

УДК: 678.078+664.68



II. Хемілюмінесцентні і електрохімічні методи оцінки антиоксидантної активності природних сполук

М. ПОЛУМБРИК, * канд. техн. наук

Л. БАЛЬ-ПРИЛИПКО, ** доктор техн. наук

Х. ОМЕЛЬЧЕНКО, * ст.викладач

О.М. ПОЛУМБРИК * докт.хім.наук

* Національний університет харчових технологій

** Національний університет біоресурсів та природокористування

Анотація. В огляді наведено аналіз сучасних даних літератури та власних досліджень авторів щодо зручних і доступних хемілюмінесцентних і електрохімічних методів визначення антиоксидантної активності природних сполук, харчових продуктів, напоїв, екстрактів ягід, овочів і фруктів, лікарських трав, харчових волокон, ефірних масел прямих рослин тощо. Отримані дані слугують основою для раціонального застосування різноманітних природних сполук з метою захисту біологічних систем загалом і харчових продуктів зокрема, від процесів вільнорадикального окиснення.

Ключові слова: природні антиоксиданти, вільні радикали, механізм дії, стрес, методи дослідження

Загально прийнято вважати, що окиснення харчових продуктів, а також біологічних систем людини здійснюється за рахунок вільнорадикальних реакцій, в яких головну роль відіграє кисень, а також інші ендogenousні сполуки. Якщо для харчових продуктів наслідком окиснення є втрата харчової цінності, смакових якостей, утворення токсичних речовин, то для людини окисні процеси призводять до появи стресу. Стрес – природний фізіологічний стан, необхідний для нормальної життєдіяльності людини. Однак, надмірний довготривалий стрес, який характерний для населення сучасної України, призводить до низки захворювань, супроводжується утворенням високореакційних форм кисню, азоту, сірки, хлору тощо. Тому актуальним є пошук надійних методів захисту, від окиснення, де головну роль відіграють вітаміни і антиоксиданти харчових продуктів [1,2]. Антиоксиданти істотно гальмують процеси окиснення біологічних об'єктів організму людини, коли потужний внутрішньоклітинний антиоксидантний захист доповнюється позаклітинним. У процесі

захисної дії антиоксиданти поступово виводяться з організму і тому необхідно постійно відновлювати їх кількість за рахунок харчових продуктів чи фармпрепаратів.

Велику антиоксидантну активність проявляє мед і продукти бджільництва, а також речовини, що містять біологічно активні складові – женьшень, елеутерокок, лимонник, мумійо, хеномелес тощо. Потужним джерелом антиоксидантів є чай, кава, шоколад. У наш час біоантиоксиданти розглядаються як перспективні терапевтичні засоби для лікування багатьох хвороб.

Мета дослідження. Аналіз зручних і дешевих хемілюмінесцентних і електрохімічних методів дослідження антиоксидантної активності природних сполук для захисту біологічних систем людини і харчових продуктів від процесів вільнорадикального окиснення.

Об'єктами дослідження антиоксидантної активності слугували індивідуальні сполуки, зокрема аскорбінова, кофеїнова та лінолева кислоти, кверцетин, а також природні сполуки, екстракти ягід, фруктів і овочів, медичних зборів і трав, хміль, чай, кава, шоколад тощо. Синтетичні антиоксиданти, що являють собою просторово екрановані феноли – іонол, гідрокситолуол, трет-бутилгідроксисінол та інші – використовують у харчовій промисловості для захисту від окиснення ліпідів. Однак, з міркувань токсикологічної безпеки, вони поступово витісняються натуральними антиоксидантами. Для цілеспрямованого пошуку сполук з антиоксидантними



властивостями використовують різні експериментальні моделі ініціювання вільнорадикального окиснення [2].

Нижче розглянуті зручні, доступні і досить чутливі фізико-хімічні методи вимірювання антиоксидантної активності – хемілюмінесцентні і електрохімічні.

Хемілюмінесцентні методи

У частині цих методів використовують хемілюмінесцентні реакції за участю пероксиду Гідрогена з пероксидазою з коріня хрину та із залізом (II), але, зважаючи на нестабільність пероксиду, який розкладається на повітрі, найбільше поширення одержали методи, засновані на хемілюмінесцентній реакції між люмінолом та ААРН (2,2'-азобіс(2-амінопропан)дигідрохлорид), що розкладається при нагріванні на два вільні радикали [3]. При цьому інтенсивність хемілюмінесценції є мірою кількості радикалів. При введенні в систему антиоксидантів кількість радикалів зменшується, а разом із цим падає й інтенсивність хемілюмінесценції.

