

# Экспрессный электрохимический метод анализа антиоксидантной активности пищевых продуктов

А.Я. Яшин, Я.И. Яшин, Н.И. Черноусова

НПО «Химавтоматика» (Москва)

В.П. Пахомов

Институт клинической фармакологии НЦ ЭСМП МЗ РФ

В последние годы установлена связь между ростом свободных радикалов (супероксидный анион-радикал, гидропероксидный радикал, пероксид водорода, гидроксил радикал и др.) в биологических жидкостях человека с возникновением опасных заболеваний, в частности сердечно-сосудистых, онкологических, диабета и др. Преждевременное старение также связывают с ростом количества свободных радикалов.

Увеличение содержания в организме свободных радикалов обусловлено снижением активности ферментов антиоксидантной защиты организма: оксидисмутазы, каталазы, пероксидазы, а также влиянием неблагоприятных внешних факторов (загрязнения внешней среды, радиация, курение, постоянные стрессы, алкоголизм, УФ-облучение, некачественное питание).

Для снижения уровня свободных радикалов в биологических жидкостях человека рекомендуется ежедневно употреблять пищевые продукты, лекарственные препараты, биологически активные добавки и напитки, содержащие природные антиоксиданты, в частности фрукты, ягоды, овощи, растительные масла, чай, мед, вино, пиво и др. Регулярное профилактическое потребление соответствующего уровня антиоксидантов позволит восстановить до нормы антиоксидантный статус организма

и сохранить здоровье и продолжительность полноценной жизни.

Однако для эффективной профилактики и лечения свободнорадикальной патологии прежде всего необходимо иметь достоверные сведения, во-первых, о содержании антиоксидантов в разных продуктах и напитках, во-вторых, — о состоянии антиоксидантной системы организма.

Многие существующие, особенно химические, методы недостаточно определяют антиоксидантную активность продуктов. Нами предложен оригинальный амперометрический метод определения антиоксидантной активности продуктов питания, биологически активных веществ и напитков. На основе этого метода разработан прибор. Антиоксидантная активность связана с присутствием в указанных продуктах природных соединений, в частности флавоноидов, витаминов С, Е, ароматических оксидантов и других полифенолов.

Амперометрический способ [1, 2] основан на измерении электрического тока, возникающего при окислении исследуемого вещества (или смеси веществ) на поверхности рабочего электрода, находящегося под определенным потенциалом.

Чувствительность амперометрического способа определяется как приро-

дой рабочего электрода, так и потенциалом, приложенным к нему. В качестве материала рабочего электрода используют стеклоуглерод, золото, платину, серебро, медь, никель, палладий и др. Потенциал может устанавливаться в пределах от 0 до 2,5 В.

Известно, что амперометрический способ анализа обладает рядом преимуществ: низким пределом обнаружения, высокой селективностью (определяются только соединения, молекулы которых могут окисляться; другие соединения, присутствующие даже в больших концентрациях, не определяются), малым объемом ячейки (0,1–5 мкл), простотой обслуживания.

В условиях амперометрического детектирования хорошо окисляются соединения, содержащие гидроксильные группы, предел их обнаружения на уровне  $10^{-9}$ – $10^{-12}$  г, в благоприятных условиях некоторые соединения определяются на уровне  $10^{-15}$  г (фемтограммы).

Основные и наиболее активные природные антиоксиданты имеют фенольную природу. Это природные полифенолы, разные типы флавоноидов, фенольные оксикислоты, витамины и др.

Таким образом, амперометрический способ — наиболее подходящий метод для оценки антиоксидантной активности.

Принципиальная схема прибора [3, 4], который включает емкость для растворителя; насос; дозатор, выполненный в виде многоходового крана; амперометрический детектор, состоящий из термостатируемой электрохимической ячейки со сменными рабочими электродами; усилитель тока; аналогоцифровой преобразователь и устройство регистрации выходного сигнала, показана на рис. 1. Прибор позволяет проводить прямые количественные измерения антиоксидантной активности исследуемых проб, содержащих биологически активные соединения. Амперометрический детектор может работать в трех режимах: постоянном потенциале, импульсных потенциалах и при сканировании потенциалов во всем диапазоне. Причем, варьируя полярность и величины приложенных потенциалов, можно определять не только суммарную антиоксидантную активность, но и активность отдельных классов биологических соединений.

