

Определение суммарного содержания фенольных антиоксидантов в модельных смесях по методу Фолина-Чокальтеу и по методу FRAP

**В.И. Вершинин, Е.В. Белова*

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

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

Поступила в редакцию 25 июня 2019 г., после доработки – 02 августа 2019 г.

Суммарное содержание фенольных антиоксидантов (**ФА**) в пищевых продуктах обычно определяют без разделения смесей ФА, используя реактив Фолина-Чокальтеу (**ФЧ**) в качестве группового реагента. Как правило, результаты анализа, полученные методом ФЧ и выраженные в пересчете на стандартное вещество ($X_{ст}$), намного выше результатов анализа тех же продуктов другими спектрофотометрическими методами, в частности методом **FRAP** (*ferric reducing antioxidant power*). Чтобы выяснить причины наблюдаемых расхождений, провели сопоставительный анализ водных растворов с известным содержанием ФА (10^{-5} – 10^{-4} моль/л). Методом ФЧ правильные результаты удается получить только в ходе анализа однокомпонентных растворов. Суммарное содержание ФА в модельных смесях методом ФЧ определяется с большими систематическими погрешностями (δc). При использовании галловой кислоты в качестве $X_{ст}$ значения δc доходят до 50 % отн., результаты анализа обычно завышены. Применение других $X_{ст}$ ведет к еще большим (по модулю) погрешностям. Установлено, что главным источником этих погрешностей является внутригрупповая селективность сигналов, вероятно обусловленная разной стехиометрией окисления индивидуальных ФА. Дополнительным источником погрешностей является неаддитивность светопоглощения продуктов восстановления реактива ФЧ смесями ФА; этот эффект выявлен впервые. Для некоторых смесей отклонения от аддитивности (**ОА**) доходят до 20 %. Таким образом, независимо от природы выбранного стандарта метод ФЧ не позволяет правильно оценить суммарное содержание ФА в неразделенных смесях. Переход к методу FRAP (система $Fe^{3+} + 2,2'$ -дипиридил) обеспечил снижение внутригрупповой селективности и аддитивности сигналов. Анализ модельных смесей ФА по методу FRAP дает более правильные результаты ($\delta c < 25\%$). Кроме того, метод FRAP более чувствителен и более специфичен для данной группы аналитов. Поэтому замена метода ФЧ методом FRAP должна повысить надежность контроля качества чая, вин и других пищевых продуктов по показателю «суммарное содержание полифенолов».

Ключевые слова: фенольные антиоксиданты, суммарное содержание полифенолов, модельные смеси, спектрофотометрия, метод Фолина-Чокальтеу, метод FRAP, систематические погрешности.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2019, vol. 23, no. 3, pp. 314-322

DOI: 10.15826/analitika.2019.23.3.008

Determination of the total phenol antioxidants content in the model mixtures using the Folin-Ciocalteu assay and the FRAP assay

**V.I. Vershinin, E.V. Belova*

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

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

Submitted 25 June 2019, received in revised form 02 August 2019

The total content of phenolic antioxidants (**PhA**) in tea, wine and other foodstuffs is usually determined without their separation. Active oxidizing agents, mainly Folin-Ciocalteu reagent (**FC**), are used as group reagents.

The results obtained with the FC assay and recalculated to the standard substance vary significantly from the results obtained with the other spectrophotometric assays such as the FRAP assay. In order to elucidate the real reason of the above-mentioned discrepancies, the authors have analyzed the water solutions with the known PhA total content (10^{-5} – 10^{-4} mol/dm³). The correct results were obtained only for one-component solutions. For the model mixtures containing 2 or 3 components, the results of c_{Σ} measurement with the standard FC procedure were distorted with significant systematic errors. When the universally used standard (gallic acid) has been applied, the error values (δc) were positive to the point of 50 % rel.; for the other standards the corresponding errors were much greater (by modulo). The main source of systematic errors during the PhA total content estimation was an intragroup selectivity of the signals. This effect could be related to the reaction stoichiometry features when FC reacts with the individual polyphenols. The subsidiary source of the systematic errors was the non-additivity of the light absorbance by the reaction products (reduced forms of the FC-reagent). For some mixtures, the deviations from the additivity were near 20% rel., this effect was detected for the first time. The substitution of the FC reagent with a less active oxidizing agent (FRAP reagent: $\text{Fe}^{3+} + 2,2'$ -dipyridil) during c_{Σ} determination depressed the intragroup selectivity of the signals and totally prevented the non-additivity of the light absorbance. These effects assured more correct estimates of the total PhA content ($\delta c < 25$ %). In addition, the FPAP assay is more sensitive and more specific method to determine the total polyphenols than the widely used FC assay. Therefore, authors recommend replacing the FC assay with the FRAP assay in the food industry to improve the quality control performance of tea, wines and other foodstuffs.

Keywords: phenolic antioxidants, total content of polyphenols, spectrophotometry, model mixtures, Folin-Ciocalteu assay, FRAP assay, systematic errors.

