

Определение суммарного содержания фенольных антиоксидантов в чае с применением разных вариантов метода FRAP

Т.Г. Цюпко¹, Н.С. Бриленок², К.С. Гуцаева¹, *В.И. Вершинин²

¹Кубанский государственный университет,
Российская Федерация, 350040, г. Краснодар, ул. Ставропольская, 149

²Омский 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 12 декабря 2018 г.

Суммарное содержание (c_{Σ}) фенольных антиоксидантов (ФА) в образцах черного чая определяли на уровне 10^{-3} моль/г, используя разные варианты метода FRAP. Спектрофотометрический анализ образцов вели в двух независимых лабораториях, применяя разные реагенты (о-фенантролин и 2,2'-дипиридил) и разные времена экспозиции (60 и 10 минут). Результаты анализа (c^*), выраженные в пересчете на разные стандартные вещества (галловую и аскорбиновую кислоты), характеризуют антиоксидантную активность чая (АОА). Применение более слабой окислительной системы (Fe^{3+} + 2,2'-дипиридил) ведет к несколько меньшим значениям c^* , выраженным в мМ-экв/г, чем применение системы (Fe^{3+} + о-фенантролин). Для части образцов расхождения статистически достоверны, но во всех случаях они не превышают 20 % отн. Расчеты АОА по способу добавок и по градуировочному графику дают совпадающие значения, что указывает на отсутствие в чайных настоях веществ, снижающих чувствительность определения ФА, в частности железосвязывающих комплексантов. Интервальные оценки c_{Σ} рассчитывали по найденным значениям c^* с учетом внутригрупповой селективности сигналов. Полученные интервалы на порядок шире доверительных интервалов, вычисляемых по Стьюденту с учетом прецизионности измерений, и включают значения c^* , полученные с применением другого стандартного вещества ($X_{ст}$). Приблизительное совпадение интервалов возможных значений c_{Σ} , полученных с применением разных методик измерения сигналов и разных $X_{ст}$, позволяет считать метод FRAP пригодным не только для вычисления интегрального показателя АОА, но и для объективной оценки суммарного содержания ФА в чае. Очевидно, метод FRAP может стать основой нового способа контроля качества чая, менее чувствительного к влиянию посторонних веществ, чем традиционно применяемый в контрольно-аналитических лабораториях метод Фолина-Чокальтеу. Выражение результатов анализа чая по методу FRAP без пересчета на $X_{ст}$ обеспечит их метрологическую корректность. Актуальной и пока что нерешенной задачей является снижение неопределенности результатов такого анализа. Способом решения этой задачи является сближение коэффициентов чувствительности при спектрофотометрическом определении индивидуальных ФА.

Ключевые слова: чай, фенольные антиоксиданты, суммарное содержание, интервальные оценки, аналитический контроль, метод FRAP, антиоксидантная активность.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2019, vol. 23, no. 1, pp. 143–151

DOI: 10.15826/analitika.2019.23.1.011

Determination of the total phenol antioxidants content in tea samples using different variations of FRAP assay

T.G. Tsytko¹, N.S. Brilenok², K.S. Gushchaeva¹, *V.I. Vershinin²

¹Kuban State University, Stavropolskaja str. 149, Krasnodar, 350040, Russian Federation

²Dostoevsky Omsk State University, Mira str. 55a, Omsk, 644077, Russian Federation

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

Submitted 12 December 2018

The total content (c_{Σ}) of phenolic antioxidants (**PhA**) in black tea samples was determined at 10^{-3} mol/g level using different variations of the FRAP assay. The spectrometric analysis was performed in two independent laboratories using different subsidiary reagents (*o*-phenanthroline or 2,2'-dipyridyl) and different exposure times (60 or 10 min). The results of the analysis (c^*) of tea samples were recalculated to different standard substances (X_{st}), namely gallic and ascorbic acids. The obtained data defined the total antioxidant activity of tea samples. The use of a weaker oxidizing agent ($Fe^{3+} + 2,2'$ -dipyridyl) in each case led to slightly lower values of c^* (mM-eq/g) than the use of another agent ($Fe^{3+} + o$ -phenanthroline). For the two samples the discrepancies were statistically reliable and for all samples they did not exceed 20% rel. The calculations obtained with the additives method or with the calibration curve (all other things being equal) led to the coincident values of c^* . This fact indicated that the tea infusions did not contain any substances that reduced the sensitivity of PhA determination, and particularly did not include iron-binding complexants. The intervals of possible c_{Σ} values were calculated for each sample taking into account the intragroup selectivity of the signals. The width of this interval defined the uncertainty of PhA total content data. The calculated interval estimates included c^* values obtained with another X_{st} . These intervals were an order of magnitude wider than the confidence intervals calculated with the Student algorithm, which considers only the measurement precision. The approximate coincidence of the interval estimates obtained with the different standard substances, makes the FRAP assay appropriate not only for calculating the total index "antioxidant activity", but also for an objective estimate of the total PhA content. Obviously, the FRAP assay can be taken as a foundation of a new way to control the tea quality; this way seems to be more accurate and less sensitive to the influence of foreign substances than the conventional for many laboratories Folin-Ciocalteu method. The expression of the analysis results without recalculation of the X_{st} concentration is likely to provide the metrological correctness of these results. Current but still unresolved problem is to reduce the uncertainty of c_{Σ} interval estimates. To solve this problem, it is necessary to level the sensitivity coefficients of the individual antioxidants.