Прибор работает следующим образом: насос постоянно прокачивает растворитель, забирая его из емкости, через всю систему. В кран-дозатор в положении «отбор проб» вводится стандартным шприцем на 1 мл исследуемый раствор в дозируемую петлю. Поворотом ручки крана в положение «анализ» поток растворителя направляет опре-

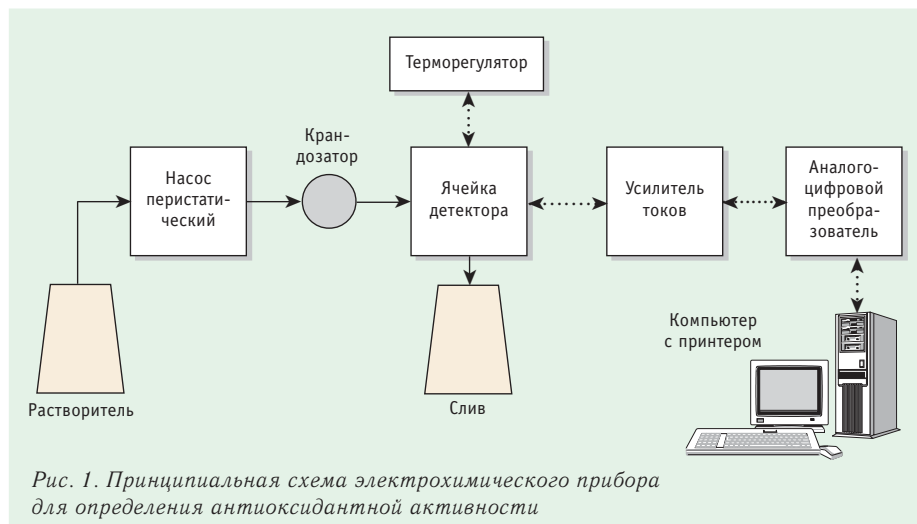


Рис. 1. Принципиальная схема электрохимического прибора для определения антиоксидантной активности

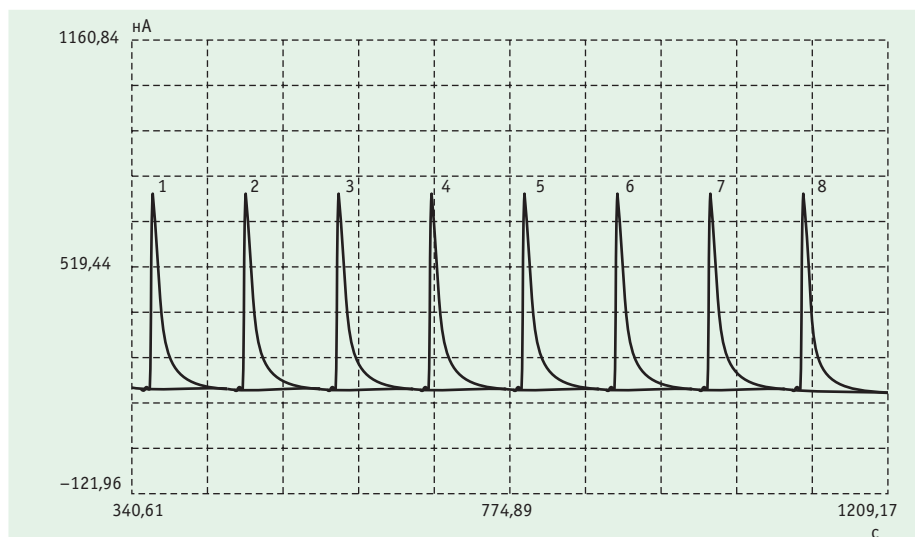


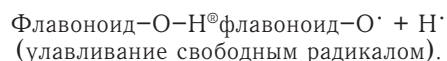
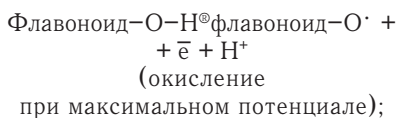
Рис. 2. Воспроизводимость последовательных восьми дозирования разбавленных растворов бальзама «Тайга» (СКО < 3 %)

деленную дозу исследуемого вещества в ячейку детектора. В последней на поверхности рабочего электрода происходит окисление молекул исследуемого вещества, при этом возрастает электрический ток между двумя электродами. Величина электрического тока зависит от природы анализируемого вещества, природы рабочего электрода и потенциала, приложенного к электроду.