ВВЕДЕНИЕ

Качество вин, соков, чая и других пищевых продуктов зависит от содержания в них фенольных антиоксидантов (ФА). Природные смеси ФА в основном содержат полифенолы (кверцетин, катехины и др.), их производные (галлаты, танины и др.) и некоторые соединения, аналогичные полифенолам по антиоксидантной активности (аскорбиновая кислота, тиолы). Все эти вещества — гидрофильные антиоксиданты ЕТ-типа, активные восстановители [1, 2]. Суммарное содержание ФА (c_{Σ}) в пищевых продуктах контролируют, применяя в качестве реагента сильный окислитель — реактив Фолина-Чокальтеу (ФЧ), т.е. раствор смеси молибдодольфрамных гетерополикомплексов (ГПК) структуры Доусона. Примером может быть стандартная методика анализа чая [3]. Обобщенным аналитическим сигналом (A_{Σ}) является изменение оптической плотности раствора за время экспозиции. Результат анализа (c^*) находят в пересчете на стандартное вещество ($X_{\text{ст}}$), выражая c^* в моль/л или в моль-экв/л. Считают, что при правильном выборе $X_{\text{ст}}$ $c^* \approx c_{\Sigma}$. Несмотря на широкое применение реактива ФЧ, его взаимодействие с ФА изучено недостаточно [4–7]. Почти нет данных по стехиометрии, кинетике и механизму одновременно идущих редокс-реакций с участием разных ФА; не проверена аддитивность аналитических сигналов; не установлены метрологические характеристики методик группового анализа.

При проведении научных исследований суммарное содержание ФА в пищевых продуктах обычно находят другими методами, основанными на применении слабых окислителей. Примерами могут быть спектрометрические методы FRAP [8–10] и CUPRAC [2, 11]. Чтобы повысить формальный редокс-потенциал Fe(III) или Cu(II) до уровня, необходимого для окисления ФА (порядка 0.9 В), используют вспомогательные фотометрические

реагенты: трипиридилтриазин, фенантролин, 2,2'-дипиридил, неocupроин и др., которые связывают восстановленную форму группового реагента в прочный окрашенный комплекс. Методики оценки c_{Σ} , основанные на взаимодействии ФА со слабыми окислителями, хорошо изучены, но в заводских лабораториях их еще не применяют. При прочих равных условиях эти методики приводят к достоверно более низким значениям c^* . Так, анализ образцов черного чая по методу FRAP дает примерно вдвое меньшие значения c^* , чем при использовании реактива ФЧ [12]. Результаты анализа других пищевых продуктов с применением слабых окислителей также достоверно ниже, чем результаты, полученные методом ФЧ [13, 14]. Расхождения можно объяснить неспецифичностью реактива ФЧ, который способен одновременно с ФА окислять слабые восстановители, не обладающие антиоксидантной активностью *in vivo* (аминокислоты, белки, углеводы и др.) [4, 5]. Слабые окислители с этими веществами не реагируют [8–11]. Однако выявленные расхождения можно объяснить и другими факторами, действующими даже в отсутствие посторонних веществ. Например, разной глубиной окисления ФА, особенностями кинетики соответствующих редокс-реакций или неаддитивностью аналитических сигналов. Установить действительные причины расхождений, анализируя пищевые продукты, трудно: нет ни подходящих стандартных образцов, ни надежных референтных методик. Выходом может быть сопоставительный анализ смесей с известными значениями c_{Σ} ; правильность метода ФЧ таким способом ранее не проверяли.

Цели данного исследования: 1) проверка метода ФЧ как способа оценки суммарного содержания фенольных антиоксидантов в их модельных смесях; 2) сопоставление метрологических характеристик методик ФЧ и FRAP; 3) выработка рекомендаций для испытательных лабораторий.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве модельных соединений использовали кверцетин (КВ), рутин (РТ), пирокатехин (П), резорцин (Р), галловую кислоту (ГК) и аскорбиновую кислоту (АК). Исходные водные или этанольные растворы индивидуальных ФА готовили по точным навескам из реактивов «х.ч.» и разбавляли дистиллированной водой в день анализа до концентраций порядка $n \cdot 10^{-4}$ моль/л. Модельные смеси 2-3 индивидуальных ФА готовили, смешивая разбавленные растворы; соотношение молярных концентраций разных ФА в полученных смесях не превышало 10 : 1. Общее содержание ФА в единичной смеси составляло от 20 до 150 мкМ. Примером могут быть пять смесей, охарактеризованных в табл. 1. Реактив ФЧ (PanReac, Испания) перед употреблением разбавляли в 10 раз дистиллированной водой. Образцы черного чая приобретали в торговой сети, чайные настои готовили по ISO 3103-2013 без применения органических растворителей [15].

При проверке метода ФЧ за основу брали методику [3]. Для построения градуировочных графиков в ряд пробирок вводили по 1.0 мл водного раствора с известной (варьируемой) концентрацией исследуемого ФА ($n \cdot 10^{-5}$ моль/л). Добавляли 5.0 мл разбавленного реактива ФЧ, через 5 минут вводили 4.0 мл 20 % раствора Na_2CO_3 , перемешивали и выдерживали в течение 60 минут при комнатной температуре. Все полученные растворы имели $\text{pH} \approx 10.5$, что обеспечивает высокую скорость взаимодействия реактива ФЧ с полифенолами и устойчивость образующихся продуктов. Оптическую плотность измеряли на приборе КФК-3-01 при 765 нм относительно воды, внося поправку на поглощение холостого раствора [3]. Обобщенный сигнал смеси ФА (A_{Σ}) формировали и измеряли аналогичным образом, вводя в пробирку 1.0 мл исследуемой смеси. Результат анализа выражали в микромолярности $X_{\text{ст}}$ (мкМ). В качестве $X_{\text{ст}}$ обычно применяли галловую кислоту.