Keywords: tea, phenolic antioxidants, total content, interval estimates, analytical control, FRAP assay, antioxidant activity

ВВЕДЕНИЕ

Чай содержит довольно много фенольных антиоксидантов (**ФА**), формирующих цвет, вкус и аромат чайного настоя. Это катехины и их эфиры (галлаты), флаванолы, антоцианы и другие восстановители, среди которых доминируют полифенольные соединения (танины) [1, 2]. В зависимости от разновидности чайного растения, географического происхождения и способа обработки чайных листьев, разные виды чая различаются по суммарному содержанию ФА (c_{Σ}), а также по относительному содержанию разных ФА в их природной смеси. В чайной продукции невысокого качества содержание ФА очень мало [3]. Тем не менее, в число утвержденных показателей качества чая показатель c_{Σ} не входит, а точные, простые и экспрессные методики определения c_{Σ} не разработаны. Вместо c_{Σ} на предприятиях пищевой промышленности определяют интегральный показатель (**ИП**) «содержание полифенолов по Фолину-Чокальтеу» (**ФЧ**), выражая его в пересчете на галловую кислоту [4]. Реактив ФЧ содержит сильные окислители – гетерополикомплексы вольфрама(VI) и молибдена(VI), которые реагируют не только с ФА, но и с другими восстановителями (некоторые углеводы, белки, аминокислоты, тиолы и др.) [5]. Нередко при оценке антиоксидантной активности (**АОА**) пищевых продуктов по методу ФЧ обобщенный сигнал ФА неаддитивен [6]. Кроме того, в методике [4] используется токсичный метанол. Методики измерения других ИП, характеризующих АОА чая, также имеют существенные недостатки и ограничения [7].

Простым, прецизионным и экспрессным способом оценки АОА пищевых продуктов является метод **FRAP** (Ferric Reducing Antioxidant Power), основанный на взаимодействии смеси ФА с введенными в избытке ионами железа(III) [8, 9]. Образующиеся при этом ионы Fe^{2+} связываются вспомогательным реагентом R (трипиридилтриазин, *o*-фенантролин и т.п.) в интенсивно окрашенные комплексы. При комнатной температуре обобщенный аналитический сигнал ФА (A_{Σ} , оптическая плотность раствора в видимой области спектра) растет медленно. Величину A_{Σ} измеряют через τ минут после смешивания реагентов, не дожидаясь установления равновесия. Обобщенный сигнал ФА аддитивен [9]. Результат анализа (c^*) находят по градуировочному графику, построенному по растворам стандартного вещества X_{st} (галловая кислота, кверцетин и др.) и выражают в единицах содержания X_{st} . Найденный таким образом показатель АОА называют также антиоксидантной емкостью (**АОЕ**, **ТАС**), железовосстанавливающей способностью (**ЖВС**) или полифенольным индексом. Некоторые исследователи применяли метод FRAP для изучения антиоксидантных свойств чая [10–12]. Полученные значения АОА не совпадали с результатами анализа тех же образцов по методу ФЧ, но для серии однотипных образцов эти величины обычно закоррелированы [10].

Проблема в том, что показатели АОА, выраженные в пересчете на X_{st} , могут сильно (в несколько раз) отличаться от действительной величины суммарного содержания антиоксидантов [13]. При одном и том же c_{Σ} любой показатель АОА зависит от природы и соотношения индивидуальных антиоксидантов в их природной смеси, поскольку все они определяются

с разной чувствительностью (внутригрупповая селективность сигналов) [14]. Кроме того, АОА зависит от выбора $X_{ст}$ и R, а также от времени экспозиции и условий измерения обобщенного сигнала (A_{Σ}). Таким образом, показатели АОА являются приблизительными и субъективными оценками искомого суммарного содержания ФА. Метрологическая неопределенность показателей АОА не мешает сравнивать с их помощью однотипные объекты, проанализированные по одной методике. Однако сравнивать результаты определения АОА некоторого образца чая с какими-либо нормативами суммарного содержания ФА нельзя. Приравнивание c^* и c_{Σ} может приводить к большим систематическим погрешностям, а выражение c_{Σ} в единицах концентрации $X_{ст}$ метрологически некорректно [15, 16]. Выходом может быть интервальная оценка суммарного содержания ФА по величине АОА. Алгоритм корректной оценки c_{Σ} должен учитывать основной источник систематических погрешностей и приводить к результатам, не зависящим от выбора $X_{ст}$ [17]. Разработка соответствующих методик требует проведения специальных исследований. Чай – удобный объект таких исследований, поскольку содержит довольно много однотипных ФА, легко экстрагируемых горячей водой. Многие посторонние вещества при этом не экстрагируются или не влияют на чувствительность определения индивидуальных ФА в чайном настое [2, 12].

Цели настоящего исследования: 1) проверка возможности определения суммарного содержания ФА в чае методом FRAP; 2) оценка неопределенности результатов анализа. Достичь этих целей трудно, поскольку стандартные образцы чая с аттестованным суммарным содержанием ФА не выпускаются. Нет и стандартных методик хроматографического определения суммы ФА; методом ВЭЖХ в чае определяют лишь некоторые ФА [18]. Поэтому мы сопоставляли результаты анализа одних и тех же образцов чая, используя разные варианты метода FRAP. В КубГУ в качестве R применяли о-фенантролин, а в качестве $X_{ст}$ – галловую кислоту (**методика 1**). В ОмГУ использовали 2,2'-дипиридил и аскорбиновую кислоту (**методика 2**). Различались и условия анализа. Интервальные оценки c_{Σ} рассчитывали по алгоритму [17] с учетом внутригрупповой селективности сигналов. Совпадение интервальных оценок суммарного содержания ФА, полученных с применением разных $X_{ст}$, позволило бы считать их корректными оценками суммарного содержания ФА, а о неопределенности этих оценок можно было бы судить по ширине вычисленных интервалов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы черного чая разных торговых марок приобретали в магазинах г. Краснодара. Взвешивали 0.500 г исследуемого образца и помещали в термостойкий стакан. Добавляли 40 см³ кипящей дистиллированной воды, закрывали часовым стеклом,

помещали на водяную баню и настаивали в течение 45 минут. Полученный чайный настой (экстракт) фильтровали через бумажный фильтр «белая лента» в мерную колбу на 50.0 см³ и доводили до метки дистиллированной водой. Считают, что однократная экстракция обеспечивает практически полное извлечение ФА в водную фазу [2, 10]. Полученные чайные настои анализировали в день приготовления, перед анализом настоев разбавляли в 10 или 100 раз. Растворы реагентов готовили из реактивов «х.ч.». Использовали следующие методики измерений.