Возникающие электрические токи очень малы (в пределах  $10^{-6}$ – $10^{-9}$  А), эти аналоговые сигналы усиливаются, а затем с помощью АЦП преобразуются в цифровой сигнал, который регистрируется на дисплее компьютера. В случае необходимости выходные результаты можно распечатать на принтере.

Рабочий электрод выполнен из стеклоуглерода, который наиболее универсален при определении полифенольных соединений. Потенциал может изменяться от 0 до 2 В, потенциалы ионизации фенольных соединений варьируются в пределах 100–1000 мВ.

Электрохимическое окисление может быть использовано как модельное при измерении активности поглощения свободных радикалов в соответствии со следующими уравнениями:



Обе реакции включают разрыв одной и той же связи O–H, H состоит из  $\bar{e} + \text{H}^+$ . Таким образом, способность к захвату свободных радикалов флавоноидами или другими полифенолами (т.е. их ан-

тиоксидантная активность) может измеряться величиной окисляемости этих соединений на рабочем электроде амперометрического детектора.

Сигнал регистрируется в виде дифференциальных выходных кривых. С помощью специального программного обеспечения производится расчет площадей или высот пиков (дифференциальных кривых) анализируемого и стандартного веществ. Для анализа используется среднее значение из трех–пяти последовательных измерений. В качестве стандартных веществ можно использовать следующие общеизвестные антиоксиданты: рутин, кверцетин, ди-гидрокверцетин, мексидол, тролокс, аскорбиновую кислоту, галловую кислоту и др. Амперометрический прибор имеет ряд преимуществ при определении антиоксидантной активности. Без учета пробоподготовки время отдельного определения занимает несколько минут. Анализ (регистрация и обработка результатов) проходит в реальном времени. Правильность и воспроизводимость анализа обеспечиваются за счет точного дозирования шестиходовым

краном; объем дозируемой петли может меняться от 20 до 500 мкл; СКО дозирования краном менее 0,5 %; СКО последовательных измерений анализируемых проб < 3 % (рис. 2).

Предел обнаружения амперометрического детектора полифенолов, флавоноидов на уровне нанопикограммов ( $10^{-9}$ – $10^{-12}$  г). При таких малых концентрациях меньшая вероятность взаимного влияния разных антиоксидантов при их совместном присутствии, в частности проявление явления синергизма. Меняя величину приложенного потенциала, можно дифференцировать антиоксиданты по классам. Дифференциация возрастает при применении импульсного режима работы амперометрического детектора, имеющегося в приборе. Кроме того, в автоматическом режиме можно определять вольтаграммы для идентификации антиоксидантов. Амперометрическое детектирование в импульсном режиме выполняется автоматически с помощью серии из нескольких кратковременных потенциалов. Детектирующий потенциал выбирается соответствующим для определения конкретных соединений. Он налагается в течение короткого времени. Типичное значение детектирующего времени — 100–400 мс. После детектирования поверхность электрода очищается при высоком положительном потенциале в течение 50–200 мс и затем восстановления при отрицательном потенциале в течение 100–400 мс, прежде чем наступит новый цикл.

В импульсном режиме амперометрический детектор работает стабильно длительное время. Отношение сигналов к одному и тому же антиоксиданту при разных потенциалах может быть также использовано для идентификации: высокая селективность определения характерна только для антиоксидантов, т.е. соединений, способных к окислению; другие соединения, присутствующие в сложных смесях, не мешают их определению. Для анализа не требуются никаких химических реактивов (кроме стандартов), поэтому стоимость анализа очень низкая.

Наиболее актуальная задача в области определения антиоксидантной активности — создание универсального и сравнительно дешевого метода. По нашему мнению, из всех существующих методов амперометрический способ в наибольшей степени удовлетворяет этим требованиям. Особенно удобен амперометрический способ при сопоставлении антиоксидантной активности (АОА) пищевых продуктов, разных лекарственных форм, напитков, БАД и др. Некоторые из подобных сопоставлений приведены в табл. 1–4. В табл. 1 приведена АОА свежесжатых соков фрук-

Таблица 1

Сок	Отношение (сигнал исследуемого вещества/сигнал стандарта)
Лимона	7,86
Чеснока	7,82
Белой редьки	6,86
Свеклы	6,61
Граната	5,98
Грейпфрута	5,84
Красного винограда	5,29
Апельсина	4,5
Мандарина	4,2
Красного перца	4,14
Лука	3,95
Хурмы	2,85

Таблица 2

Мед	АОА, мг/г
Донника	2,68
Гречишный	2,31
Липовый	2,11
Луговой	1,96
Эспарцетовый	1,80
Цветочный	1,64
Белой акации	1,42
Расторопши	1,27

тов и овощей (2 г сока разбавляли 10 мл воды); в табл. 2 — АОА разных типов пчелиного меда (мед был взят у пчеловодов на ярмарке меда в Москве); в табл. 3 — АОА разных видов хмеля, собранных в соответствии с ГОСТом; в табл. 4 — АОА некоторых типов бальзамов и эликсиров, взятых в упаковках производителя.

