую кислоту (**АК**). Последнее соединение не относится к полифенолам, но обычно сопутствует им в природных объектах. Исходные растворы готовили по точным навескам реактивов х.ч. Рабочие растворы готовили в день употребления, разбавляя исходные растворы бидистиллированной водой. Аналитические сигналы АО получали, вводя избыток комплексного реагента, содержащего ионы Fe^{3+} и 1,10-фенантролин (**PHEN**) или 2,2'-дипиридил (**DIP**). Оптическую плотность раствора через t минут после начала реакции измеряли при 510 или 520 нм относительно чистого растворителя. Время экспозиции t – 10 или 60

мин. Так же измеряли обобщенные аналитические сигналы модельных смесей, содержавших от 2 до 5 индивидуальных АО, концентрации которых (в моль/л) были величинами одного порядка. Для оптимизации условий анализа варьировали условия формирования аналитического сигнала при одной и той же начальной концентрации разных АО и неизменном времени экспозиции. Стремилась максимизировать оптическую плотность при λ_{max} и минимизировать разброс результатов в параллельных опытах. Значения АОА (в мкмоль стандартного вещества в 1 dm^3 раствора, далее мкМ) рассчитывали по градуировочным графикам, построенным с помощью растворов АК или КВ. Сравнивая значения АОА с изначально известной для данной смеси величиной $\Sigma C_{АО}$, находили относительную погрешность (δC , %).

Для проверки идентичности продуктов реакции, полученных с участием разных АО, спектры поглощения окрашенных растворов регистрировали с помощью спектрофотометра Agilent 8453, а затем сопоставляли полученные спектры попарно, рассчитывая коэффициенты линейной корреляции. Для уточнения стехиометрии окисления полифенолов титровали их стандартизованным раствором соли железа(III) с потенциометрическим контролем процесса, используя потенциометр Эксперт-001, платиновый индикаторный электрод и хлорид-серебряный электрод сравнения. Кинетику окисления индивидуальных антиоксидантов изучали в присутствии 1,10-фенантролина или 2,2'-дипиридила в слабнокислых ($pH = 3,6$) водных растворах при 25 °С, вводя избыток окислителя и периодически измеряя оптическую плотность раствора. Начальные концентрации АО при этом варьировали в диапазоне 0,4-5 мкМ. При построении кинетических кривых вносили поправку на оптическую плотность раствора, не содержащего антиоксидантов. Все опыты повторяли не менее трех раз, результаты обрабатывали по Стьюденту ($P = 0,95$), предполагая нормальное распределение случайных погрешностей. Для повышения надежности выводов эксперимент по одной и той же схеме вели две группы исполнителей. В лабораториях КубГУ в основном работали с индикаторной системой Fe-PHEN, а в ОмГУ – с аналогичной ей системой Fe-DIP. Выводы, полученные обеими группами, как правило, совпадали.

Результаты и их обсуждение

Оптимизация условий анализа при определении индивидуальных АО. Варьируемыми факторами были величина pH, ионная сила раствора, начальные концентрации Fe^{3+} и фотометрического реагента, а также время экспозиции и температура. Было установлено, что ионная сила раствора практически не влияет на аналитические сигналы индивидуальных полифе-

нолов. Зависимость сигнала от pH оказалась приблизительно одинаковой для разных полифенолов и разных индикаторных систем. А именно, измерение АОА методом FRAP возможно в пределах от pH = 2 до pH = 5, причем максимальный сигнал формируется при pH = 3,6. Колебания pH сильно влияют на результат анализа, поэтому для снижения уровня случайных погрешностей желателен (но не обязателен) ввод подходящего буферного раствора. Несмотря на то, что окислитель изначально вводили в избытке, дальнейшее увеличение его начальной концентрации при pH = Const приводит к росту сигнала. Дело в том, что выход продукта реакции за время экспозиции не достигает 100 % от теоретически возможного. Поэтому сигнал любого полифенола зависит от скорости его окисления. Последняя, в свою очередь, тем выше, чем больше $C_{Fe(III)}$. Определяя АОА на уровне до 10 мкМ (в пересчете на АК), следует вводить ионы Fe^{3+} в концентрации 100-200 мкМ.

Варьирование концентрации фотометрического реагента не приводило к существенным изменениям аналитического сигнала, при условии, что реагент взят в избытке по отношению к другим компонентам индикаторной системы. Выбор времени экспозиции (10 или 60 мин) достоверно влияет на величину сигнала. При увеличении t повышается чувствительность определения АО, но одновременно усиливается фон и растет вероятность неаддитивного светопоглощения [30]. Коэффициенты вариации при измерении аналитического сигнала и повторном приготовлении модельных растворов для индивидуальных полифенолов не превышают 3 % (табл. 2). Чуть выше уровень случайных погрешностей при измерении сигналов модельных смесей.