Методика 1 (КубГУ). Для построения градуировочной зависимости в мерные колбы на 100 см³ вносили 20-25 см³ дистиллированной воды и 2.0 см³ раствора комплексного реагента, содержащего железоммонийные квасцы (6.0 мМ) и о-фенантролин (10 мМ). Добавляли V см³ (V = 0; 0.1; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8; 1.0; 1.5; 2.0) раствора галловой кислоты (ГК) с концентрацией 1.00 мМ, доводили объем раствора до метки дистиллированной водой и перемешивали. Через 60 минут измеряли оптическую плотность полученного раствора (A_{60}) на спектрофотометре LEKI SS 2107 при 490 нм в стеклянной кювете (l = 20 мм). Раствор сравнения – дистиллированная вода. Приготовление окрашенных растворов и измерение A_{60} повторяли трижды. По усредненным значениям A_{60} методом МНК рассчитывали градуировочные зависимости. В области концентраций ГК от 1 до 10 мкМ график линейен ($r_{\text{экс}} > 0.99$). Градуировочная зависимость $A_{60} = 0.0281 + 0.0879 c_{ГК}$ (мкМ) адекватно описывает экспериментальные данные (рисунок, кривая 1). Анализируя чайные настои, проводили те же операции, но вместо раствора ГК в мерную колбу помещали 4.00 см³ разбавленного (1:100) настоя.

Методика 2 (ОмГУ). Для построения градуировочной зависимости в мерные колбы на 100 см³ помещали по 2.0 см³ спиртового раствора

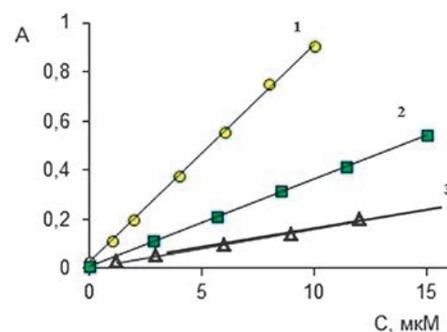


Рисунок. Градуировочные графики для определения суммы ФА в чайных настоях в пересчете на $X_{ст}$ (мкмоль/дм³) по методу FRAP (методики 1 и 2) и по методу ФЧ (3).

Figure. Dependences of the PhA signals on the concentration of X_{st} ($\mu\text{moles}/\text{dm}^3$) in the final solutions for the determination of total PhA content in tea infusions using the FRAP assay (methods 1 and 2) and with Folin-Ciocalteu method (3).

2.2'-дипиридила (12 мМ) и 1.3 см³ водного раствора железоммонийных квасцов (6.2 мМ). Добавляли 60 см³ дистиллированной воды, затем V см³ ($V = 0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 5.0$) раствора аскорбиновой кислоты (АК) с концентрацией 0.570 мМ. Доводили объем раствора до метки дистиллированной водой и перемешивали. Через 10 минут измеряли оптическую плотность полученного раствора (A_{10}) на спектрофотометре UNICO 1201 при 520 нм в стеклянной кювете ($l = 20$ мм). Раствор сравнения – дистиллированная вода. Приготовление растворов и измерения повторяли трижды. В области от 1 до 20 мкМ градуировочная зависимость линейна ($r > 0,99$), отвечает уравнению $A_{10} = 0.0116 + 0.0353c_{\text{АК}}$ (мкМ) и адекватно описывает экспериментальные данные (рисунок, кривая 2). Анализируя чайные настои, проводили те же операции, но вместо раствора АК в мерную колбу помещали 1.00 см³ разбавленного (1:10) чайного настоя.

Значения АОА разбавленных чайных настоев в пересчете на ГК или АК находили по соответствующим градуировочным зависимостям. Каждый образец чая анализировали трижды. Коэффициенты вариации при повторении анализа не превышали 5 % (методика 1) и 3 % (методика 2). Доверительные интервалы рассчитывали по Стьюденту ($n = 3, P = 0.95$). Затем рассчитывали суммарное содержание ФА в сухом чае в пересчете на $X_{\text{ст}}$ (c^*), учитывая объемы аликвот, степень разбавления настоя и массу исходной навески. Значения c^* выражали в ммоль (мМ) или ммоль-экв $X_{\text{ст}}$ в 1 грамме чая. При пересчете концентраций считали, что ГК – трехэлектронный, а АК – двухэлектронный восстановитель [9]. Относительное расхождение ($\Delta, \%$) между значениями c^* , найденными для единичного образца с помощью методик 1 и 2, характеризовали отношением разности значений c^* к их среднему арифметическому:

$$\Delta, \% = 200 (c^*_2 - c^*_1) / (c^*_2 + c^*_1).$$

Значимость расхождений между средними значениями c^*_1 и c^*_2 проверяли, используя традиционные статистические алгоритмы Стьюдента и Фишера.

Интервальные оценки суммарного содержания ФА рассчитывали по формулам (1) или (2), выведенным в работе [17] и учитывающим внутригрупповую селективность аналитических сигналов [13, 14]

$$\frac{c^* K_{\text{ст}}}{K_m} \leq c_{\Sigma} \leq \frac{c^* K_{\text{ст}}}{K_1} \quad (1)$$

$$c^*(1+T) / 2T \leq c_{\Sigma} \leq c^*(1+T) / 2, \quad (2)$$

где $K_{\text{ст}}$ – коэффициент чувствительности определения $X_{\text{ст}}$ по соответствующей методике; K_1 и K_m – коэффициенты чувствительности для индивидуальных ФА, определяемых с наименьшей и наибольшей чувствительностью. Безразмерный параметр $T = K_m / K_1$ характеризует внутригрупповую селективность аналитических сигналов. С использованием выборки разных ФА, было установлено, что для методики 1

