

УДК: 678.078+664.68

Оцінка антиоксидантної активності природних сполук

М. ПОЛУМБРИК, канд.техн. наук
О. ПОЛУМБРИК, докт. хім. наук
 Національний авіаційний університет

В. ПАСІЧНИЙ, докт.техн. наук
Х. ОМЕЛЬЧЕНКО, ст. викладач
 Національний університет харчових технологій

Л.В. БАЛЬ-ПРИЛИПКО, докт. техн. наук
 Національний університет біоресурсів та природокористування

Анотація. В огляді наведено аналіз сучасних даних літератури та власних досліджень авторів щодо методів оцінки антиоксидантної активності природних сполук, а також харчових продуктів, напоїв, добавок, плазми і сироватки крові тощо. Методи дослідження загальної антиоксидантної ємності різняться по типу джерела окиснення, сполуки, що окислюється і способу вимірювання окисненої сполуки. Розглянуто сучасні підходи до розроблення технологій харчових продуктів, збагачених антиоксидантами, враховуючи різноманітність механізмів утворення вільних радикалів в процесах окиснення. Зроблено висновок про необхідність застосування антиоксидантів різних класів для підвищення ефективності їх дії.

Ключові слова: вільні радикали, природні антиоксиданти, механізм дії, окиснення харчових продуктів, методи дослідження.

Основним негативним ефектом окиснення харчових продуктів є втрата смакових якостей, зокрема оксидативне прогіркнення, а також втрата кольору і харчової цінності. Вважають, що окиснення харчових продуктів здійснюється головним чином за рахунок вільнорадикальних реакцій. У харчових системах основним окисником вважається кисень, а також інші ендогенні чи додані хімічні сполуки.

Згідно з визначенням ВООЗ однією із головних проблем у XXI столітті стане подолання дефіциту мікронутрієнтів загалом та мікроелементів зокрема. Зміна харчового статусу пов'язана із все меншим споживанням свіжої рослинної їжі та більшим – продукції промислового виробництва, у якій при процесах технологічної обробки залишається мало вітамінів, антиоксидантів, біологічно активних речовин, мікроелементів, проте додаються не харчові інгредієнти – барвники, емульгатори тощо. Інтенсивні технології виробництва в землеробстві і тваринництві також при-

зводять до істотного зменшення необхідних інгредієнтів уже в самій природній сировині.

Основним методом захисту біологічних систем людини і харчових продуктів від окиснення є використання специфічних харчових добавок, або лікарських засобів, які гальмують цей процес. Антиоксиданти сповільнюють швидкість окиснення за багатьма механізмами: виступаючи в ролі вільнорадикальної пастки (перехоплення радикалів R•, RO•, ROO•, HO тощо), шляхом утворення хелатних комплексів з прооксидантними металами, гасінням синглетного кисню- та фотосенсибілізаторів, пригнічення продукування радикала NO•, дезактивацією пероксинітриду, а також інактивацією ліпоксигенази тощо [1].

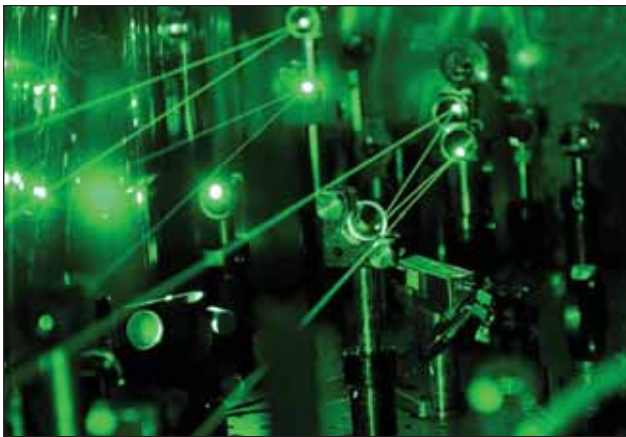
Антиоксидантна активність залежить від багатьох факторів, зокрема від

- природи біологічних компонентів (білки, жири, вуглеводи, амінокислоти, ліпіди тощо), концентрації антиоксидантів, температури, тиску кисню, наявності
- інших антиоксидантів, води, природи каталізаторів т.ін.

Актуальним є пошук надійних методів захисту від окиснення харчових продуктів, у яких головну роль відіграють природні антиоксиданти.