Следовало ожидать, что увеличение температуры реакционной смеси будет увеличивать скорость окисления АО, а тем самым и

Таблица 2

Коэффициенты вариации (%) при определении индивидуальных АО с помощью разных индикаторных систем при разном времени экспозиции (концентрации индивидуальных АО – по 2,0 мкМ)

Аналит	Fe(III)–PHEN		Fe(III)–DIP	
	10 мин	60 мин	10 мин	60 мин
АК	1,9	1,4	1,3	1,7
КВ	1,5	1,1	1,6	1,1
ГК	1,9	1,5	1,2	1,4
КТ	0,95	1,7	0,70	0,65
АК + ГК	2,7	2,5	4,9	1,5
ГК + КТ	2,0	1,6	3,9	2,0
АК + КВ	3,1	1,1	1,0	0,54

аналитические сигналы определяемых полифенолов. Однако при колебаниях температуры порядка ± 1 °C величина аналитического сигнала меняется в пределах погрешности измерений. Поэтому термостатирование растворов во время экспозиции желательно, но не обязательно. При температурах выше 30 °C зависимость сигнала АО от температуры снижается, поскольку система за время экспозиции успевает приблизиться к равновесию, и влияние кинетических факторов заметно уменьшается. Отметим, что изменение температуры примерно одинаково влияет на аналитические сигналы разных АО.

Анализ модельных смесей. Качественный состав продуктов реакции. Для модельных смесей АО отличия найденного показателя АОА от ΣC_{AO} (при выражении обеих величин в мкМ) иногда доходят до 100 %. Погрешность δC может быть и положительной, и отрицательной (табл. 3). Были последовательно проверены три возможные причины отличия АОА от ΣC_{AO} :

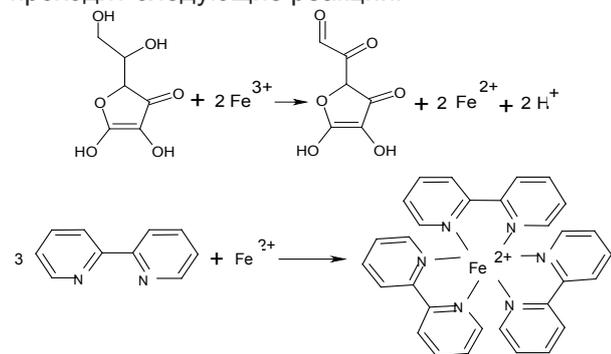
Таблица 3

Значения АОА модельных смесей АО в пересчете на разные стандартные вещества (во всех случаях $\Sigma C_{AO} = 4,0$ мкМ, система Fe–PHEN, $t = 60$ мин)

Состав смеси		$X_{ст} = АК$		$X_{ст} = КВ$	
Компонент	C, мкМ	АОА, мкМ	δC , %	АОА, мкМ	δC , %
АК	3,0	5,6 ± 0,2	40	2,13 ± 0,08	- 46
КВ	1,0				
АК	1,0	4,6 ± 0,1	15	1,61 ± 0,05	- 60
РТ	3,0				
АК	2,0	7,2 ± 0,3	80	2,4 ± 0,1	- 40
ГК	2,0				
КВ	0,5	4,6 ± 0,3	15	1,6 ± 0,1	- 60
ФК	3,5				
КТ	2,0	4,6 ± 0,5	15	1,6 ± 0,2	- 60
ПКК	2,0				
АК	1,5	5,6 ± 0,2	40	1,9 ± 0,1	- 52
КТ	1,5				
ПКК	1,0				

- 1 - отличие качественного состава продуктов реакции для смеси аналитов по сравнению с реакцией с участием стандартного вещества;
- 2 - неаддитивность аналитических сигналов компонентов смеси;
- 3 - разная чувствительность определения индивидуальных АО.

Рассмотрим сначала влияние первого фактора. По литературным данным, антиоксиданты, определяемые методом FRAP, реагируют с ионами железа(III) с образованием интенсивно окрашенного и координационно насыщенного комплекса железа(II) с фотометрическим реагентом. Примером может быть определение АК в присутствии индикаторной системы Fe(III)–DIP. Считают [34], что при этом проходят следующие реакции:



Более вероятен иной механизм формирования аналитического сигнала, предполагающий первоначальное образование комплекса железа(III) с 2,2'-дипиридилем и его последующее восстановление антиоксидантом [8]. При одновременном окислении нескольких АО не исключено их взаимодействие, а также окисление первоначально образующихся продуктов избытком железа(III) [33], образование комплексов железа(III) с окисленными формами полифенолов и другие побочные реакции. Для уточнения химизма процесса мы поочередно проводили реакцию между комплексным реагентом Fe(III)-DIP и разными АО при pH 3,6. Спектры погло-