$T = 2.64$, для методики 2 $T = 2.07$ [14]. Как показано в работе [17], формулы (1) и (2) применимы, если случайные погрешности измерений и влияние других источников систематических погрешностей пренебрежимо малы по сравнению с влиянием внутригрупповой селективности аналитических сигналов. При этом неравенство (1) применимо при любых $X_{\text{ст}}$, а неравенство (2) – только при оптимальном выборе $X_{\text{ст}}$, то есть при выполнении условия (3)

$$K_{\text{ст}} \approx 0.5 (K_1 + K_m). \quad (3)$$

При использовании методики 1 выбранный стандарт (ГК) не отвечает условию (3), и для расчета интервальных оценок (мМ-экв/г) применяли неравенство (1). Численные значения K_1 и K_m определяли с применением выборки модельных ФА. По методике 1 с наименьшей чувствительностью определяется нормальная концентрация феруловой кислоты, с наибольшей чувствительностью – концентрация рутина. Подстановка числовых значений K_1 и K_m в неравенство (1) приводит к удобной расчетной формуле (4), которую применяли для обработки данных, полученных в КубГУ:

$$0.82c^* \leq c_{\Sigma} \leq 2.15c^*. \quad (4)$$

Выбор стандартного вещества (АК) в методике 2 отвечает условию (3), что позволяет применять неравенство (2). Подстановка в него ранее найденного значения T приводит к расчетной формуле (5), которую и применяли для обработки данных, полученных в ОмГУ,

$$0.74 c^* \leq c_{\Sigma} \leq 1.54 c^*. \quad (5)$$

Относительную неопределенность результатов анализа находили, рассчитывая отношение полуширины (Δc) интервала возможных значений c_{Σ} к значению c_{Σ} в середине этого интервала ($c_{\Sigma \text{ср}}$). Найденные интервалы возможных значений c_{Σ} выражали в виде $(c_{\Sigma \text{ср}} \pm \Delta c)$, аналогично традиционной записи доверительных интервалов, найденных по формулам Лапласа или Стьюдента, но, в отличие от доверительных интервалов, значения $c_{\Sigma \text{ср}}$ и усредненные значения c^* не совпадают.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценки суммарного содержания ФА в пересчете на $X_{\text{ст}}$. В табл. 1 сопоставлены результаты анализа пяти образцов высококачественного черного чая. Здесь и далее образцы обозначены следующим образом: 1 – чай «Гордость Цейлона»; 2 – Краснодарский чай (ООО «Краснодарский чай»); 3 – Индийский чай (Ассам); 4 – Краснодарский чай («Дагомысчай»); 5 – чай «Черная магия» (КНР). Значения c^* (мМ/г или мМ-экв/г) выражены в пересчете на ГК или АК, то есть их следует рассматривать как значения интегрального показателя АОА. Доверительные

Таблица 1

Результаты измерения АОА образцов черного чая по разным методикам

Table 1

AOA values of black tea samples measured with different methods

Образец	Методика ФЧ, c^* , мм/г	Методика 1 c_1^* , мм/г	Методика 2 c_2^* , мм/г	Δ , %	Методика 1 c_1^* , мм-экв/г	Методика 2 c_2^* , мм-экв/г	Δ , %
1	0.77 ± 0.06	0.40 ± 0.04	0.50 ± 0.01	22	1.20 ± 0.12	1.00 ± 0.02	- 18
2**	0.67 ± 0.05	0.36 ± 0.02	0.47 ± 0.02	26	1.09 ± 0.04	0.94 ± 0.03	- 15
3**	0.61 ± 0.05	0.33 ± 0.03	0.43 ± 0.02	26	0.99 ± 0.09	0.85 ± 0.03	- 15
4	0.59 ± 0.06	0.28 ± 0.02	0.40 ± 0.02	35	0.85 ± 0.06	0.79 ± 0.04	- 7
5	0.50 ± 0.04	0.25 ± 0.04	0.36 ± 0.02	36	0.74 ± 0.11	0.71 ± 0.04	- 4

Примечание: ** – образцы, для которых различия c_1^* и c_2^* (мм-экв/г) достоверны ($\alpha < 0,05$).

интервалы вычислены по Стьюденту ($P = 0.95$, $n = 3$). Поскольку низкосортные чаи с заведомо низким содержанием ФА не анализировали, полученные по одной методике значения АОА однотипных образцов различались не более, чем на 70 %. Полученные значения c^* по порядку величины соответствуют результатам других авторов, ранее исследовавших разные виды черного чая [7, 10, 19]. Для сравнения в той же таблице приведены значения c^* , найденные в пересчете на ГК по Фолину-Чокальтеу (методика [4]). При одном и том же $X_{ст}$ эти значения примерно вдвое выше значений c^* , полученных по методу FRAP. Эти расхождения можно объяснить взаимодействием реактива ФЧ с компонентами чайного настоя, не входящими в число фенольных антиоксидантов и не определяемыми методом FRAP.

Напротив, значения АОА, полученные по сопоставляемым вариантам метода FRAP, довольно близки между собой. Относительные различия между c_1^* и c_2^* не превышают 20 %. Такие расхождения статистически значимы лишь для некоторых образцов чая. Как видно из табл. 1, относительные различия c_1^* и c_2^* (Δ , %) уменьшаются при выражении сопоставляемых величин в мм-экв/г. Оценивать антиоксидантную активность пищевых продуктов в моль-экв/г или в моль-экв/л ранее предлагали и другие авторы [20, 21]. Этот прием уменьшает влияние различий между одноэлектронными и многоэлектронными антиоксидантами-восстановителями [9]. Полезной аналогией может быть оценка суммарного содержания сильных кислот разной основности: суммирование их молярных концентраций приводит к ошибочной оценке кислотности многокомпонентного раствора, в отличие от суммирования нормальных концентраций. В дальнейшем значения АОА выражали в мм-экв $X_{ст}$ в 1 г сухого чая или в 1 литре неразбавленного чайного настоя. Для серии исследованных образцов значения c_1^* и c_2^* закоррелированы. Коэффициент корреляции равен 0.991, что выше критического значения, равного 0.878 ($n = 5$, $\alpha = 0.05$).