Метою статті є аналіз методів дослідження антиоксидантної активності природних, а також внутрішньоклітинних і синтетичних антиоксидантів.





Цілеспрямований пошук сполук із антиокислювальною здатністю передбачає вивчення їх на різних експериментальних моделях ініціювання вільнорадикального окиснення. Методи дослідження загальної антиокислювальної ємності (ТАС, від англ. *total antioxidant capacity*) різняться за типом джерела окиснення, окиснюваної сполуки й способу виміру її концентрації [1].

Способи вимірювання антиоксидантної активності поділяють, залежно від форми реєстрації, на методи оптичної спектроскопії (флуориметричні, хемілюмінесцентні, фотоколориметричні, спектральні), електрохімічні (амперометричні, вольтамперометричні, потенціометричні), специфічні – хроматографічні, титриметричні, методи біохімічного аналізу), електронний парамагнітний резонанс (ЕПР), ЕПР зі спіновими пастиками, мас-спектрометричні тощо. Усі методи мають переваги й недоліки.

Методи оптичної спектроскопії. Фотоколориметричні

Найчисленніші методи й модифікації методів, що загадуються в літературі, використовують фотометричну реєстрацію, імовірно, як найбільш зручну й доступну, наприклад, колориметричне визначення ТАС по окисненню кроцину [2]. Кроцин – барвник жовтих стручків плоду китайської рослини *Gardenia grandiflora*. Метод визначення ТАС з окисненням кроцину полягає в наступному. У кожну лунку планшети піпетують по 100 мкл кроцину і 50 мкл випробуваного зразка, розведеного у фосфатному буфері. Реакція ініціюється додаванням 100 мкл попередньо підігрітого до 37 ° С розчину 2,2-азобіс-(2-амідінопропан) гідрохлориду (ААРН, 5 мг/мл) і окиснення кроцину проводиться інкубацією планшети у вологому термостаті при 37 ° С протягом 60–75 хвилин. Контрольні лунки з кроцином, зразками і фосфатним буфером (по 100, 50 і 100 мкл, відповідно), інкубуються паралельно. Після інкубування вимірюється оптична густина при 450 нм. Специфічне поглинання визначається за формулою:

$L = 100 \times (D_0 - D_{a0a}) / D_0$, де D_0 – поглинання у відсутності антиоксидантів; D_{a0a} – поглинання в присутності антиоксидантів. Останні удосконалення цього методу дають змогу визначати антиокислювальну активність плазми крові людини.

Метод стандартизований по індивідуальній сполуці, у якості якої був використаний Тролокс (Trolox) – водорозчинний аналог вітаміну Е (6-гідрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбонова кислота) [3]. Структура сполуки наведена на рис. 1.

Стандартна крива щодо цієї сполуки попередньо будується у діапазоні концентрацій 0-10 мкг/мл. Дослідження показали, що істотний внесок у загальну ТАС зразків природних сполук вносять сечова кислота, білірубін, альбумін, незначний внесок припадає на частку аскорбінової кислоти й гемоглобіну [1]. ТАС не чутливий до процесів заморожування-розморожування зразків і дає стабільні результати при їх зберіганні за кімнатної температури до 4 годин. З'ясувалося, однак, що результати визначень занижені приблизно на 20 % у присутності лимонної кислоти. Числові показники ТАС за даним методом для плазми крові звичайних людей становлять у середньому $1,175 \pm 0,007$ мМ/л, у той час як дієта на збагаченій антиоксидантами їжі підвищує це значення вдвічі [4]. Надалі планується модифікація цього методу з метою диференціації впливу ендо- та екзогенних антиоксидантів. Метод придатний для оцінки антиоксидантної активності харчових продуктів.

Антиоксидантна активність у тканинах мозку була досліджена із Тролоксом у якості еквівалента (і названа ТЕАС – trolox equivalent antioxidant capacity), це є продовженням робіт, що використовують як основу метод окиснення кроцину [5]. Визначення антиоксидантної активності за методом ТАС засноване на оцінці загального відновного ефекту індивідуальних низькомолекулярних антиоксидантів, як гідрофільних, так і гідрофобних. Воно надає інформацію про типи антиоксидантів і їх концентрацій без точної якісної відмінності. Ці методи визначально засновані на моніторингу зміни кольору відносно до стандартної сполуки – Trolox.