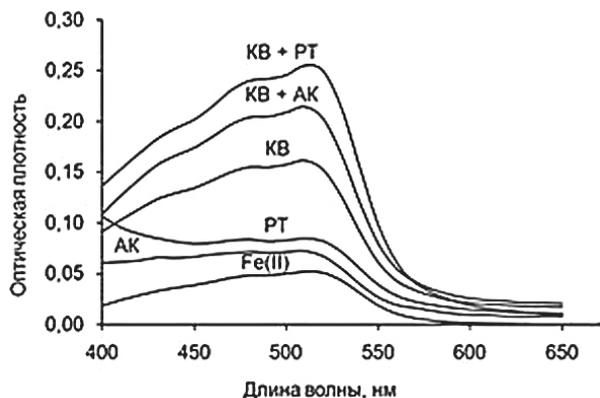


Рис. 1. Спектры продуктов реакции с участием разных АО и их смесей. Индикаторная система Fe(III)–PHEN, длина кюветы 1,0 см

щения полученных растворов регистрировали через 60 мин в области 400–600 нм. В тех же условиях в отсутствие АО получали комплекс Fe(II) с 2,2'-дипиридилем (катионный комплекс FeR_3) и снимали его спектр поглощения. Коэффициенты линейной корреляции спектров, взятых попарно, составляют 0,98–0,99, то есть по положению в шкале длин волн и по форме спектры поглощения продуктов реакции совпадают со спектром поглощения FeR_3 . Очевидно, разные АО восстанавливают комплексный реагент до одного и того же продукта. Сопоставление спектров, полученных при разном времени экспозиции, при разной концентрации одного и того же АО или в присутствии сразу нескольких АО, показало, что качественный состав продуктов реакции не зависит и от этих факторов. К аналогичным выводам мы пришли, сопоставляя спектры поглощения продуктов восстановления комплексного реагента Fe(III)-фенантролин разными полифенолами со спектром фенантролинового комплекса железа(II) (рис. 1).

Таким образом, объяснить расхождение АОА и $\Sigma C_{\text{АО}}$ изменением качественного состава продуктов реакции нельзя: стандартное вещество в ходе градуировки дает тот же окрашенный продукт, что и смесь АО в ходе анализа пробы сложного состава. Небольшие отличия сопоставляемых спектров были выявлены лишь в коротковолновой области ($\lambda < 450 \text{ нм}$), в частности, для рутина. Возможно, продукты гидролиза и окисления рутина (анионы), поглощающие в УФ области, образуют в растворе малопрочные ассоциаты с катионным комплексом FeR_3 , что несколько искажает спектр поглощения последнего. Поэтому при определении суммарного содержания антиоксидантов использовать область 400–450 нм не следует. В области же максимума светопоглощения комплекса FeR_3 (510–520 нм) присутствие продуктов окисления антиоксидантов не искажает их аналитические сигналы, то есть не является источником систематических погрешностей.

Неаддитивность светопоглощения смесей. Отклонения от аддитивности должны приводить к отличию АОА от $\Sigma C_{\text{АО}}$. При определении АОА по методике [21] смеси аскорбиновой кислоты и кверцетина в некоторых условиях дают отрицательные отклонения от аддитивности порядка 30–40 % отн., независимо от длины волны [30, 35]. Значимые отклонения от аддитивности светопоглощения наблюдали и при использовании феррицианидной индикаторной системы [23]. В других случаях отклонения выявлены не были [11, 21, 23, 25]. Дополнительная проверка в ходе настоящего исследования показала, что при определении АОА одни и те же комбинации полифенолов могут давать и аддитивные (при низкой концентрации аналитов и высокой кон-

центрации окислителя), и неаддитивные (при небольшом избытке окислителя) смеси. Отрицательные отклонения от аддитивности возникают не из-за непосредственного взаимодействия полифенолов, а за счет конкурентного замедления реакций в условиях нехватки окислителя [35]. Однако возможны и другие механизмы возникновения отклонений от аддитивности (протолиз, ассоциация). Так, в отличие от смесей, включенных в табл. 3, смесь ГК-КТ при $\Sigma C_{AO} = 4$ мкМ независимо от природы фотометрического реагента давала достоверные *положительные* отклонения от аддитивности, что нельзя объяснить эффектом конкурентного замедления. При использовании аскорбиновой кислоты в качестве стандартного вещества величина АОА для неаддитивной смеси ГК-КТ втрое превышает величину ΣC_{AO} ! Тем не менее, мы считаем, что неаддитивность светопоглощения не может быть основной причиной отличий АОА от ΣC_{AO} , поскольку отличия наблюдаются и для аддитивных систем, указанных в табл. 3.