Найденные по методике 2 значения АОА (в мм-экв/г) были чуть ниже, чем значения АОА, найденные по методике 1. Возможно, применение более слабого окислителя ($Fe^{3+} + 2,2'$ -дипиридил) предотвращает окисление некоторых слабых восстановителей,

присутствующих в чае, тогда как более сильный окислитель ($Fe^{3+} + o$ -фенантролин) с ними реагирует. Значения формальных редокс-потенциалов этих окислителей в условиях измерения АОА по методу FRAP соответственно составляют 0.97 В и 1.19 В [22]. Имеет значение и разная продолжительность экспозиции. Дополнительные опыты показали, что если в методике 1 использовать такие же 10-минутные экспозиции, как в методике 2, значения c_1^* и c_2^* сближаются. Вероятно, при коротких экспозициях не успевают проявиться структурно-специфические процессы глубокого окисления первоначально образующихся хинонов. Протекание этих процессов при определении суммы ФА по методике 1 должно увеличивать чувствительность определения суммы ФА, но усиливать различия между индивидуальными ФА.

Влияние посторонних веществ. В условиях определения ФА по методикам 1 или 2 лишь немногие посторонние вещества (Z) могли бы помешать получению правильных результатов анализа за счет наложения сигналов Z на обобщенный сигнал ФА. К числу таких Z относятся некоторые амины, белки, сульфиты и соединения железа(II) [9]. Однако указанные Z либо отсутствуют в чайных настоях либо их содержание слишком мало. Так, сигнал цитрата натрия, аналогичный сигналам ФА, возникает лишь на концентрационном уровне $n \cdot 10^{-4}$ М, а сигнал альбумина – на уровне 0.05 %. Появление окраски в таких случаях можно объяснить не только восстановительными свойствами Z , но и присутствием микропримесей восстановителей в Z -содержащих реактивах. Существенных различий в селективности методик 1 и 2 мы не выявили, хотя по некоторым литературным данным методика 2 должна быть более селективной [20]. В обоих случаях предварительное разбавление чайного настоя ослабляет влияние Z .

Из числа Z особого внимания заслуживают комплексанты, нередко сопутствующие ФА. Примером могут быть тартраты и салицилаты, присутствующие в винах и многих других пищевых продуктах. Комплексанты связывают железо(III) в прочные инертные комплексы, что снижает аналитические сигналы фенольных антиоксидантов и ведет к получению заниженных результатов группового

Таблица 2

Результаты анализа образцов чая по методике 2, полученные с применением градуировочного графика (ГГ) и способа добавок (СД)

Table 2

Analysis of tea samples with FRAP assay (method 2). The results were obtained with the calibration chart (ГГ) and with the method of additives (СД)

Обра- зец	С*, мМ-экв/г		Δ _{гд} , %
	ГГ	СД	
1	0.99 ± 0.02	0.96 ± 0.01	- 3.9
2	0.94 ± 0.03	0.91 ± 0.02	- 3.6
3	0.85 ± 0.03	0.83 ± 0.02	- 2.9
4	0.79 ± 0.04	0.77 ± 0.02	- 2.7
5	0.71 ± 0.04	0.69 ± 0.01	- 3.5

анализа [23]. Возникающие в присутствии комплексантов систематические погрешности могут быть заметно снижены или даже полностью исключены, если определять суммарное содержание ФА не по градуировочному графику, а по способу добавок. Этот вариант анализа ранее был рекомендован для определения показателя АОА вин и соков [23]. Анализ чайных настоев мы проводили как с помощью предварительно полученной в отсутствие комплексантов градуировочной зависимости, так и по способу добавок (табл. 2). В качестве добавок использовали растворы ГК или АК. Относительные расхождения (Δ_{гд}) между результатами анализа, полученными с помощью градуировочного графика (с*_г) и по способу добавок (с*_д) рассчитывали по формуле

$$\Delta_{гд} \% = 100 (c_{д}^* - c_{г}^*) / c_{г}^*$$

Достоверные различия между результатами анализа образцов чая с применением ГГ или СД выявлены не были, в отличие от вин и соков, анализ которых по градуировочному графику нередко приводит к достоверно заниженным результатам. Аналогичные результаты были получены и с использованием методики 1. Вероятно, в разбавленных чайных настоях содержание комплексантов настолько мало,

что они не влияют на реальный редокс-потенциал реагента-окислителя, а, следовательно, и на величину показателя АОА. Так как определять суммарное содержание ФА по градуировочному графику проще и быстрее, для анализа чая мы рекомендуем именно этот способ. Однако для анализа сложных чайных композиций, содержащих ароматизирующие добавки (в том числе и комплексанты), лучше применять способ добавок, для профилактики систематических погрешностей.

Таким образом, и методика [4], и описанные выше варианты метода FRAP позволяют определять АОА черного чая с приблизительно одинаковой прецизионностью и в том же диапазоне концентраций ФА (см. рисунок). Метод FRAP является более чувствительным, чем метод Фолина-Чокальтеу в варианте [4], а при использовании 10-минутных экспозиций – и более экспрессным. Важным преимуществом метода FRAP является существенно меньшее влияние посторонних веществ, не входящих в число фенольных антиоксидантов. Методика определения АОА пищевых продуктов (в т. ч. чая) с применением о-фенантролина включена в Федеральный реестр методик выполнения измерений [24]. Правильность результатов анализа чайных настоев по предлагаемым методикам была подтверждена с использованием способа «введено-найденно» (табл. 3).

Интервальные оценки суммарного содержания ФА. Важным преимуществом метода FRAP является возможность его применения для интервальной оценки суммарного содержания ФА в метрологически корректной форме, то есть без пересчета на X_{ст}. Заметим, что определить суммарное содержание ФА (полифенолов) по методу ФЧ нельзя даже в интервальном виде; мешают и неаддитивность аналитических сигналов, и сильное влияние посторонних веществ. В табл. 4 приведены интервальные оценки суммарного содержания ФА в пяти образцах черного чая, вычисленные для методик 1 и 2 по формулам (4) и (5). Исходными данными для таких расчетов могли быть не только значения показателя АОА, но и значения обобщенных аналитических сигналов [17].