Спосіб з окисненням дезоксірибози в системі, що генерує радикали, описаний авторами [6]. 2-Деоксірибоза окиснюється гідроксильними радикалами, утвореними в реакції Фентона, і розпадається до малонового діальдегіду. Розчин дослідного зразка у фосфатному буфері, 0,2 мл 10 мМ розчину 2-деоксірибози, 0,2 мл 0,1 мМ розчину комплексу $Fe_2^+ / EDTA$

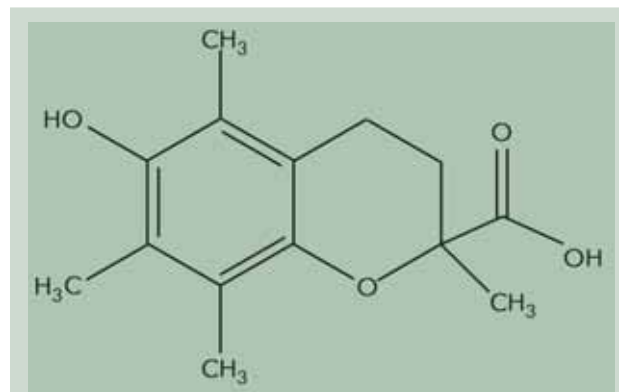
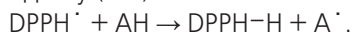


Рис. 1. Структурна формула Тролокса

й 0,2 мл 30% пероксиду Гідрогену змішували й додали 0,1 М фосфатним буфером (рН=7,4) до кінцевого об'єму 2 мл. Суміш витримували при 37 °С протягом 4-х годин. Після інкубації до реакційної суміші додавали 1 мл 2,8% розчину трихлороцтової кислоти та 1 мл 1% розчину тіобарбітурової кислоти в 50 мМ розчині NaOH. Суміш нагрівали 10 хв при 100 °С і охолоджували у льоді, після чого вимірювали оптичну густину при 532 нм.

Інший фотометричний спосіб ґрунтується на фотокolorиметрії залізотіоціанатних комплексів [7]. За цим способом зразок змішують із 0,12 мл метанолу, 2,88 мл 2,51% розчину лінолевої кислоти у 80%-му етанолі і доводять об'єм суміші 40 мМ фосфатним буфером (рН = 7,0) до 12 мл. Суміш витримують при 40 °С та через певні інтервали часу визначають концентрації гідропероксидів по залізотіоціанатному методу. Для цього до аліквоти суміші додають по 0,2 мл розчину 20 мМ FeCl₂ і 30% NH₄CNS і вимірюють оптичну густину при 500 нм [6]. При дослідженні антиоксидантної активності екстрактів часнику використовували комбінацію методів: окиснення дезоксирибози, залізотіоціанатний і так званий метод DPPH (2,2-дифеніл-1-пікрілгідразил, скор. ДФПГ, рис. 2) [6].

Одним із способів оцінки ТАС є colorиметрія вільних радикалів, заснована на реакції DPPH (C₁₈H₁₂N₅O₆, M = 394,33), розчиненого в метанолі, зі зразком антиоксиданту (АН) за схемою:



У результаті відновлення ДФПГ антиоксидантом знижується пурпурно-синє забарвлення ДФПГ у метанолі, а реакція контролюється по зміні оптичної густини при 514 нм звичайними методами спектрофотометрії.

Класичними методами оцінки антиоксидантної активності природних сполук є вивчення кінетики їх взаємодії із стабільними радикалами, насамперед, ДФПГ і 2,4,6-трифенілвердазілом (TPV.). Менш вживаними є стабільні феноксильні радикали. Із застосуванням ДФПГ отримана кількісна оцінка активності багатьох пасток вільних радикалів природного й синтетичного походження – флавоноїдів, α-токоферолів, галової кислоти, похідних фенілаланінів тощо. Перспективним є використання вердазилів (рис. 2) для оцінки антиоксидантної активності. 2,4,6-Трифенілвердазил – інтенсивно забарвлена сполука з максимумом поглинання у видимій області спектра (λ=720 нм).