При определении суммарного содержания ФА по методу FRAP за основу брали методику [9]. Вспомогательный реагент – 2,2'-дипиридил, время экспозиции – 60 минут, $\lambda = 520$ нм. Статистическую обработку ($n = 3$, $P = 0.95$) вели по известным форму-

лам, предполагающим нормальное распределение случайных погрешностей [16]. Относительные погрешности анализа (δC) рассчитывали по формуле:

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

Обобщенную погрешность анализа разных смесей по одной методике характеризовали, вычисляя принятый в хемометрике параметр *RMSEP* (*root mean squared error of prediction*) по формуле:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m (c^* - c_{\Sigma})^2}{m}}, \quad (2)$$

где m – число смесей, c^* и c_{Σ} – найденное и действительное содержания ФА в j -ой смеси [17]. Аддитивность сигналов проверяли по 3s-критерию [18]. Отклонения от аддитивности считали значимыми при выполнении условия

$$|\Delta A| > 3 S, \quad (3)$$

где $\Delta A = A_{\Sigma} - \Sigma A_j$; A_{Σ} – оптическая плотность окрашенного раствора, полученного из смеси ФА; ΣA_j – сумма оптических плотностей растворов, полученных из компонентов той же смеси по отдельности; S – стандартное отклонение при измерении A_{Σ} при повторном приготовлении смеси. Пределы обнаружения (C_{min}) рассчитывали по Кайзеру с учетом сходимости и чувствительности измерений [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение индивидуальных ФА. По литературным данным, полифенолы в щелочной среде окисляются реактивом ФЧ до бесцветных полихинонов. Глубокая деструкция полихинонов с разрывом бензольного кольца и образованием смеси бесцветных продуктов начинается лишь через 1-2 часа после смешивания реагентов [1, 4]. Входящие в состав реактива ФЧ и введенные в избытке ГПК молибдена(VI) и вольфрама(VI) в ходе экспозиции восстанавливаются, превращаясь в «синь» - смесь окрашенных ГПК, содержащих Mo(V) и W(V). Светопоглощение сини зависит от pH раствора, относительного избытка ФЧ и времени экспозиции [19]; точный состав сини неизвестен. По нашим

Таблица 1

Состав некоторых модельных смесей и результаты их анализа по методу ФЧ при использовании разных стандартных веществ ($X_{\text{ст}}$)

Table 1

Composition of certain model mixtures and the results of their analysis with the FC assay using various standard substances (X_{st})

Номер смеси	C_i , мкМ					c_{Σ} , мкМ	Найдено, c^* , мкМ		
	АК	ГК	КВ	П	Р		$X_{\text{ст}} = \text{ГК}$	$X_{\text{ст}} = \text{КВ}$	$X_{\text{ст}} = \text{АК}$
1	45	0	48	0	0	93	140	76	250
2	45	43	0	0	0	88	59	33	109
3	0	43	48	0	0	91	133	72	239
4	23	0	25	28	0	76	110	61	200
5	0	43	25	0	28	96	116	64	211

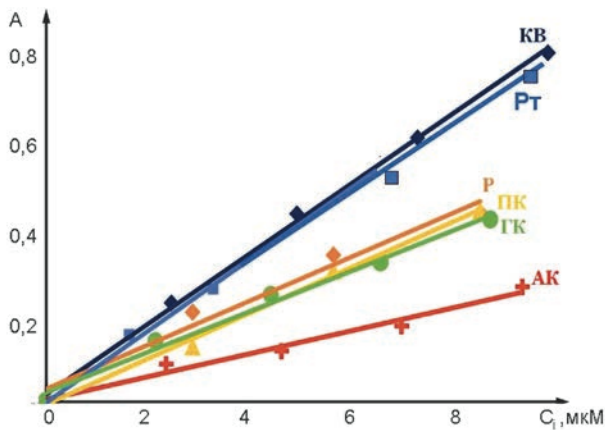


Рис. 1. Веер градуировок при определении индивидуальных ФА по методу ФЧ ($l = 2.0$ см).

Fig. 1. Dependences of the signals on the concentration of individual phenolic antioxidants ($\mu\text{moles}/\text{dm}^3$) in the final solutions with the Folin-Ciocalteu assay ($l = 2.0$ sm).

данным, при фиксированном времени экспозиции спектры поглощения продуктов восстановления реактива ФЧ индивидуальными ФА и их смесями совпадают по положению максимума (765 нм) и по форме пиков. Это указывает на независимость состава окрашенных продуктов от природы восстановителя. При комнатной температуре кинетические кривые всех ФА и их смесей выходят на плато за 20–30 минут. Определяя суммарные содержания ФА, применяли 60-минутные экспозиции, как рекомендовано в [3]. В этом случае сигналы индивидуальных ФА хорошо воспроизводятся, коэффициенты вариации (W) не превышают 2 %. Градуировочные графики, построенные для индивидуальных ФА в области 10^{-6} – 10^{-5} моль/л, прямолинейны ($r > 0.98$) и образуют «веер градуировок» (рис. 1). Концентрации индивидуальных ФА находили с погрешностями, не превышавшими 5 % отн. Во всех случаях $C_{\min} < 1$ мкМ.

Проведенные опыты подтвердили правильность и прецизионность метода ФЧ как способа определения индивидуальных ФА в однокомпонентных растворах. Эта несложная задача успешно решается и с помощью слабых окислителей, причем при одинаковом времени экспозиции чувствительность определения индивидуальных ФА методом FRAP выше, чем чувствительность их определения по методу ФЧ (рис. 2).