Сопоставление таблиц 1 и 4 показывает, что ширина интервалов, вычисленных по формулам (4) и (5), примерно на порядок больше, чем ширина доверительных интервалов, вычисленных по

Таблица 3

Проверка правильности анализа чайных настоев по методу FRAP с применением способа «введено – найдено»

Table 3

Analysis of tea infusions with FRAP assay: test of accuracy with the “added-found” method

Вид чая	Методика	АОА в пересчете на ГК, мМ/дм ³				Погрешность, ΔС, %
		Найдено	Добавка, ГК	Найдено с добавкой	Найдено в добавке	
Принцесса Нури	1	3.5 ± 0.4	5.0	8.1 ± 0.7	4.6 ± 0.4	- 8
Lipton	2	3.4 ± 0.4	2.0	5.3 ± 0.2	1.9 ± 0.3	-5
Ahmad tea	2	3.9 ± 0.3	2.0	5.7 ± 0.4	1.8 ± 0.4	-10

Таблица 4

Полученные по методикам 1 и 2 интервальные оценки суммарного содержания фенольных антиоксидантов (мМ-экв/г) в образцах черного чая

Table 4

Interval estimates of PhA total content (mmol-eq/g) obtained with the FRAP assay (methods 1 and 2) for black tea samples

Образец	Методика 1 (КубГУ)	Методика 2 (ОМГУ)
1	1.8 ± 0.8	1.1 ± 0.4
2	1.6 ± 0.7	1.1 ± 0.4
3	1.5 ± 0.7	1.0 ± 0.3
4	1.3 ± 0.6	0.9 ± 0.3
5	1.1 ± 0.5	0.8 ± 0.3

Стьюденту. Полуширина интервала возможных значений c_{Σ} для методики 1 составляет 40-50 % от значения c_{Σ} в середине интервала, а для методики 2 – 30-40 %, тогда как полуширина доверительных интервалов для $P = 0.95$ не превышает 15 % (см. табл. 1). Этого и следовало ожидать: расчет по Стьюденту учитывает лишь случайные погрешности измерений, что приводит к недооценке реальной неопределенности результатов группового анализа. Расчеты по алгоритму [17] позволяют учесть влияние более значимых факторов – априорно неизвестного индивидуального состава проб и внутригрупповой селективности аналитических сигналов. Именно эти факторы приводят к основным погрешностям группового анализа [25].

Если учесть и другие составляющие общей неопределенности (например, потери ФА при пробоподготовке, случайные погрешности и др.), общая неопределенность оценки суммарного содержания ФА окажется еще большей. Излишняя ширина интервалов, характеризующих суммарное содержание ФА, является основным недостатком метода FRAP, как и других методов группового анализа, связанных с вычислением интегральных показателей.

Для уменьшения неопределенности интервальных оценок необходимо нивелировать чувствительность определения разных ФА, то есть снижать параметр T вплоть до единицы. Отметим, что методика 1 приводит к несколько более широким интервалам, чем методика 2 именно из-за большей внутригрупповой селективности ($T_1 > T_2$). Способы нивелирования коэффициентов чувствительности обсуждаются в монографии [25]. Реализация этих способов применительно к определению суммарного содержания ФА в чае методом FRAP требует отдельного исследования, результаты которого будут приведены в следующем сообщении.

Интервальные оценки, полученные для суммарного содержания фенольных антиоксидантов по сопоставляемым методикам, совпадают не полностью (как уже отмечалось, методика 2 приводит к несколько меньшим содержаниям ФА и более

узким интервалам), но соответствующие интервалы пересекаются и в значительной степени накладываются друг на друга. Значения c^* , полученные для любого образца по методике 1, попадают в интервалы возможных значений c_{Σ} , рассчитанные по методике 2, и наоборот. Близость интервальных оценок, полученных с применением разных $X_{ст}$, указывает, что эти оценки правильно характеризуют действительную величину суммарного содержания ФА. Если же анализировать некоторый образец по одной и той же методике, выражая результат анализа в пересчете на разные $X_{ст}$, интервальные оценки суммарных содержаний полностью совпадают. Примером может быть суммарное содержание ФА в черном чае марки «Высокогорный». Анализ этого чая по методике 2 показал, что искомое содержание ФА лежит в интервале от 0.58 до 1.2 мМ-экв/г, если в качестве стандарта использовать АК. Если же в качестве стандарта использовать ГК или кверцетин, этот интервал будет включать значения c_{Σ} от 0.59 до 1.2 мМ-экв/г.

Как видно из табл. 4, интервальные оценки значений c_{Σ} , полученные для разных образцов высококачественного чая по одной и той же методике, часто перекрываются. Это указывает, что с помощью метода FRAP нельзя надежно различить разные виды высококачественного черного чая, но можно отличить их от низкокачественной (или фальсифицированной) чайной продукции, в которой суммарное содержание ФА гораздо ниже [2]. Однако этот предварительный вывод требует дополнительной проверки.

Заключение

Приведенные в статье данные показывают, что метод FRAP с успехом можно использовать для экспрессной оценки антиоксидантной активности черного чая по методу FRAP, выражая результат в пересчете на разные стандартные вещества. Практическое совпадение интервальных оценок суммарного содержания фенольных антиоксидантов (c_{Σ}), полученных с использованием разных $X_{ст}$, позволяет считать этот метод пригодным и для объективной оценки суммарного содержания ФА в чае. Этому способствуют довольно низкая внутригрупповая селективность аналитических сигналов разных ФА и высокая межгрупповая селективность, то есть слабое влияние веществ, не входящих в группу ФА, на результат группового анализа. Возможна разработка нового способа контроля качества чайной продукции, включающего интервальную оценку суммарного содержания ФА и сопоставление полученных интервалов с нормативными значениями c_{Σ} . Преимуществом предлагаемого способа по сравнению с традиционно применяемым методом Фолина-Чокальтеу должна быть меньшая чувствительность к влиянию посторонних веществ (слабых восстановителей, не входящих в группу ФА), отсутствие погрешностей, связанных с неаддитивностью сигналов, и большая чувствительность к

ФА. Выражение результата анализа без пересчета на концентрацию $X_{ст}$ обеспечит метрологическую корректность предлагаемого способа аналитического контроля. Однако для его оптимизации надо добиться дальнейшего снижения различий в чувствительности определения индивидуальных ФА по методу FRAP.