Вивчення кінетики взаємодії TPV. з антиоксидантами, у структурі молекул яких присутні рухливі атоми Гідрогену, приводить до зниження оптичної густини TPV при 720 нм. Утворений при цьому лейковердазил – безбарвний. Цікавою особливістю вердазилу є те, що його катіон – також інтенсивно забарвлена сполука, яка має максимум поглинання при λ=540 нм. Тому вердазили є перспективними агентами для кількісної оцінки антиоксидантної активності сполук, механізм дії яких пов'язаний з переносом електрона (акцептори електрона). Метод ДФПГ найпоширеніший для оцінки антиоксидантної здатності сполук. Використовується

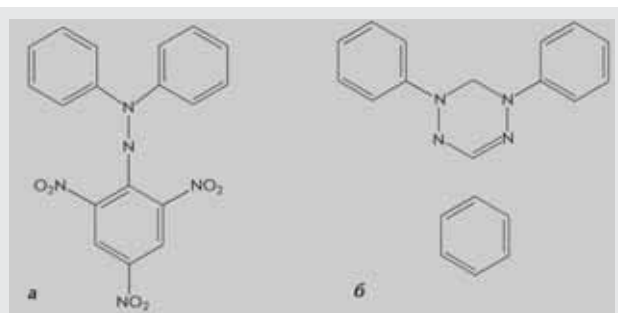


Рис. 2. Структурні формули ДФПГ (а) і трифенілвердазила (б)

також метод, який полягає у відновленні заліза антиоксидантами FRAP (від англ. ferric reducing antioxidant power), що дає змогу прямо визначити активність низькомолекулярних антиоксидантів [7]. При низьких рН відновлення Fe(III)–трипіридилтриазинового комплексу в Fe(II)–комплекс супроводжується появою інтенсивного блакитного забарвлення. Виміри засновані на здатності антиоксидантів пригнічувати окисний ефект активних часток, що генеруються у реакційній суміші. Цей метод відрізняється простотою, швидкістю й невеликими витратами при його використанні.

Загальну ТАС декількох популярних овочів і китайських трав оцінювали з використанням системи ABTS (2,2'-азино-біс(3-етилбензтіазоліно-6-сульфонова кислота))/H₂O₂/пероксидаза хрину на планшетному сканері. Серед протестованих овочів більшість показали наявність ТАС в цілому, а максимальну ТАС мають цукровий буряк і червона капуста [6]. При інкубуванні ABTS з пероксидазою і пероксидом Гідрогену утворюється відносно стабільний катіон-радикал ABTS^{•+} з максимумом поглинання 414 нм у спектрі електромагнітного випромінювання. У присутності антиоксидантів виявляється період індукції перед появою забарвлення. Низькомолекулярні антиоксиданти гальмують утворення кольору пропорційно своїй кількості. Метод швидкий, але найбільш дорогий з усіх вище розглянутих.

Іншим методом оцінки антиоксидантної активності є гальмування накопичення кінцевих молекулярних продуктів вільнорадикального окиснення. Для поліненасичених жирних кислот, що формують фосфоліпідні клітинні мембрани, таких як арахідонова та ліпоєва, такими сполуками є альдегіди та кетони. У більших кількостях звичайно накопичується малоновий діальдегід, концентрація якого використовується для оцінки швидкості протікання процесу. Простим методом кількісної оцінки концентрації малонового діальдегіду є його взаємодія з 2-тіобарбітуровою кислотою з утворенням забарвленого комплексу з максимумом поглинання λ=532 нм [8].

Для оцінки ступеня нейтралізації сполук – активних форм кисню, що відіграють ключову роль у серцево-судинних, запальних, онко-, нейродегенеративних захворюваннях [9], використовуються різні методи: вплив антиоксидантів на швидкість реакції аутоокис-



нення адреналіну в адрінохром ($\lambda=480$ нм), інгібування ксантинооксидазної реакції (по швидкості накопичення сечової кислоти спектрофотометрично при $\lambda=295$ нм), метод гальмування хемілюмінесценції люмінола.

Останнім часом відзначена істотна роль активних форм оксиду азоту NO^* у патології різних захворювань, наприклад, ішемії [9]. Взаємодія NO^* (у багатьох органах він необхідний для їхнього нормального функціонування) з пероксидними радикалами приводить до утворення реакційно здатного аніон-радикала пероксинітрила $\text{ONOO}^{\bullet-}$, який вражає значну кількість біологічних структур за рахунок реакцій окиснення та нітразування. Для оцінки антиоксидантних властивостей сполук використовують реакцію інгібування утворення активних форм оксиду азоту, наприклад, за допомогою аскорбінової кислоти, вимірюючи оптичну густину при $\lambda=265$ нм [10].