Определение суммарного содержания ФА в модельных смесях. Коэффициенты чувствительности при определении разных ФА достоверно различаются, безразмерный показатель $T = K_{\max}/K_{\min}$ превышает 3 единицы. Это согласуется с данными других авторов [4, 17, 20] и свидетельствует о сильно выраженной внутригрупповой селективности аналитических сигналов. Значения c^* находили по измеренным значениям A_{Σ} с учетом разбавления смеси в ходе анализа; при этом использовали градуировочные графики, построенные с помощью КВ, ГК или АК.

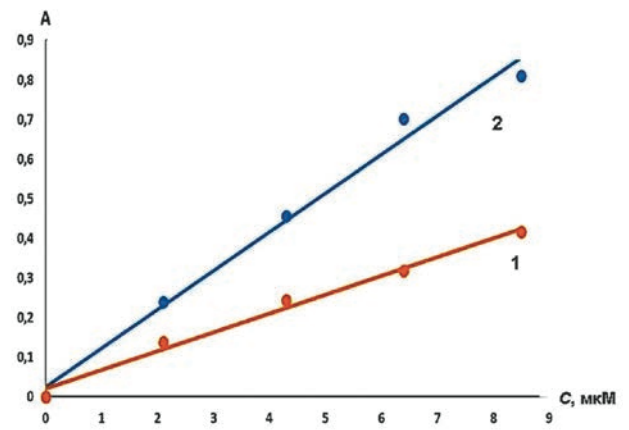


Рис. 2. Градуировочные графики для определения суммарного содержания ФА разными методами (в пересчете на галловую кислоту). 1 – метод ФЧ, 765 нм, $l = 2.0$ см, $\tau = 60$ минут. 2 – метод FRAP, 520 нм, $l = 2.0$ см, $\tau = 60$ минут.

Fig. 2. Dependences of the PhA signals on the concentration of gallic acid ($\mu\text{mol}/\text{dm}^3$) in the final solutions to determine the total PhA content with the different assays. 1 – FC assay, 765 nm, $l = 2.0$ sm, $\tau = 60$ min. 2 – FRAP assay, 510 nm, $l = 2.0$ sm, $\tau = 60$ min.

Пересчет A_{Σ} на кверцетин всегда приводил к заниженным, а на аскорбиновую кислоту – к сильно завышенным оценкам c_{Σ} . Несколько лучшие оценки c_{Σ} получали в пересчете на галловую кислоту, как то рекомендуют многие исследователи [4, 6, 20]. Но и в этом случае значения δc имеют систематический характер, для некоторых смесей они превышают 50 % (по модулю); обычно оценки c_{Σ} по ГК были завышенными. Следовательно, независимо от природы выбранного стандарта метод ФЧ не позволяет правильно определять суммарные содержания ФА.

Следовало выяснить причины возникновения вышеуказанных погрешностей. При определении суммарного содержания однопипных аналитов в пересчете на $X_{\text{от}}$ основным источником систематических погрешностей часто бывают различия в чувствительности определения разных аналитов, то есть внутригрупповая селективность аналитических сигналов [21]. В таких случаях знак и величина погрешности определяются составом пробы и выбором $X_{\text{от}}$; значения δc удается прогнозировать, используя коэффициенты чувствительности при определении индивидуальных компонентов данной пробы в условиях измерения A_{Σ} . Алгоритм прогнозирования обоснован и детально изложен в статье [22]. Наши опыты показали, что алгоритм [22] позволяет прогнозировать погрешности и в случае метода ФЧ (табл. 2). Видно, что знаки систематических погрешностей во всех случаях прогнозируются верно, меняясь при переходе к другому стандарту или другой смеси. Следовательно, основным источником систематических погрешностей при определении суммы ФА является именно внутригрупповая селективность сигналов. Другие возможные источники (например, потери аналитов

Таблица 2

Ожидаемые и реальные погрешности оценки суммарного содержания ФА в модельных смесях по методу ФЧ при использовании разных стандартных веществ

Table 2

Predicted and real errors for the estimates of the total PhA content in the model mixtures with the FC assay used with various standard substances (X_{st})

Номер смеси*	$X_{ст} = ГК$		$X_{ст} = KB$		$X_{ст} = АК$	
	$\delta c_{теор} \%$	$\delta c_{эксп} \%$	$\delta c_{теор} \%$	$\delta c_{эксп} \%$	$\delta c_{теор} \%$	$\delta c_{эксп} \%$
1	26	51	- 34	- 18	122	169
2	- 22	- 33	- 59	- 63	37	23
3	48	46	- 22	- 21	201	162
4	24	45	- 35	- 19	118	163
5	28	21	- 29	- 33	139	120

Примечания: * – составы смесей указаны в табл. 1; * – the same composition of these mixtures as in table 1.

в ходе анализа) привели бы к непредсказуемым погрешностям, не зависящим от индивидуального состава пробы и выбора стандартного вещества. Этот вопрос детально рассмотрен одним из авторов настоящей статьи в работе [21].

Возникает естественный вопрос, почему разные ФА определяются методом ФЧ с разной чувствительностью, если образуется одна и та же «синь», одни и те же продукты восстановления ГПК. В таких случаях внутригрупповая селективность сигналов может возникать из-за разной стехиометрии или разной скорости соответствующих редокс-реакций. Так как в рамках метода ФЧ аналитические сигналы измеряют в условиях установившегося равновесия, кинетические факторы несущественны. Мы предполагаем, что внутригрупповая селективность сигналов, получаемых по методу ФЧ, связана с разной стехиометрией однотипных редокс-реакций. При прочих равных условиях кверцетин и другие многоэлектронные восстановители за время экспозиции формируют больше сини, чем одноэлектронные, а потому определяются с большей чувствительностью (см. рис.1). Подтвердить эту гипотезу расчетами мешает лишь недостаточная изученность стехиометрии окисления индивидуальных полифенолов реактивом ФЧ.