Отдельно исследована антиоксидантная активность концентрата стевии «Стевиол», которая может быть использована как пищевая добавка.

Антиоксидантная активность экстракта стевии оказалась равной 116,5 мг/мл (стандарт — кверцетин). Это очень вы-

Таблица 3

Сорт хмеля	АОА, мг/г
Крылатский	15,2
Михайловский	14,5
Подвязный	14,1
Челенджер	13,2
Истринский	12,2
Ранний	11,7
Дикий	11,7
Сумерь	11,6

сокая антиоксидантная активность: для сравнения можно указать, что антиоксидантная активность красного вина «Каберне» равна 12,5 мг/мл.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пахомов В.П., Яшин Я.И., Яшин А.Я., Багирова В.Л., Арзамасцев А.П., Кулес В.Г., Ших Е.В. Способ определения суммарной антиоксидантной активности биологически активных соединений. Патент № 2238554. Приоритет от 25.07.2003 г.
2. Яшин А.Я., Яшин Я.И., Пахомов В.П., Черноусова Н.И. Новый экспрессный амперометрический способ определения антиоксидантной активности растительных лекарственных препаратов, биологически активных добавок

Таблица 4

Бальзам	АОА, S образца / S стандарта
«Тайга»	14,1
«Виватон»	9,8
«Ишимский»	5,6
«Демидовский»	4,8
«Алтайский»	1,2
Jagermeister	1,2

и напитков / Материалы VII Международного съезда «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения», Фитофарм. — Миккели, Финляндия, 2004. С. 617–620.

3. Яшин Я.И., Яшин А.Я., Пахомов В.П. Установка для определения суммарной антиоксидантной активности биологически активных соединений. Патент № 2238555. Приоритет от 25.07.2003 г.
4. Яшин А.Я., Яшин Я.И. Прибор для определения антиоксидантной активности растительных лекарственных экстрактов и напитков / Материалы VII Международного съезда «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения». Фитофарм 2004. — Миккели, Финляндия. С. 613–617.

Ляйт



**УПРАВЛЕНИЕ ПРОИЗВОДСТВОМ В СИСТЕМЕ TRACE MODE**

КРУПНЕЙШИЙ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЙ ФОРУМ ПО УПРАВЛЕНИЮ ПРОИЗВОДСТВОМ

- Мировые тенденции;
- TRACE MODE 6 и T-Factory 6: интегрированная платформа для управления производством;
- Промышленная автоматизация, интегрированная в бизнес;
- Опыт отраслевых решений;
- Клуб профессионалов.

Заявку направить по факсу: (095) 232 00 92.  
По почте: Россия, Москва, 107076, а/я 38  
E-mail: secretariat@adastra.ru

Регистрация online:  
<http://www.adastra.ru/ru/expo/registration/>

Справки по телефону: (095) 737 59 33

Конкурс! Напиши статью о проекте на базе TRACE MODE и выиграй ноутбук!

организатор конференции



официальный спонсор:



УПРАВЛЕНИЕ ПРОИЗВОДСТВОМ В СИСТЕМЕ TRACE MODE

Одиннадцатая Международная конференция и выставка

SOFTLOGIC SCADA HMI MES EAM HRM MMS



...там, где рождаются технологии...



Москва, 26-28 января 2005 г.  
Центр Международной Торговли  
Краснопресненская наб. д. 12



**TMC expo 2005** ВЫСТАВКА ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБОРУДОВАНИЯ для управления современным производством

**TRACE MODE COMPATIBLE 2005**

- Промышленное оборудование с цифровым управлением;
- Средства измерения, датчики, исполнительные устройства;
- Промышленные контроллеры и сети;
- PC-based автоматика;
- SOFTLOGIC/SCADA/HMI/MES/EAM/HRM - системы;
- Прикладные проекты АСУ ТП;
- ERP - бизнес-системы для промышленных предприятий.

информационная поддержка:



