Благодарности

Исследования проведены при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Омской области (гранты 17-03-01254 и 16-03-550479). Использовано научное оборудование ЦКП «Эколого-аналитический центр» КубГУ (уникальный идентификатор RFMEFI59317X0008).

Acknowledgements

This work was funded by RFBR and Omsk Region Administration according to the research projects № 17-03-01254 and 16-03-550479. The scientific equipment of the Ecological Analytical Center of Kuban State University was used for the research, the unique identifier is RFMEFI59317X0008.

ЛИТЕРАТУРА

- Engelhardt U.H. Chemistry of tea. *Comprehensive natural products II. Chemistry and Biology*: eds. L. Mander & H.W. Liu. UK, Elsevier Ltd. 2010. P. 1000-1027.
- Будников Г.К., Зиятдинова Г.К. Природные фенольные антиоксиданты в биоаналитической химии: состояние проблемы и перспективы развития // *Успехи химии*. 2015. Т. 84, № 2. С. 194-224.
- Джинджолия Р.Р., Кобахидзе Ш.К. Полифенольные соединения чайного листа и готового чая. Тбилиси: Мецниереба, 1987. 163 с.
- ГОСТ 14502-1-2010. Чай. Метод определения общего содержания полифенолов. 2011. М.: Стандартинформ. 11 с.
- Денисенко Т.А., Вишник А.Б., Цыганок Л.П. Особенности взаимодействия 18-молибдодифосфата и реактива Фолина-Чокальтеу с фенольными соединениями // *Аналитика и контроль*. 2015. Т. 19, № 3. С. 242-251.
- Bastola K., Guragain Y., Bhadriraju V., Vadlani P. Evaluation of Standards and Interfering Compounds in the Determination of Phenolics by Folin-Ciocalteu Assay Method for Effective Bioprocessing of Biomass / *American Journal of Analytical Chemistry*. 2017. V. 8, № 6. P. 416-431.
- Федосеева А.А., Лебедкова О.С., Каниболоцкая Л.В., Шендик А.Н. Антиоксидантная активность настоев чая // *Химия растительного сырья*. 2008. № 3. С. 123-127.
- 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.
- 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.
- The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide / M.H. Carlsen [et al.] // *Nutritional Journal*. 2010. V. 9, № 1. [Элек-

тронный ресурс]: <http://www.nutritionj.com/content/9/1/3> (дата обращения 02.09.2018).

- Оценка антиоксидантной активности пищевых продуктов с использованием индикаторной системы на основе фенантролиновых комплексов железа / Т.Г. Цюпко [и др.] // *Известия вузов. Пищевая технология*. 2011. № 5-6. С. 84-87.
- Vershinin V.I. Total indices as a tool to estimate sum content of similar analytes. Review // *Talanta*. 2015. V. 131, № 1. P. 293-300.
- Vershinin V.I., Brilenok N.S., Tsytko T.G. Methodology of the spectrophotometric analysis of organic mixtures: error of estimating total analyte concentrations taking into account their sensitivity coefficients // *J. Analyt. Chem*. 2012. V. 67, № 7. P. 649-654.
- Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях: Руководство ЕВРАХИМ/СИТАК. Изд. 2-ое / ВНИИМ им. Д.И. Менделеева, СПб., 2002. 149 с.
- Vaena J.R., Valcarcel M. Total indices in analytical sciences // *Trends in Analytical Chemistry*. 2003. V. 22, № 10. P. 641-646.
- 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.
- Мареева Д.О., Цюпко Т.Г., Милевская В.В., Темердашев А.З. Определение галловой кислоты, катехина, эпикатехина и кофеина в экстрактах черного чая // *Аналитика и контроль*. 2015. Т. 19, № 4. С. 323-330.
- Параметры антиоксидантной активности соединений: относительная антиоксидантная активность чая / И.П. Анисимович [и др.] // *Научные ведомости. Серия Естественные науки*. 2010. Т. 80, № 9. С. 104-110.
- Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay / R. Apak [et. al.] / *Molecules*. 2007. V. 19, № 7. P. 1496-1547.
- Потенциометрический метод определения антиоксидантной активности: оценка основных метрологических характеристик / Е.Н. Шарафутдинова [и др.] // *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*. 2008. Т. 74, № 6. С. 9-14.
- Определение антиоксидантной активности пищевых продуктов с использованием индикаторной системы Fe(III) / Fe(II) – органический реагент / Темердашев З.А. [и др.] // *Зав. лаборатория. Диагностика материалов*. 2006. Т. 72, № 11, С. 15-19.
- 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.
- МУ 08-47/275 «Спектрофотометрический метод измерений антиоксидантной активности пищевых продуктов». Федеральный реестр методик измерений. № ФР.1.31.2011.0197.
- Вершинин В.И. Определение суммарного содержания однотипных веществ (теория интегральных показателей): Монография / Изд-во ОмГУ им. Ф.М. Достоевского, Омск, 2016. 288 с.

REFERENCES

- Engelhardt U.H. Chemistry of tea. *Comprehensive natural products II*, 2010, vol. 3, pp. 999-1032. doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.02784-0.