Метод гасіння хемілюмінесценції використовується для оцінки антиоксидантних властивостей біологічних об'єктів. Хімічні мітки, здатні до люмінесценції, приєднуються до фрагментів біополімерів, дозволяючи визначити концентрацію речовини з точністю до пікомоль. Цей метод застосовується для вивчення структури ДНК і РНК. Існує кілька варіантів цієї методики, що дозволяють різними способами визначати кількість антиоксиданту, однак усі вони розроблені для лужних середовищ (рН 8-10), що непридатне для аналізу таких біологічних об'єктів, як сироватка крові [1]. При хемілюмінесцентному визначенні антиоксидантів використовують параметри TRAP (total reactive antioxidant potential – загальна потенційна активність антиоксиданту) і метод TAR (total antioxidant reactivity – загальна антиоксидантна активність) [1]. Вважається, що TRAP відображає кількість антиоксиданта в системі, а TAR – його активність, іншими словами швидкість взаємодії антиоксиданта з радикалами. Обидва ці підходи були використані для аналізу біологічних об'єктів і харчових продуктів, коли невідомі антиоксиданти, що входять до складу даних об'єктів, їх концентрація і активність кожного з них.

TRAP заснований на вимірюванні латентного періоду (періоду часу, протягом якого не спостерігається світіння

хемілюмінесценції), що виникає в результаті додавання антиоксиданту, а в основі TAR лежить вимірювання зниження інтенсивності хемілюмінесценції при додаванні досліджуваного антиоксиданту в систему. Кінцеві чисельні значення величин виражаються в еквівалентах тролокса. Тролокс у даний час прийнятий за стандарт для оцінки антиоксидантної активності і його активність умовно приймається за одиницю, а антиоксидантна активність досліджуваної речовини виражається в еквівалентних молях тролокса на масу зразка (мкмоль/мг) [2].

Принцип методу полягає у визначенні параметрів хемі- або біолюмінесценції, що виникає в результаті реакції диспропорціонування пероксидних радикалів: $RO_2^{\cdot} + RO_2^{\cdot} \rightarrow nh\nu + \text{молекулярні продукти}$. Антиоксиданти, що реагують з пероксидними радикалами, знижують інтенсивність хемілюмінесценції пропорційно квадрату їх концентрації.

Відомий швидкий і досить простий альтернативний метод визначення антиоксидантної активності, що включає генерування активних радикалів акустичною кавітацією в рідинах і хемілюмінесценцію люмінола [4]. Вода і молекули кисню при опроміюванні ультразвуковими хвилями високої інтенсивності розкладаються з утворенням активних радикалів $O_2^{\cdot-}$, H^{\cdot} , HO_2^{\cdot} , OH^{\cdot} . Вивчені антиоксидантні властивості сечової, аскорбінової, дубильних кислот, лимонної і саліцилової, L-цистеїну, глутатіону, сорбола. Найбільш сильні антиоксиданти - сечова і аскорбінова кислоти, а сорбол - найслабший. Проаналізовано також антиоксидантну активність шести екстрактів овочів (картоплі, цибулі, капусти, моркви, огірка і шпинату). Встановлено, що антиоксидантна активність падає в ряду шпинат > капуста > морква > картопля > цибуля > огірки [4].

Методом хемілюмінесценції в системі Со (II) – етилендіамінтетраацетат люмінол вивчено дію чотирьох відомих антиоксидантів (кверцетин, аскорбінова кислота, катехін і кавова кислота) і їх сумішей, взятих при різних концентраціях, з метою визначення прооксидантної і синергічної активності [5]. Суміш кверцетину і аскорбінової кислоти в співвідношенні 2:1 мала найбільш виражену антиоксидантну дію, в той час як кверцетин і кавова кислота в співвідношенні 1:2 показали найменшу антиоксидантну активність, і отже, потенційно ця композиція може проявляти прооксидантні властивості. З використанням мас-спектроскопії показано, що в суміші кверцетину та аскорбінової кислоти велика частина



кверцетину не окиснюється на відміну від суміші кверцетину з кавовою кислотою. Цей факт свідчить про сильну антиоксидантну активність першої суміші внаслідок ефективної рециклізації кверцетину в реакції відновлення хінону аскорбіновою кислотою [5].