Проверка аддитивности. Как видно из табл. 2, числовые значения наблюдаемых погрешностей ($\delta c_{эксп}$) для некоторых смесей заметно отличались

от прогнозируемых значений ($\delta c_{теор}$). Мы предположили, что в рамках метода ФЧ систематические погрешности возникают не только из-за внутригрупповой селективности сигналов (как в других методах группового анализа [21]). Дополнительным источником погрешности может быть неаддитивность сигналов. Проверка по методике [18] показала, что отклонения от аддитивности светопоглощения по модулю превышают соответствующие значения $3s$ -критерия, то есть статистически значимы (табл. 3). Для некоторых смесей значения ОА доходили до 20 % от ожидаемой оптической плотности смеси. Как правило, наблюдались отрицательные ОА. Причиной их появления могла быть конкуренция параллельно протекающих реакций окисления разных ФА в условиях нехватки окислителя [9]. Однако неаддитивность сигналов сохранялась и при целенаправленном увеличении избытка окислителя, что противоречит высказанному предположению.

Другой возможной причиной появления ОА могло быть изменение глубины восстановления реактива ФЧ. Известно, что увеличение концентрации индивидуальных ФА при неизменном содержании реактива ФЧ меняет глубину восстановления ГПК и сдвигает спектры поглощения «сини» в коротковолновую сторону [19]. Тот же фактор может действовать и при одновременном вводе нескольких ФА. Сдвиг спектра поглощения должен приводить к снижению

Таблица 3

Проверка аддитивности светопоглощения (765 нм) при оценке суммарного содержания ФА по методу ФЧ

Table 3

Test to check the additivity of the light absorbance (765 nm) for the PhA total content determination with the Folin-Ciocalteu assay

Номер смеси*	$c_{\Sigma}, \text{мкМ}^{**}$	ΣA_i	A_{Σ}	ΔA	$3s$	Значимость ОА	ОА, %
1	9.3	0.645	0.688	0.043	0.018	+	6.3
2	8.8	0.364	0.302	- 0.062	0.006	+	- 17.3
3	9.1	0.669	0.651	- 0.018	0.015	+	- 2.5
4	7.6	0.574	0.545	- 0.029	0.021	+	- 5.1
5	9.6	0.652	0.574	- 0.078	0.012	+	- 12.0

Примечания: * – составы смесей указаны в табл. 1; ** – в конечном разбавлении (в окрашенном растворе). * – the composition of mixtures as in table 1; ** – the final dilution (coloured solutions).

Таблица 4

Характеристики сопоставляемых методик группового анализа

Table 4

Metrological characteristics of the compared group analysis assays

Характеристики	ФЧ*	FRAP [9,10]
Область определяемых содержаний, моль/л	$10^{-5} - 10^{-4}$	$10^{-6} - 10^{-3}$
Время экспозиции, мин	60	10 или 60
Область линейности градуировки по $X_{ст}$ мкМ	1 - 10	0.5 - 20
Значения pH фотометрируемого раствора	10.5	3 - 4
Коэффициент вариации (W ,%) при повторном приготовлении окрашенных растворов	< 2 %	< 4 %*
Условный молярный коэффициент поглощения для ГК	$\approx 2 \cdot 10^4$	$3,3 \cdot 10^4$
Пределы обнаружения индивидуальных ФА, мкМ	0.1 - 1	≈ 0.1
Внутригрупповая селективность	Высокая ($T > 3$)	Средняя ($T \approx 2$)
Отклонения от аддитивности	До 20 %, не устранимые	Нет или легко устранимы
Систематические погрешности анализа смесей (для ГК)	До 50 % отн.	До 25 % отн.*
Мешающие вещества (компоненты пищевых продуктов)	Углеводы, аминокислоты, белки, карбоновые кислоты [4].	Комплексанты [23], альбумины [24].

Примечание: * – получено в данной работе, * – this investigation .

светопоглощения при 765 нм по сравнению с определением тех же ФА порознь, то есть к возникновению отрицательных ОА. Однако изменение глубины восстановления ГПК по мере роста концентрации ФА должно было бы искривлять градуировочные графики индивидуальных ФА, чего в исследуемой концентрационной области не наблюдали ни мы, ни другие авторы [3]. Очевидно, отклонения от аддитивности светопоглощения при определении суммы фенольных антиоксидантов по методу ФЧ требуют дополнительного изучения.

Сопоставление методов ФЧ и FRAP. Снизить внутригрупповую селективность сигналов и исключить ОА, меняя условия окисления смесей ФА реактивом ФЧ, нам не удалось. Но эти цели легко достигаются при замене реактива ФЧ более слабым окислителем, то есть при переходе к методу FRAP.