Флуориметричні методи

Метод визначення адсорбційної ємності по відношенню до оксигеновмісних радикалів ORAC (від англ. oxygen radical absorption capacity) є одним з найбільш вживаних у наш час [11]. Метод ґрунтується на вимірюванні інтенсивності флуоресценції визначеної сполуки (частіше флуоресцеїну) і її зміні від тривалості протікання реакції. У присутності сполук, які зв'язують оксигеновмісні радикали, збільшується час флуоресценції



внаслідок захисної дії антиоксидантів. Метод заснований на поглинанні оксигеновмісних радикалів (ORAC), – відносно простий і чутливий, але доволі тривалий (близько 95 хв на визначення) і вимагає наявності флуоресцентного детектора [11]. У цій системі 2,2'-азобіс-(2-амідинопропан) дигідрохлорид (AAPH) використовується в якості джерела пероксидних радикалів. Модифікацією цього методу є визначення TAC зразків по їхній здатності зв'язувати активні радикали, утворені за реакцією Фентона [12]. Зазначеним методом (ORAC) може бути визначена антиоксидантна активність як водорозчинних, так і жиророзчинних об'єктів, таких як харчові продукти, напої, хімікати, добавки, плазма й сироватка крові, сеча тощо [13]. При цьому практично не потрібно жодної попередньої пробопідготовки, за винятком того, що біологічні зразки перед визначенням повинні відповідним чином зберігатися.

Важливим завданням є оцінка антиоксидантного потенціалу овочів і фруктів, оскільки дієта з їхнім використанням допомагає захистити організм людини від патогенеза, спричиненого оксидативним стресом. Для цього застосовуються такі методи: ORAC, TEAC, TRAP (total radical trapping antioxidant parameter) [11, 13]. Антиоксидантні сполуки, які містяться в овочах і фруктах, можуть бути гетерогенними й багатофункціональними. На антиоксидантний потенціал впливає багато факторів, наприклад, взаємодія молекул з водною й ліпідною фазою, умови окиснення в клітині, природа субстрату, що окислюється тощо.

У роботі [14] запропонований швидкий метод оцінки антиоксидантної активності екстрактів фруктів і овочів безпосередньо в живих клітинах ссавців. Він полягає у використанні окиснення 2',7'-дихлорофлуоресцеїну ацетату (DCFH-DA) (індикатор реакційних сполук Оксигену) для визначення про- і антиоксидантної здатності індивідуальних сполук, а також фруктів і овочів. Метод дає змогу визначити антиоксидантну активність як гідрофільних, так і гідрофобних сполук. Було знайдено, що для індивідуальних сполук антиоксидантна активність знижується в ряду: кверцетин > кофеїнова кислота > галова кислота > α -токоферол, а для фруктових соків – у наступному порядку: полуниця > чорниця > ківі > персики [14].

Одержані дані добре узгоджуються з результатами аналізу цих сполук методом ORAC. Для соків броколі й моркви запропонованим методом визначений прооксидантний ефект, який зникає при кип'ятінні, у результаті чого відновлюються їх антиоксидантні властивості.

Кілька методів було використано для визначення в різних видах шоколаду (18 зразків) вмісту фенольних сполук і (+)-катехінів, а саме порушеного внутрішнього повного відбиття (ATR), ІЧ спектроскопія з Фур'є перетворенням (FTIR, 4000–550 cm^{-1}), ДФПГ, ORAC, ВЕРХ (високоєфективної рідинної хроматографії) з діодноматричним детектором (ВЕРХ-ДМД), використання реагенту Фоліна-Чокальтеу [15]. Більшість поліфенолів шоколаду належить до класу флавоноїдів,



що визначають високу антиоксидантну активність шоколаду порівняно із чорним і зеленим чаєм, а також червоним вином [15].

Аналіз за допомогою реагента Фоліна-Чокальтеу дає змогу визначити загальний вміст фенолів у зразку методом ВЕРХ з фотодіодним або флуоресцентним детектором, зокрема флаван-3-олів різного ступеня полімеризації. Традиційні хімічні методи потребують спеціального приготування зразків (36 годин) і аналітичні виміри тривають 30–120 хв. У цьому плані спектроскопія ATR-FTIR є перспективною для харчових напівфабрикатів і готових виробів, оскільки не передбачає спеціального приготування зразків, а тривалість виміру – менш 2 хв [15].