Розроблено новий чутливий і простий метод оцінки антиоксидантної активності водних розчинів 15 екстрактів овочів і фруктів з використанням хемілюмінесцентної реакції 9-бензилакридина з калій супероксидом. Знайдено, що антиоксидантна активність фруктових екстрактів майже на порядок вища, ніж екстрактів овочів. Найвищу активність мають грейпфрути, а найнижчу – груші [6]. Сильну антиоксидантну активність в концентраціях 10⁻⁵-10⁻³ моль /л по відношенню до супероксидних радикалів проявляють кумаринова, хлорогенова, кавова, ванілінова і аскорбінова кислоти, а також (±) - катехін, і тролокс, взятий у якості стандарту [6]. Розраховані антиоксидантні активності фруктових та овочевих екстрактів, отримані цим методом, були порівняні з результатами, одержаними методами ORAC (oxygen radical absorption capacity), DPPH (ДФПГ) і TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) і виявилися набагато вищими. Це пов'язано, очевидно, із присутністю ензиму супероксид дисмутази у фруктових екстрактах, який є високоефективною пасткою для супероксид аніон радикала [6].

L-ерготіонеїн є природним антиоксидантом, що синтезується лише цвіллю і мікобактеріями. В організмах ссавців і людей він міститься в червоних кров'яних тільцях. Цей антиоксидант здатний ефективно захищати еритроцити від руйнування. Він є перспективним, безпечним і ефективним антиоксидантом, який також може бути корисний для профілактики різних захворювань, пов'язаних зі стресом. З моменту відкриття ерготіонеїну були розроблені численні методи для його виявлення та кількісного визначення в біологічних зразках. [7].

Проведено оцінку вмісту біологічно активних речовин (поліфенолів і аскорбінової кислоти) і харчових волокон, що визначають антиоксидантні властивості найбільш часто вживаних фруктів і ягід (яблука, банани, персики, груші, світлі і червоні грейпфрути, памело, апельсини, лимони, червоні сливи, білий виноград, манго, хурма і полуниця), вирощених в одних і тих же географічних і кліматичних умовах, і порівнювався їх вміст по відношенню до ківі [8]. Внесок харчових волокон в антиоксидантну активність плодів мінімальний, аскорбінової кислоти - помірний. Встановлено, що полуниця і ківі мають найвищий вміст фенольних сполук, а антиоксидантні властивості змінювалися наступним чином: червоні сливи > манго > білий виноград ≥ хурма > яблука > груші ≥ червоний грейпфрут > лимони = апельсини = жовті грейпфрути ≥ памело > банани > персики [8].

Електрохімічні методи

Електрохімічні методи базуються на вимірюванні електричних параметрів електрохімічних явищ, що виникають в досліджуваному розчині.

У даний час використовують різні електрохімічні ме-

тоди для оцінки антиоксидантної активності харчових продуктів. Одні застосовуються для реєстрації певної сполуки, від концентрації якої залежить перебіг окисного процесу. Інші – для вимірювання безпосередньо окисно-відновних потенціалів. Вказується, що ці параметри в цілому корелюють із загальною антиоксидантною ємністю і можуть бути використані для її оцінки.

Амперометричне детектування полягає у вимірюванні електричного струму в комірці, що виникає при окисненні (відновленні) аналізованої речовини на поверхні робочого електрода при подачі на нього певного потенціалу. Таким чином, при застосуванні амперометричного детектування реєструється зміна струму, що протікає через комірку, обумовлена зміною концентрації аналізованої речовини. Чутливість амперометричного детектора дуже висока через низькі шуми. Як матеріал робочого електрода використовується склоуглець, який найбільш універсальний при аналізі поліфенольних сполук.

Для визначення фенольних сполук у вині був запропонований простий електрохімічний датчик на основі поліфенолоксидази [9]. Досліджено вплив компонентів матриці зразка на реакцію датчика. В якості стандартної речовини використовували галову кислоту [9].



Амперометричним методом виміряно сумарний вміст антиоксидантів фенольного типу в свіжих соках деяких ягід (обліпихи, чорниці, малини, винограду і чорної смородини), фруктів (апельсина, грейпфрута, граната, яблука, персика і сливи) і овочів (моркви, буряка, капусти, томату, червоного болгарського перцю, баклажана) [10]. Визначено вміст антиоксидантів в їх сумішах, в тому числі після процесів заморозки-розморозки, а також після розведення соків [10].

Амперометричним методом визначено сумарний вміст антиоксидантів в екстрактах лікарських трав, чаї, каві, винах, коньяках, бальзамах, пиві, овочах, фруктах, ягодах.

Для одночасного визначення шести антиоксидантів у фруктах і овочах застосовували поєднання методів капілярного зонного електрофорезу і амперометричного детектування на електроді (Е), хімічно модифікованому новим типом вітаміна В₁₂ [11]. Для глутатіону, аскорбінової, ванілінової, хлорогенової, саліцилової і кавової



кислот відгуки були в 5 разів вищі в порівнянні з тими, що спостерігалися на звичайному вугільному дисковому E. В оптимальних умовах зразки повністю розділялися за 15 хв в борат-фосфатному буфері з pH 8,4. Градувальні графіки лінійні в області концентрацій аналітів 0,25-100 μM з межами виявлення на рівні 10 μM [11].