Приведенные в табл. 4 данные показывают, что при определении индивидуальных ФА в одно-

компонентных растворах возможности методов ФЧ и FRAP довольно близки. Метод FRAP дает менее воспроизводимые результаты, поскольку кинетические кривые за время экспозиции не успевают выйти на плато, и на результаты группового анализа сильнее влияют случайные колебания концентраций, температуры и времени экспозиции. С другой стороны, метод FRAP более чувствителен и более удобен для испытательных лабораторий, так как реактив ФЧ дорог и токсичен. Преимуществами метода FRAP следует также считать: 1) возможность повышения точности группового анализа за счет перехода к нормальным концентрациям [9]; 2) возможность теоретически обоснованного подбора $X_{ст}$ [21]. Важнейшим преимуществом метода FRAP является отсутствие побочных реакций окислителя с углеводами, аминокислотами и белками. Однако метод FRAP, в отличие от ФЧ, чувствителен к присутствию комплексантов [23]. В

Таблица 5

Результаты и погрешности анализа модельных смесей ФА с применением методов ФЧ и FRAP в пересчете на галловую кислоту

Table 5

Results and errors of the total PhA content determination (recalculated to the gallic acid) with the FC or FRAP assays

Номер смеси*	c_{Σ} , мкМ	c^* , мкМ		δc , %		W , %	
		ФЧ	FRAP	ФЧ	FRAP	ФЧ	FRAP
1	93	140 ± 3	106 ± 6	+ 51	+ 14	0.8	2.2
2	88	59 ± 1	66 ± 5	- 33	- 25	0.3	3.3
3	91	133 ± 3	112 ± 3	+ 46	+ 23	0.8	1.3
4	76	110 ± 6	73 ± 7	+ 45	- 4	2.0	3.9
5	96	116 ± 3	85 ± 5	+ 21	- 11	0.7	2.5
<i>RMSEP</i> , мкМ		36	15				

Примечание: * – составы смесей указаны в табл. 1; * – the mixtures composition as in table 1.

обоих случаях мешают альбумины, связывающие ФА в инертные комплексы [24].

Как уже отмечалось, погрешности определения суммарного содержания ФА в модельных смесях по методу ФЧ могут превышать 50 %. Метод FRAP дает более правильные результаты (табл. 5), поскольку внутригрупповая селективность здесь выражена в меньшей степени ($T \approx 2$), а сигналы антиоксидантов аддитивны. При переходе к методу FRAP параметр *RMSEP* (обобщенная погрешность) снижается с 36 до 15 мкМ при среднем значении $c_{\Sigma} = 89$ мкМ. В рамках метода FRAP можно дополнительно снизить систематические погрешности группового анализа, используя вместо ГК другие стандарты и/или выражая концентрации ФА в моль-экв/л [9]. Некоторые авторы рекомендуют использовать «нормальные» концентрации и для расчета результатов анализа по методу ФЧ [4]. Мы полагаем, что применительно к методу ФЧ этот прием некорректен, так как стехиометрические коэффициенты для редокс-реакций между ГПК и индивидуальными ФА до сих пор точно не определены.

Сопоставительный анализ образцов черного чая подтвердил, что метод ФЧ дает достоверно завышенные по сравнению с методом FRAP оценки суммарного содержания ФА (табл. 6). Это согласуется с данными других авторов [12-14]. В обоих случаях применяли одну и ту же методику приготовления чайного настоя [15]; одинаковое время экспозиции, одно и то же стандартное вещество (ГК). Тем не менее, расхождения результатов, полученных при сопоставительном анализе образцов чая, были выражены еще сильнее, чем в случае анализа модельных смесей. Это объясняется взаимодействием реактива ФЧ со слабыми восстановителями, присутствующими в чайных настоях и не входящими в число антиоксидантов.

Таблица 6

Результаты анализа образцов черного чая с применением методов ФЧ и FRAP (в пересчете на галловую кислоту)

Table 6

Results of the black tea analysis with the FC or FRAP assays (recalculated to the gallic acid)

Торговая марка чая	Результат анализа сухого чая, мг/г	
	ФЧ	FRAP
ПРИНЦЕССА	44 ± 3	25 ± 2
КАНДИ МЕДИУМ	79 ± 4	34 ± 2
BASILUR SPECIAL	60 ± 3	35 ± 2
UDA PUSSELLAWA	60 ± 3	35 ± 2

Заключение

С учетом всего изложенного, мы рекомендуем постепенно заменять методики аналитического контроля, основанные на применении реактива Фолина-Чокальтеу, в частности методику [3], более точными. Новые методики контроля качества пищевых продуктов по показателю «суммарное содержание полифенолов» должны быть не менее прецизионными, чем метод ФЧ, но более специфичными для данной группы аналитов и одинаково чувствительными к разным ФА. С этой целью можно было бы использовать хроматографические методы, в частности метод ВЭЖХ. В этом случае пересчет на стандартное вещество не требуется. Но применению ВЭЖХ мешает сильное различие сорбционных характеристик индивидуальных ФА, отсутствие серийного выпуска специфических детекторов, а также трудоемкость и ненадежность выявления пиков ФА по временам удерживания. Поэтому для контроля суммарного содержания ФА метод ВЭЖХ используют очень редко [25]. Зато с его помощью успешно определяют индивидуальные ФА. Примером может быть методика определения некоторых ФА в образцах растворимого кофе [26].

Вместо метода ФЧ для экспрессного определения суммарного содержания ФА с успехом могут быть применены быстро протекающие и хорошо изученные редокс-реакции с участием слабых одноэлектронных окислителей. Оптимальным способом оценки суммарного содержания ФА в чае и других пищевых продуктах в пересчете на стандартное вещество мы считаем спектрофотометрический метод FRAP. При правильном выборе вспомогательного реагента и стандартного вещества этот метод специфичен для фенольных ЕТ-антиоксидантов и, в отличие от метода ФЧ, не ведет к получению систематически завышенных результатов. Соответствующая методика анализа пищевых продуктов уже внесена в Федеральный реестр [27] и может быть рекомендована для использования в контрольно-аналитических лабораториях пищевой промышленности. Хорошей альтернативой методу ФЧ могут стать и методики оценки суммарного содержания ФА, основанные на амперометрических или потенциометрических измерениях [1].