Чувствительность определения разных АО и стехиометрия реакций. Наиболее вероятная причина отличия АОА от ΣC_{AO} - разная чувствительность определения индивидуальных АО, зависящая от стехиометрии и скорости соответствующих реакций. Известно, что разная чувствительность определения компонентов какой-либо смеси («веер градуировочных графиков») приводит к систематическим погрешностям при оценке их суммарного содержания в пересчете на стандартное вещество [38, 39]. Для прогнозирования погрешностей следовало выяснить, насколько различна чувствительность определения разных АО методом FRAP. Полученные нами градуировочные графики прямолинейны в достаточно широких концентрационных интервалах, наклоны соответствующих графиков (коэффициенты чувствительности) достоверно различались (рис. 2, а). И по нашим данным, и по данным зарубежных исследователей относительная чувствительность аналитического сигнала к разным АО снижается в ряду $KB > GK > AK \approx FK$. Для облегчения сопоставления данных, полученных для разных индикаторных систем, мы нормировали коэф-

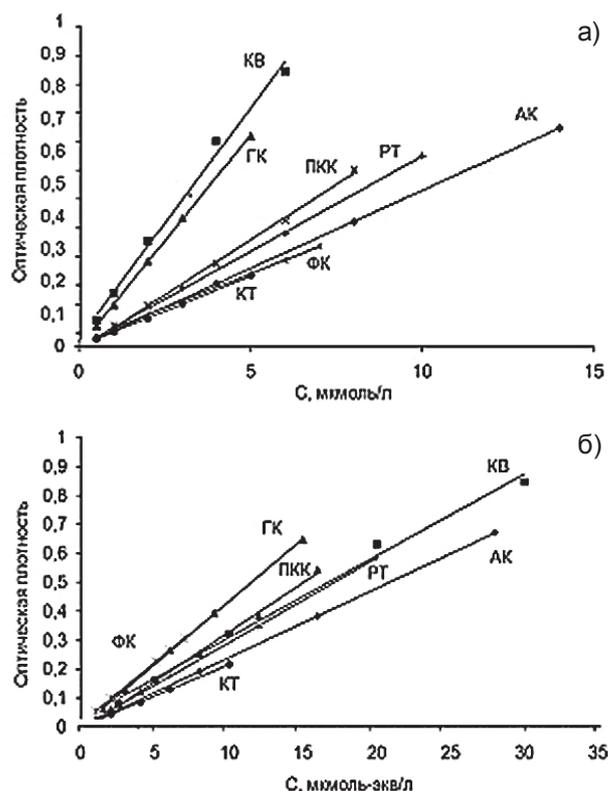


Рис. 2. «Веер» градуировочных графиков при разных способах выражения концентраций АО: а – в мкмоль/л; б – в мкмоль-экв/л. Индикаторная система Fe(III)–PHEN

фициенты чувствительности по одному и тому же соединению - по АК (табл. 4).

Объяснить вышеприведенный «ряд активности», не связанный с выбором фотометрического реагента или времени экспозиции, можно, если учесть стехиометрию окисления АО. Число электронов, которое отдает одна молекула АО в ходе ее взаимодействия с железом(III), у разных АО различно (табл. 5). Далее это число обозначается символом *m*. Так, для аскорбиновой кислоты и тролокса $m = 2$ [11, 36]. Восстановители типа кверцетина и галловой кислоты при окислительно-восстановительном взаимодействии с избытком железа(III) отдают больше электронов и образуют больше ионов Fe^{2+} [33, 37], что и объясняет большую чувствительность фотометрического определения этих АО по сравнению с аскорбиновой кислотой. Связь от-

Таблица 4

Нормированные по АК коэффициенты чувствительности, полученные разными авторами для разных условий определения АОА

АО	Fe(III)–DIP		Fe–PHEN		Fe–FZ	Fe–TPTZ
	10 мин [41]	60 мин [41]	60 мин [41]	30 мин [23]	30 мин [25]	6 мин [23]
KB	2,09	2,42	3,28	4,11	3,60	1,93
GK	1,74	1,61	3,02	3,80	2,50	2,66
AK	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
FK	0,71	0,57	1,00	1,17	0,91	0,99

Таблица 5

Количество электронов, принимающих участие в окислительно-восстановительной реакции (в расчете на 1 молекулу АО)

АО	Наши данные	Данные [36,37]
АК	2	2
ГК	3	3
КВ	–	5
РТ	2	4
КТ	2	2
ПКК	2	–
ФК	2	2

носительной чувствительности спектрофотометрического определения разных АО с величиной их редокс-потенциалов, постулируемая в работе [19], представляется менее убедительным объяснением.