Висновки і перспективи

Найбільш поширеними, зручними і доступними методами оцінки антиоксидантної активності природних сполук, а також харчових продуктів, напоїв, специфічних харчових добавок, лікарських препаратів є фото- колориметричні, зокрема по окисненню кровина чи з використанням стабільних радикалів –ДФПГ і трифенілвердазила. Враховуючи, що антиоксидантна активність сполук залежить від багатьох факторів, зокрема від природи біологічних компонентів (вуглеводи, білки, жири, ліпіди тощо), концентрації і механізмів дії антиоксидантів, температури середовища, активності води, тиску кисню тощо проблематично визначити загальну ефективність їх дії. Антиоксидант може бути ефективним в одній системі, але мати протилежну дію в іншому. Тому в кожному конкретному випадку необхідно підбирати найзручніші та ефективні методи дослідження антиоксидантної ємності природних сполук.

Література

1. **Полумбрик М.О.** Природные антиоксиданты пищевых продуктов / М.О. Полумбрик, З.В. Ловкис, В.В. Литвяк, И.М. Почичкая, Л.В. Баль-Прилипка. Минск: Изд. Минфина, 2017. – 158 с.
2. **Bortolomeazzi R., Sebastianutto N., Toniolo R. et.al.** Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential // *Food Chem.* 2007. v. 100, p. 1481–1489.
3. **Lucio M., Nunes C., Gaspar D. et.al.** Antioxidant activity of vitamin E and Trolox: understanding of the factors that govern lipid peroxidation studies in vitro // *Food Biophys.* 2009. v. 4, p. 312–320.
4. **Harasym J., Oledzki R.** Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma // *Nutrition.* 2014. v. 30, p. 511–517.
5. **Chatterjee S., Poduval T.B., Tilak J.C. et.al.** A modified, economic, sensitive method for measuring total antioxidant capacities of human plasma and natural compounds using Indian saffron (*Crocus sativus*) // *Clin. Chim. Acta.* 2005. v. 352, p. 155–163.
6. **Choi I.S., Cha H.S., Lee Y.S.** Physicochemical and antioxidant properties of black garlic // *Molecules.* 2014. v. 19, p. 16811–16823.
7. **Nilsson J., Pillai D., Onning G. et. al.** Comparison of the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables // *Mol. Nutrition Food Res.* 2006. v. 49, p. 239–246.
8. **Papastergiadis A., Mubiru E., Van Langenhove H.** Malondialdehyde measurement in oxidized foods: evaluation of the spectrophotometric thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test in various foods // *J. Agric. Food Chem.* 2012. v. 38, p. 9589–9594.
9. **Zhang Y.J., Gan R.Y., Li S. et. al.** Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases // *Molecules.* 2011. v. 12, p. 21138–21156.
10. **Toth M., Kukor Z., Valent S.** Chemical stabilization of tetrahydrobiopterin by L-ascorbic acid: contribution to placental endothelial nitric oxide synthase activity // *Mol. Hum. Reprod.* 2002. v. 8, p. 271–280.
11. **Martin I., Aspee A., Torres P. et. al.** Influence of the target molecule on the oxygen radical absorbance capacity index: a comparison between alizarin red- and fluorescein-based methodologies // *J. Med. Food.* 2009. v. 12, p. 1386–1392.
12. **Aruoma A.** Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods // *Mutat. Res.* 2003. v. 523, p. 9–20.
13. **Amorati R., Valgimigli L.** Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants // *Free Radic. Res.* 2015. v. 49, p. 633–649.
14. **Trindade C., Bortolini G.V., Costa B.S. et. al.** Antimutagenic and antioxidant properties of the aqueous extracts of organic and conventional grapevine *Vitis labrusca* cv. Isabella leaves in V79 cells // *J. Toxicol. Environ. Health A.* 2016, 79, p. 825–836.
15. **Hu Y., Pan Z., Liao W. et. al.** Determination of antioxidant capacity and phenolic content of chocolate by attenuated total reflectance–Fourier transformed–infrared spectroscopy // *Food Chem.* 2016. v. 202, p. 254–261.