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования проведены при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Омской области (грант 16-03-550479 за 2018 г.). Авторы благодарят проф. И.В. Власову, проф. Т.Г. Цюпко и д.х.н. С.Н. Яшкина за ценные замечания.

ACKNOWLEDGEMENTS

Current investigation was funded by RFBR and Omsk Region Administration according to the research project № 16-03-550479 (2018). The authors thank

I.V. Vlasova, T.G. Tsytko and S.N. Yashkin for their valuable remarks.

Литература

- 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.
- Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds / R. Apak [et al.]. // *Molecules*. 2007, № 12. P. 1496-1547.
- ГОСТ Р ИСО 14502-1-2010. Чай. Метод определения общего содержания полифенолов. М: Стандартинформ. 2012. 16 с.
- Singleton V.L., Orthofer R, Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substances by means of Folin-Ciocalteu reagent // *Methods Enzymol*. 1999. V. 299. P. 152-178.
- A thorough study of reactivity of various compound classes towards the Folin-Ciocalteu reagent / J.D. Everett [et al.] // *J. Agric. Food Chem*. 2010. V. 58, № 14. P. 8139-8144.
- 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.
- Ainsworth E.A., Gillespie K.M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent // *Nature protocols*. 2007. V. 2, № 4. P.875-877.
- 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.
- Определение суммарного содержания антиоксидантов методом FRAP / Т.Г.Цюпко [и др.] // *Аналитика и контроль*. 2011. Т. 15, № 3. С. 287-298.
- Оценка антиоксидантной активности пищевых продуктов с использованием индикаторной системы на основе фенантролилатных комплексов железа / Т.Г. Цюпко [и др.] // *Известия вузов. Пищевая технология*. 2011. № 5-6. С. 84-87.
- Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method / R. Apak [et al.] // *J. of agricultural and food chem*. 2004. V. 52, № 26. P. 7970-7981.
- Цюпко Т.Г., Бриленок Н.С., Гуцаева К.С., Вершинин В.И. Определение суммарного содержания фенольных антиоксидантов в чае с применением разных вариантов метода FRAP // *Аналитика и контроль*. 2019, Т.19, № 1. С.143-151.
- Al-Obaidi R.S., Sahib D. Determination of antioxidants activity in tea extract // *Amer. J. Biochem*. 2015. V. 5, № 3. P. 49-52.
- Цюпко Т.Г., Тищенко Е.А., Воронова О.Б. Спектрофотометрическая оценка железовосстанавливающей способности растворимого кофе // *Аналитика и контроль*. 2016. Т.20, № 4. С.320-329.
- ГОСТ ISO 3103-2013 Чай. Приготовление настоя для органолептического анализа. М: Стандартинформ. 2014. 6 с.
- Смагунова А.Н., Карпукова О.М. Методы математической статистики в аналитической химии. - Ростов н/Д: Феникс. 2012. 347 с.
- Esbensen K.H. *Multivariate Data Analysis - In Practice*. // Oslo: CAMO, 2004. 589 p.
- 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. 225-233.
- 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.
- Чупрынина Д.А. Методические аспекты оценки суммарной антиоксидантной активности пищевых продуктов в условиях in vitro с использованием интегральных показателей состава. Диссертация канд. хим. наук. Краснодар. 2013. 158 с.
- Vershinin V.I. Total indices as a tool to estimate sum content of similar analytes // *Talanta*. 2015. V. 131, № 1. P. 293-300.
- Вершинин В.И., Бриленок Н.С., Цюпко Т.Г. Методология спектрофотометрического анализа смесей органических соединений. Погрешность оценки суммарного содержания аналитов с учетом их коэффициентов чувствительности // *Журн. аналит. химии*. 2012. Т. 67, № 7. С.715-720.
- 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.
- 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 Analyt. Methods*. 2011. V. 4, № 3. P. 334-340.
- On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee / A. Stalmach [et al.] // *Braz. J. Plant Physiol*. 2006. V. 18, № 1. P. 253-262.
- Тищенко Е.А., Цюпко Т.Г., Милевская В.В., Темердашев А.З. Идентификация и хроматографическое определение биоактивных компонентов в образцах растворимого кофе // *Аналитика и контроль*. 2017. Т. 21, № 3. С. 251-261.
- МУ 08-47/275 Спектрофотометрический метод измерений антиоксидантной активности пищевых продуктов. ФР 1.31.2011.09197. Краснодар. 2010. 14 с.