Мы определяли величину m двумя способами: а – проводя потенциометрическое титрование полифенолов стандартизованным раствором железа(III) в присутствии 1,10-фенантролина или 2,2'-дипиридила; б – используя традиционный для спектрофотометрического анализа способ прямого (или обратного) насыщения [40]. Отметим, что стехиометрию взаимодействия исследуемых полифенолов с комплексным реагентом приходилось проверять

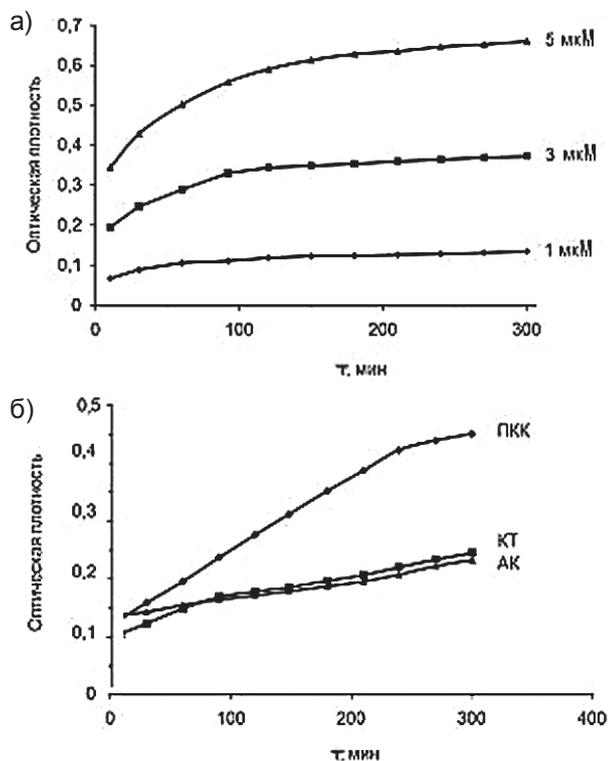


Рис. 3. Формирование аналитического сигнала: а) при разных концентрациях одного АО (галловой кислоты); б) при одинаковой начальной концентрации (3,0 мкМ) разных АО. Индикаторная система Fe(III)–PHEN, 25 °С

при несколько более высоких концентрациях, чем при определении антиоксидантной активности. Для некоторых АО определить величину m не удалось ни путем титрования, ни методом насыщения, в таких случаях мы использовали литературные данные. Как видно из табл. 5, изученные полифенолы имеют значения m от 2 до 5, что приблизительно соответствует различию коэффициентов чувствительности. Найденные значения m в дальнейшем использовали для пересчета молярных концентраций растворов АО в нормальные.

Кинетика взаимодействия разных АО с окислителем. Как видно из рис. 2, а, с разной чувствительностью могут определяться и те антиоксиданты, которые имеют одинаковые значения m . Примером могут быть аскорбиновая и протокатеховая кислоты. По нашим данным, для обоих соединений $m \approx 2$, но чувствительность определения ПКК в 1,5 раза выше. Подобные эффекты могут быть объяснены разной скоростью взаимодействия с окислителем. При фиксированном времени экспозиции более «быстрый» антиоксидант (ПКК) должен определяться с большей чувствительностью, и этот эффект может быть источником систематических погрешностей при оценке суммарного содержания АО (наряду с различиями в стехиометрии редокс-реакций). Кинетические кривые, полученные для разных начальных концентраций одного и того же АО, однотипны (рис. 3, а). Однотипны, но различны по наклону и кривые, полученные при одинаковой начальной концентрации разных АО (рис.3, б). Аналогичные кривые получали наши предшественники, работавшие с другими антиоксидантами [14, 26, 33].

Полученные кривые по своей форме не соответствуют типичным кинетическим кривым нулевого, первого или второго порядка, что указывает на сложный механизм взаимодействия индивидуальных АО с окислителем. По-видимому, процесс включает три стадии.

1. *Быстрый и постепенно замедляющийся рост оптической плотности в первые минуты после смешения растворов.* За первые 10 минут процесс проходит на 40–70 %, смотря по природе АО и его концентрации.

2. *Медленный рост оптической плотности в последующие четыре часа.* При большом избытке окислителя кинетические кривые на этом этапе приблизительно линейны ($R^2 \approx 0,9$). Через 60 мин после смешивания реагентов процесс формирования сигнала протекает на 70–90 % от максимально достигаемого значения. За время экспозиции формирование сигнала не заканчивается, и кинетические факторы должны влиять на выход окрашенного продукта, а, следовательно, и на результат анализа. Скорость реакции на этом этапе зависит от при-

Таблица 6

Значения АОА модельных смесей антиоксидантов, выраженные в мкмоль-экв/л в пересчете на разные стандартные вещества (система Fe–PHEN, $\tau = 60$ мин)

Состав смеси		ΣC_{AO}		$X_{CT} = AK$		$X_{CT} = KB$	
Компонент	C, мкМ	мкмоль	мкмоль-экв	АОА, мкмоль-экв	$\delta C, \%$	АОА, мкмоль-экв	$\delta C, \%$
АК КВ	3,0 1,0	4,0	11,0	12,5 ± 0,5	14	10,6 ± 0,4	-4
АК РТ	1,0 3,0	4,0	8,0	9,4 ± 0,3	17	8,0 ± 0,2	0
АК ГК	2,0 2,0	4,0	10,0	14,4 ± 0,6	44	12,2 ± 0,5	22
КВ ФК	0,5 3,5	4,0	9,5	9,3 ± 0,7	-2	7,9 ± 0,6	-17
КТ ПКК	2,0 2,0	4,0	8,0	9,3 ± 0,9	16	7,9 ± 0,9	-1
АК КТ ПКК	1,5 1,5 1,0	4,0	8,0	10,9 ± 0,9	36	9,5 ± 0,4	19