2. Budnikov G.K., Zijatdinova G.K. Natural phenolic antioxidants in bioanalytical chemistry: state of the art and prospects of development. *Russ. Chem. Rev.* 2015, vol. 84, no. 2, pp. 194–224. doi.org: 10.1070/RCR4436
3. Dzhindzholiia R.R., Kobakhidze Sh.K. *Polifenol'nye soedineniia chainogo lista i gotovogo chaia. [Polyphenolic compounds of tea leaf and finished tea]*. Tbilisi, Metsniereba Publ, 1987. 163 p. (in Russian).
4. ISO 14502-1:2005. Determination of substances characteristic of green and black tea. Part 1: Content of total polyphenols in tea. Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent. 2005. 10 p.
5. Denisenko T.A., Vishnikin A.B., Tsyganok L.P. [Reaction features of 18-molibdodiphosphate and Folin-Ciocalteu reagent with phenolic compounds]. *Analitika i kontrol' [Analyticals and control]*, 2015, vol. 19, no. 3, pp. 242-251. doi: 10.15826/analitika.2015.19.3.001 (in Russian).
6. Bastola K., Guragain Y., Bhadriraju V., Vadlani P. Evaluation of Standards and Interfering Compounds in the Determination of Phenolics by Folin-Ciocalteu Assay. Method for Effective Bioprocessing of Biomass. *American Journal of Analyt. Chem.* 2017, vol. 8, no. 6, pp. 416-431. doi: 10.4236/ajac.2017.86032
7. Fedoseeva A.A., Lebedkova O.S., Kanibolotskaia L.V., Shendrik A.N. [Antioxidant activity of tea infusions]. *Khimiia Rastitel'nogo Syr'ia [Chemistry of plant materials]*, 2008, no. 3, pp. 123-127 (in Russian).
8. 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. doi: 10.1006/abio.1996.0292.
9. Tsytko T.G., Petrakova I.V., Brilenok N.V., Chuprinina D.A., Temerdashev Z.A., Vershinin V.I. [Determination of total content of antioxidants by FRAP assay]. *Analitika i kontrol' [Analyticals and Control]*, 2011, vol. 15, no. 3, pp. 287-298 (in Russian).
10. 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, vol. 47, no. 2, pp. 633-636.
11. Carlsen M.H., Halvorsen B.L., Holte K., Bøhn 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. Jr, Blomhoff R. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutritional Journal*, 2010, vol. 9, no. 1. pp. 3-14. doi:10.1186/1475-2891-9-3. Available at: <http://www.nutritionj.com/content/9/1/3> (Accessed 2 September 2018).
12. Tsytko 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]. *Izvestiia vuzov. Pishchevaia tekhnologiia [News of universities. Food technology]*, 2011, no. 5-6, pp. 84-87 (in Russian).
13. Vershinin V.I. Total indices as a tool to estimate sum content of similar analytes. Review. *Talanta*, 2015, vol. 131, no. 1, pp. 293-300. doi: 10.1016/j.talanta.2014.07.102.
14. Vershinin V.I., Brilenok N.S., Tsytko T.G. Methodology of the spectrophotometric analysis of organic mixtures: error of estimating total analyte concentrations taking into account their sensitivity coefficients. *J. Analyt. Chem.*, 2012, vol. 67, no. 7, pp. 649-654.
15. *EURACHEM/CITAC Guide. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. Third Edition. Editors S. Ellison, A. Williams, B. Magnusson. 2012. QUAM. -141 p.
16. Baena J.R., Valcarcel M. Total indices in analytical sciences. *Trends in Analytical Chemistry*, 2003, vol. 22, no. 10, pp. 641-646. doi: 10.1016/S0165-9936(03)01101-4.
17. Vershinin V.I., Isachenko N.A., Brilenok N.S. Methodology of analysis of unseparated mixtures: Interval estimates of the total concentration of similar analytes. *J. Analyt. Chem.*, 2016, vol. 71, no. 4, pp. 351-358. doi: 10.1134/S1061934816040080
18. 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' [Analyticals and control]*, 2015, vol. 19, no. 4, pp. 323-330. doi: 10.15826/analitika.2015.19.4.011 (in Russian).
19. Anisimovich I.P., Deineka V.I., Deineka L.A., Frolov P.A., Miasnikova P.A. [Parameters of antioxidant activity of compounds: relative antioxidant activity of tea]. *Nauchnye vedomosti. Seriya Estestvennye nauki [Scientific statements. Series Natural Sciences]*, 2010, vol. 80, no. 9, pp. 104-110 (in Russian)
20. Apak R., Guclu K., Demirata B., Ozyurek M., Celik S.E., Bektasoglu B., Berker K.I., Ozyurt D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 2007, vol. 19, no. 7, pp.1496 -1547.
21. Sharafutdinova E.N., Inzhevatova O.V., Tobolkina N.V., Ivanova A.V., Brainina, X.Z. [Potentiometric method of antioxidant activity measuring: the estimate of main metrological characteristics]. *Zavodskaiia laboratoriia. Diagnostika materialov [Industrial laboratory. Diagnostics of materials]*, 2008, vol.74, no 6. pp. 9-14 (in Russian).
22. Temerdashev Z. A., Khrapko N. V., Tsiupko T. G., Voronova O. B., Balaba A. N. [Determination of antioxidant activity of food using systems Fe(III) / Fe(II) - organic reagent]. *Zavodskaiia laboratoriia. Diagnostika materialov [Industrial laboratory. Diagnostics of materials]*, 2006, vol. 72, no. 11. pp. 15-19 (in Russian).
23. 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' [Analyticals and control]*, 2016, vol. 20, no. 3, pp. 209-217. doi: 10.15826/analitika.2016.20.3.004 (in Russian).
24. MY 08-47/275 [Spectrophotometric method to determine the foodstuff antioxidant activity]. Federalnyi reestr metodik izmerenii [Russian Federal register of measurement methods] № ФП.1.31.2011.0197 (in Russian).
25. Vershinin V.I. [Determination of the total content of the similar substances (theory of total indices)]. Monograph. Omsk :OmGU [Omsk State University]. Publ., 2016. 288 p. (in Russian).