REFERENCES

- Budnikov G.K., Ziyatdinova 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: 10.1070/RCR4436.
- Apak R., Guclu K., Demirata B., Ozyrek M., Esin S., Bektaolu 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. 12, no. 12, pp. 1496-1547. DOI: 10.3390/12071496.
- 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.
- Singleton V.L., Orthofer R, Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substances by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 1999, vol. 299, pp. 152-178. DOI: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1
- Everette J.D., Bryant Q., Green A., Abbey Y.A., Wangila G., Walker R. A thorough study of reactivity of various compound classes towards the Folin-Ciocalteu reagent. *J. Agric. Food Chem*. 2010, vol. 58, no 14, pp. 8139-8144. DOI: 10/1021/jf1005935
- Bastola K., Guragain Y., Bhadriraju V., Vadlani P. Evaluation of standards and interfering compounds in the deter-

- mination of phenolics by Folin-Ciocalteu assay. Method for effective bioprocessing of biomass. *Amer. J. Analyt. Chem.* 2017, vol. 8, no. 6, pp. 416-431. DOI: 10.4236/ajac2017/86032.
7. Ainsworth E.A., Gillespie K.M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature protocols.* 2007, vol. 2, no. 4, pp. 875-877. DOI: 10.1035/mprot.2007.102.
8. Benzie I.F.F., Szeto Y.T. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing antioxidant power assay. *J. Agric. and Food Chem.*, 1999, vol. 47, no. 2, pp. 633-636.
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' [Analytics and Control]*. 2011, vol. 15, no. 3, pp. 287-298 (in Russian).
10. 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 tekhnologiya [News of universities. Food technology]*, 2011, no. 5-6, pp. 84-87 (in Russian).
11. Apak R., Güçlü K., Ozyürek M., Karademir S.E. Novel total antioxidant index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capacity in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J. Agricult. Food Chem.*, 2004, vol. 52, no. 26, pp. 7970-7981. DOI:10.1021/jf048741x.
12. Tsytko T.G., Brilenok N.S., Gushchaeva K.S., Vershinin V.I. [Determination of the total phenol antioxidants content in tea samples using different variations of FRAP assay]. *Analitika i kontrol' [Analytics and Control]*, 2019, vol. 23, no 1, pp. 143-151 (in Russian). DOI: 10.15826/analitika.2019.23.1.011
13. Al-Obaidi R.S., Sahib D. Determination of antioxidants activity in tea extract. *Amer. J. Biochem.*, 2015, vol. 5, no 3, pp. 49-52. DOI:10.5923/j.ajb.20150503.01.
14. Tsytko T.G., Tishchenko E.A., Voronova O.B. [Spectrophotometric assessment of ferric reducing power of the instant coffee]. *Analitika i kontrol' [Analytics and Control]*, 2016, vol. 20, no. 4, pp. 320-329. DOI: 10.15826/analitika.2016.20.4.003. (in Russian).
15. ISO 3103:1980. Tea — Preparation of liquor for use in sensory tests. Confirmed in 2013. ISO/TC 34/SC. 4 p.
16. Smagunova A.N., Karpukova O.M. [Statistical Methods in Analytical Chemistry] *Metody matematicheskoi statistiki v analiticheskoi khimii.* Rostov-on-Don: Feniks, 2012 (in Russian).
17. Esbensen K.H. *Multivariate Data Analysis - In Practice.* Oslo: CAMO, 2004. 589 p.
18. Vershinin V.I., Vlasova I.V., Tsytko T.G. [Detection of deviations from additivity in spectrophotometric analysis of unseparated mixtures]. *Metody i ob"ekty khimicheskogo analiza [Methods and objects of the chemical analysis]*, 2010, vol. 5, no. 4, pp. 225-233 (in Russian).
19. Denisenko T.A., Vishnikin A.B., Tsiganok L.P. [Reaction features of 18-molibdo-diphosphate and Folin-Ciocalteu reagent with phenolic compounds]. *Analitika i kontrol' [Analytics and Control]*, 2015, vol. 19, no. 3, pp. 242-251. DOI: 10.15826/analitika.2015.19.3.001 (in Russian).
20. Chuprinina D.A. [Methodic aspects to estimate the total antioxidant activity in vitro by the total indices of chemical composition of foodstuff]. Ph. D. thesis (chemistry). Krasnodar. 2013. (in Russian).
21. Vershinin V.I. Total indices as a tool to estimate sum content of similar analytes. *Talanta.* 2015. vol. 131, no 1, pp. 293-300. doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.102
22. Vershinin V.I., Brilenok N.S., Tsytko T.G. Methodology of 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. DOI: 10.1134/S1061934812010052.
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' [Analytics and Control]*, 2016, vol. 20, no. 3, pp. 209-217. DOI: 10.15826/analitika.2016.20.3.004
24. Ziyatdinova, G., Nizamova A., Budnikov H. Novel coulometric approach to evaluation of total free polyphenols in tea and coffee beverages in presence of milk proteins. *Food Anal. Methods*, 2011, vol. 4, no. 3, pp. 334-340. DOI: 10.1007/s12161-010-9174-0.
25. Stalmach A., Mullen W., Nagai C., Crozier A. On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee. *Braz. J. Plant Physiol.*, 2006, vol. 18, no. 1, pp. 253-262. DOI: 10.1590/S1677-04202006000100018
26. Tishchenko E.A., Tsiupko T.G., Milevskaia V.V., Temerdashev A.Z. [Identification and chromatographic determination of bioactive components in the instant coffee samples]. *Analitika i kontrol' [Analytics and Control]*, 2017, vol. 21, no. 3, pp. 251-261. DOI: 10.15826/analitika.2017.21.3.008 (in Russian).
27. Metodicheskie ukazaniia 08-47/275 [Methodical instructions 08-47/275] *Spektrofotometricheskii metod izmerenii antioksidantnoi aktivnosti pishchevykh produktov [Spectrophotometric determination of antioxidant activity of foodstuffs]*. FR 1.31.2011.09197. Krasnodar. 2010. 14 p. (in Russian).