роды восстановителя. При одинаковой начальной концентрации разных АО скорость развития окраски для системы Fe–PHEN снижается в следующем ряду:

КВ ≈ ПКК > РТ > ГК > КТ > АК > ФК

3. *Приблизительное постоянство оптической плотности в течение последующих 24 часов.* К концу третьего этапа для некоторых АО (кверцетин) наблюдается небольшое снижение оптической плотности.

В отсутствие АО оптическая плотность раствора на аналитической длине волны медленно и монотонно увеличивается; возможно, из-за гидролиза первоначально образующегося комплекса железа(III). Спектры поглощения продуктов реакции не соответствуют спектру поглощения комплекса железа(II) с фотометрическим реагентом. Поскольку фон намного ниже, чем сигнал при $C_{AO} = 1$ мкМ, побочная реакция может быть источником систематической погрешности лишь при определении очень низких содержаний АО. Тем не менее, при разработке методик анализа следует учитывать наличие фона.

Оценка суммарного содержания АО с помощью нормальных концентраций. Приведенные данные свидетельствуют, что причиной отличия АОА от ΣC_{AO} в методе FRAP является различная чувствительность определения разных антиоксидантов, обусловленная разной стехиометрией, а также разной скоростью их окисления. Влияние стехиометрии может быть элиминировано, если выражать содержание АО в исследуемых объектах в пересчете на эквиваленты стандартного вещества. Можно привести полезную аналогию: при титровании смеси кислот разной основности их суммарное содержание можно правильно определить только в том случае, если выражать все концентрации в

моль-экв/л, т.е. использовать нормальные, а не молярные концентрации. Указанный подход не является чем-то совершенно новым и при определении АОА. В ряде работ по определению антиоксидантов их авторы рекомендуют выражать содержание АО в реальных объектах, используя так называемые тролокс-эквиваленты (единицы ТЕАС) [5-9], независимо от способа измерения АОА. Аналогичный способ выражения концентраций применяли и в рамках метода FRAP [14]. Но в соответствующих публикациях не указывается, что применение нормальных концентраций для оценки АОА уменьшает отличие этого интегрального показателя от действительного суммарного содержания антиоксидантов (при выражении обеих величин в моль-экв/л), то есть уменьшает систематическую погрешность.

Сопоставление рис. 2, а и 2, б показывает, что в результате перехода от молярных к нормальным концентрациям, вычисленным для каждого АО с учетом числа отдаваемых им электронов m , коэффициенты чувствительности индивидуальных АО сближаются. Веер градуировок для одного и того же набора АО на рис. 2, а составляет 35 градусов, а на рис. 2, б - 20 градусов¹. Следовательно, переход к нормальным концентрациям должен приводить к более точной оценке суммарного содержания антиоксидантов. Для проверки мы использовали смеси, уже охарактеризованные в табл. 3, и результаты измерения их оптической плотности. Однако значения АОА находили по другим градуировочным графикам, а именно - при-

¹ При определении суммарных содержаний ряда аналитов и соответствующих им интегральных показателей характеристика веера градуировок в градусах является общепринятым приемом [38].

веденным на рис.2, б. Полученные результаты (табл. 6) показывают, что учет стехиометрии реакции (переход к нормальным концентрациям) действительно снижает уровень систематических погрешностей, приближает показатель АОА к ΣC_{AO} . Чтобы убедиться в этом, достаточно сопоставить значения погрешностей оценки ΣC_{AO} , приведенные в табл. 3 и в табл. 6. Как правило, абсолютная величина погрешностей после перехода к нормальным концентрациям снижается в 2-3 раза.

Учет стехиометрии реакции не приводит к абсолютной тождественности градуировочных графиков и полному исключению систематических погрешностей при оценке суммарного содержания антиоксидантов. Это объясняется сохраняющимся влиянием различий в скорости взаимодействия разных АО с окислителем. Однако можно предположить, что повышение температуры или времени экспозиции, а также изменения концентраций реагентов, - снизят влияние кинетических факторов и еще более приблизят показатель АОА к действительному содержанию антиоксидантов. Результаты соответствующих исследований будут отражены в следующих сообщениях.