Розроблено простий і швидкий електрохімічний метод вимірювання антиоксидантної активності, заснований на окисненні ABTS (2,2'-азіно-біс(3-етилбензотіазоліно-6-сульфонової кислоти) [12]. Метод вимагає часу і вимірювання тільки коефіцієнта поглинання. Порівняно із загальноприйнятими методами оцінки антиоксидантної активності він дає такі ж результати, але відрізняється кращою відтворюваністю. Показано, що дані по визначенню антиоксидантної активності корелюють із вмістом поліфенольних сполук у винах, бренді і винному оцеті [12].

Квітки календули є комерційно цінним джерелом лютеїну - потужного антиоксиданта, що підвищує ефективність роботи мозку і зору. Електроокислення і визначення лютеїну було досліджено методом електрохімічного аналізу в різних середовищах. Метод є селективним для визначення лютеїну і його ефірів. За допомогою диференціальної імпульсної вольтамперометрії встановлено, що анодні струми лютеїну лінійно залежать від його концентрації в діапазоні 0.5-76 μM , а межа виявлення становить 0,1 μM . Метод характеризується високою чутливістю і відтворюваністю [13].

Вольтамперометрія – метод аналізу, заснований на дослідженні залежності струму поляризації від напруги, що прикладається до електрохімічної комірки, коли

електричний потенціал робочого електрода значно відрізняється від рівноважного значення. Вольтамперометричне визначення активності антиоксидантів засноване на вимірюванні вольтамперометричної характеристики катодного відновлення кисню.

Електрохімічні методи практичні, відрізняються низькою вартістю і дуже корисні для оцінки антиоксидувальних властивостей, наприклад, зразків кави. Вольтамперометричний профіль усіх зразків кави дуже схожий [14].

Електрохімічний метод використаний для визначення антиоксидантної активності фенольних сполук (карданол, кардол і трет-бутиловий карданол), отриманих з горіха кеш'ю. Найкращі результати показав кардол, а карданол і трет-бутилкарданол – менш ефективні [15]. Очевидно, присутність електронодонорної трет-бутильної і гідроксильної груп позитивно впливає на антиоксидантну активність. Вивчені фенольні сполуки перспективні як ефективні інгібітори окиснення біопалива [15].

Екстракти хмелю, отримані безпосередньо із шроту і шишок, вивчені циклічною вольтамперометрією, спектрофотометрично, ІЧ-Фур'є і ГХ-МС (газовою хроматографією з мас-спектроскопією) методами [16]. Хміль відіграє ключову роль у якості пива, формуючи аромат, колір, піну і стійкість під час зберігання. Хміль має терапевтичні (седативні і діуретичні, антимікробні) властивості і широко використовується в медицині. Хміль містить понад 1000 різних хімічних речовин, що мають антиоксидантні властивості, такі як флавоноїди, масла, кислоти, поліфеноли. На основі вивчення циклічних і імпульсних вольтамперограм зроблено висновок про те, що в екстракті хмелевого шроту антиоксидантна активність вища. Таким чином, метод технологічної обробки відіграє визначальну роль для антиоксидантної активності. Екстракт хмелевого шроту порівняно з екстрактом хмельових шишок містить менше фенольних сполук, але більшу кількість хлорофілу. Екстракти хмелю мають великий антиоксидантний потенціал і перспективні як акцептори вільних радикалів і активних форм кисню [16].

Зроблено висновок про те, що циклічна і диференціальна імпульсна вольтамперометрія є швидшими аналітичними методами, ніж хроматографічні.

Потенціометрія заснована на вимірі різниці електричних потенціалів, що виникають між різними електродами, зануреними в розчин з обумовленою речовиною. Електричний потенціал виникає на електродах при проходженні на них окисно-відновної (електрохімічної) реакції.

Визначення антиоксидантних властивостей розчинів запропонованим потенціометричним методом базується на хімічній взаємодії антиоксидантів з медіаторною системою, в якості якої використовується суміш $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ / $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Додавання розчинів, що містять речовини, які проявляють антиоксидантну активність, в електрохімічну комірку призводить до зміни окисно-відновного потенціалу середовища в результаті взаємодії антиоксидантів з окисненим компонентом ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) медіаторної системи.