Заключение. Можно сформулировать следующие выводы:

1. Метод FRAP является весьма распространенным в практике, удобным и надежным, но пока что недостаточно изученным способом определения суммарной антиоксидантной активности разных объектов, создаваемой гидрофильными антиоксидантами-восстановителями, в частности полифенолами. Выбор той или иной индикаторной системы, времени и температуры экспозиции, а также концентрационных условий не имеет принципиального значения, но должно быть обеспечено оптимальное значение pH и достаточно большой избыток окислителя и фотометрического реагента.
2. Метод FRAP может быть применен и для приблизительной оценки суммарного содержания антиоксидантов. Однако этому мешают систематические погрешности, связанные с разной стехиометрией и разной скоростью формирования аналитического сигнала, а в некоторых случаях – и с его неаддитивностью.
3. Для повышения точности оценки суммарного содержания антиоксидантов в реальных объектах желательнее выражать эти содержания в моль-экв/л, а градуировочные графики строить, используя растворы стандартного вещества с известными нормальными концентрациями.
4. Перспективным направлением дальнейших исследований, направленных на повышение точности оценки суммарного содержания антиоксидантов, является снижения влияния кинетических факторов (за счет приближения выхода продук-

тов реакции к 100 %). Не менее важно проверить корреляцию результатов анализа и суммарной антиоксидантной активности природных смесей антиоксидантов, оцениваемой альтернативными методами, в том числе в экспериментах *in vivo*.

Авторы благодарят за участие в выполнении эксперимента инж. Кайгородову Н.В. (ОмГУ), канд. хим. наук, доцента Воронову О.Б. (КубГУ) и студ. Провоторову Е.В. (КубГУ). В обсуждении результатов приняли участие докт. хим. наук П.Г. Цырульников и канд. хим. наук И.В. Власова, которым авторы искренне признательны за ценные замечания. Исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», госконтракт П-1103).

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. Будников Г.К., Зиятдинова Г.К. Антиоксиданты как объекты биоаналитической химии // Ж. аналит. химии. 2005. Т. 60, № 7. С. 678-691.
3. Determination of total polyphenols content in green tea using FT-NIR spectroscopy and different PLS algorithms. / C. Quansheng and [et. al.] // J. of pharm. biomed. analysis. 2008. V. 46, № 3. P. 568-573.
4. Simonetti P., Pietta P., Testolin G. Polyphenol content and total antioxidant potential of selected Italian wines // J. Agric. and Food Chem. 1997. V. 45, № 4. P. 1152-1155.
5. Methods for testing of antioxidant activity / M. Antolovich and [et. al.] // Analyst. 2002. V. 127, № 1. P. 183-198.
6. Хасанов В.В., Рыжова Г.Л., Мальцева Е.В. Методы исследования антиоксидантов // Химия растительного сырья. 2004. № 3. С. 63-75.
7. Roginsky V., Lissi E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food // Food chemistry. 2005. V. 92, № 2. P. 235-254.
8. Moon J.K., Shibamoto T. Antioxidant assays for plant and food components // J. Agric. and Food Chem. 2009. V. 57, № 5. P. 1655-1666.
9. Karadag A., Oselic B., Saner S. Review of methods to determine antioxidants capacities // Food analytical methods. 2009. № 2. P. 41-60.
10. Lau O.W., Luk S.F. Spectrophotometric determination of ascorbic acid in canned fruit juices, cordials, and soft drinks with iron(III) and 1,10-phenanthroline as reagents. // J. Assoc. off. Anal. Chem. 1987. V. 70, № 3. P. 518-520.
11. Benzie I.F.F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "anti-

- oxidant power": the FRAP assay // *Anal. Biochem.* 1996. V. 239, № 1. P. 70-76.
12. Benzie I.F.F., Strain J.J. Ferric reducing antioxidant power assay. Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration // *Methods in enzymology. Oxidants and Antioxidants. Part A.* 1999. V. 299. P. 15-27.
 13. 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.
 14. 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.
 15. Arya S.P., Jain P., Mahajan M. A new method for the ascorbic acid assay using iron(II) - pyridine-2,6-dicarboxylic acid complex // *Annali di chimica.* 2002. V. 92, № 11-12. P. 1159-1164.
 16. 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 / Online First*, 19 October 2010. DOI: 10.1007/s12161-010-9174-0.
 17. Зиятдинова Г.К., Низамова А.М., Будников Г.К. Кулонометрическая оценка железозаменяющей способности некоторых продуктов питания // *Бутлеровские сообщения.* 2011. Т. 25, № 4. С. 72-79.
 18. Kleszczewsky T., Kleszczewska E. Flow injection spectrophotometric determination of L-ascorbic acid in biological matters // *J. of pharmaceutical and biomedical analysis.* 2002. V. 29, № 4. P. 755-759.
 19. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry / O. Firuzi and [et. al.] // *Biochimica et Biophysica Acta. General Subjects.* 2005. V. 1721, № 1-3. P. 174-184.
 20. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin / V. Katalinić and [et. al.] // *Food Chem.* 2004. V. 86, № 4. P. 593-600.
 21. 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.
 22. Логинова Л.П., Коновалова О.Ю. Метрологические характеристики обнаружения восстановителей с реагентами, иммобилизованными в желатиновой пленке // *Вісник Харківського національного університету.* 2007. Т. 15(38), № 770. С. 90 – 98.
 23. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. / K.I. Berker and [et. al.] // *Talanta.* 2007. V. 72, № 3, P. 1157-1165.
 24. 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.
 25. A novel antioxidant assay of ferric reducing capacity measurement using ferrozine as the colour forming complexation reagent / K.I. Berker and [et. al.] // *Food Analytical Methods.* 2010. V. 2, № 11. P. 1770-1778.
 26. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay / R. Apak and [et al.] // *Molecules.* 2007. V. 19, № 7. P. 1496 -1547.
 27. M.H. Carlsen et. al. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide // *Nutritional Journal.* 2010. V. 9, № 1. [Электронный ресурс]: <http://www.nutritionj.com/content/9/1/3> (дата обращения 28.04.2011).
 28. A new test-method for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products / O.A. Zaporozhets and [et al.] // *J. Agric. and Food Chem.* 2004. V. 52, № 1. P. 21-25.
 29. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproin: CUPRAC method / R. Apak and [et al.] // *J. Agric. and Food Chem.* 2004. V.52, № 26. P. 7970-7981.
 30. 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, № 4. С. 226-233.
 31. Nenadis N., Lazaridou O., Tsimidou M.Z. Use of reference compounds in antioxidant activity assessment // *J. Agric. and Food Chem.* 2007. V. 55, № 14, P.5452-5460.
 32. Baena J.R., Valcarcel M. Total indices in analytical sciences // *Trends in Analytical Chemistry.* 2003. V. 22, № 10. P. 641-646.
 33. Параметры антиоксидантной активности соединений: относительная антиоксидантная активность чая / И.П. Анисимович и [др.] // *Научные ведомости Белгородского гос. университета. Сер. «Естественные науки».* 2010. Т. 9(80), № 11. С. 104-110.
 34. Комплексные соединения в аналитической химии. Теория и практика применения / Ф.М. Умланд и [др.]. М: Мир, 1975. 531 с.
 35. Методология спектрофотометрического анализа неразделенных смесей органических соединений. Применение статистических моделей / В.И.Вершинин и [др.] // *Ж. аналит. химии.* 2011. Т. 66, № 7. С. 708-715.

36. Зиятдинова Г. К. Гальваностатическая кулонометрия в анализе природных полифенолов и ее применение в фармации // Ж. аналит. химии. 2010. Т. 65, № 11. С. 1202-1206.
37. Шарафутдинова Е.Н. Потенциометрия в исследовании антиоксидантной активности объектов растительного происхождения. Автореф. дис. ... канд. хим. наук. Екатеринбург, 2007. 24 с.
38. Семенов А.Д., Страдомская А.Г., Павленко Л.Ф. Количественное определение нефтепродуктов в поверхностных водах // Методы анализа природных и сточных вод. Проблемы аналитической химии. Т. 5. М.: Наука, 1977. С. 203-209.
39. Вершинин В.И. Априорная оценка погрешности определения суммарного содержания аналитов с учетом индивидуальных коэффициентов чувствительности // Вестник ОмГУ. 2011. № 2. С. 113-119.
40. Булатов М.И., Калинин И.П. Практическое руководство по фотоколориметрическим и спектрофотометрическим методам анализа. Л: Химия, 1986. 384 с.
41. Вершинин В.И., Бриленок Н.В., Цюпко Т.Г. Методология спектрофотометрического анализа смесей органических соединений. Погрешность оценки суммарного содержания аналитов с учетом их коэффициентов чувствительности // Ж. аналит. химии. 2012. Т. 67, № 1 (в печати).

DETERMINATION OF TOTAL CONTENT OF ANTIOXIDANTS BY FRAP ASSAY

*T.G. Tsytko¹, I.S. Petrakova², N.S. Brilenok², N.A. Nikolaeva¹,
D.A. Chuprinina¹, Z.A. Temerdashev¹, V.I. Vershinin²*

*¹Kuban State University
Russia, 350040, Krasnodar, 149 Stavropolskaya Str.*

*²Dostoevsky Omsk State University
Russia, 644077, Omsk, 55^a Mira Str.*

Brief review of publications devoted to FRAP assay shows it as the tool for determination of total antioxidant capacity of foodstuffs and other objects. The effect of various factors on analytical signal has been investigated and optimized. Results of model mixtures analysis differ from total content of antioxidants (polyphenols). The main reason of such errors is the specific stoichiometry of components oxidation by oxidizing reagent. To decrease these errors we recommend to evaluate results of analysis not in moles or in milligrams, but in moles of equivalents.

Key words: spectrophotometric analysis, determination of antioxidants, total antioxidant capacity, polyphenols, total indices.