Для запобігання негативного впливу гідроксильних радикалів на якість водних напоїв широко застосовуються антиоксиданти. Оцінена загальна антиоксидантна ємність п'яти натуральних антиоксидантів: аскорбінової, кавової, кумаринової і галової кислот, а також ресвератрола [17]. Найкращі результати отримані для аскорбінової кислоти. Виявлено, що метод, який включає біосенсори з пуриновою основою в комбінації з електроаналітичним обладнанням, є швидким і легким для визначення загальної антиоксидантної ємності в напоях [17].

Представлений спосіб швидкого електрохімічного скринінгу антиоксидантної ємності RESAC (rapid antioxidant screening of antioxidant capacity) різних сортів чаю [18]. Процедура методу RESAC включає використання високоефективної рідинної хроматографії з електрохімічним детектором. Метод RESAC простий, займає мало часу і недорогий. Він перспективний для вивчення загальної антиоксидантної ємності в процесах зберігання і переробки харчових продуктів. Отримані методом RESAC результати добре корелюють з даними, одержаними іншими методами, такими як TRAP (0,9457) і ДФПГ (0,9511) [18].

Висновки і перспективи

Для цілеспрямованого пошуку природних сполук з антиоксидантними властивостями перспективні хемілюмінесцентні і електрохімічні методи. Вони характеризуються доступністю, зручністю, великою чутливістю, швидкістю і задовільною відтворюваністю.

Література

1. **Полумбрик М.О.** Природные антиоксиданты пищевых продуктов [Текст] / М.О. Полумбрик, З.В. Ловкис, В.В. Литвяк, И.М. Почицкая, Л.В. Баль-Прилипко. Минск: Изд-во Минфина, 2017. – 158 с.
2. **Полумбрик М.О., Омельченко Х.В., Баль-Прилипко Л.В., Пасічний В.М., Полумбрик О.М.** Методи оцінки антиоксидантної активності природних сполук Біоресурси і природокористування, 2017, № 1, с.
3. **Rose A.L., Waite T.D.** Chemiluminescence of luminol in the presence of iron(II) and oxygen: oxidation mechanism and implications for its analytical use // *Anal. Chem.* 2001. v. 24, p. 5909–5920.
4. **Nie Y.C., Chen J.Y., Yan Y.et.al.** Flow-sonochemiluminescence method for antioxidant capacity analysis // *Food Chem.* 2010. v. 122, p. 360–365. .
5. **Choueiri L., Chedea V., Calokerinos A.** Antioxidant/pro-oxidant properties of model phenolic compounds. Part II: Studies on mixtures of polyphenols at different molar ratios by chemiluminescence and LC-MS // *Food Chem.* 2012. v. 133, p. 1039–1044.
6. **Triantisa T., Stelakisb A., Dimotikalib D.** et.al. Investigations on the antioxidant activity of fruit and vegetable aqueous extracts on superoxide radical anion using chemiluminescence techniques // *Anal. Chim. Acta.* 2005. v. 536, p. 101–105.
7. **Nguyen H., Nagasaka R., Ohshima T.** The natural antioxidant ergothioneine: resources, chemical

- characterization, and applications // *Challeng. Food Systems.* 2013, P. 381–415.
8. **Parka Y.S., Imb M.E., Hamc K.S.** et.al. Quantitative assessment of the main antioxidant compounds, antioxidant activities and FTIR spectra from commonly consumed fruits, compared to standard kiwi fruit // *LWT – Food Sci. Technol.* 2015. v. 63, p. 346–352.
 9. **Adamski J., Kochana J., Nowak P.** et.al. On the electrochemical biosensing of phenolic compounds in wines // *J. Food Compos. Anal.* 2016. v. 46, p. 1–6.
 10. **Мисин В. М., Сажина Н. Н., Завьялов А. Ю.** Суммарное содержание антиоксидантов фенольного типа в смесях соков ягод, фруктов и овощей // *Пиво и напитки.* 2009, № 4, с. 48–51.
 11. **Shuqing D., Langzhu C, Pingang H.** et.al. Simultaneous determination of antioxidants at a chemically modified electrode with vitamin B12 by capillary zone electrophoresis coupled with amperometric detection // *Talanta.* 2009. v. 80, p. 809–814.
 12. **Angeles A.M., Guillen D.A., Barroso C.G.** Development of an electrochemical method for the determination of antioxidant activity. Application to grape-derived products // *Eur. Food Res. Technol.* 2003. v. 216, p. 445–448.
 13. **Yue Y., Liang Q., Liao Y.** et.al. Electrooxidation behavior and electrochemistry determination method of the xanthophylls: Lutein in nonaqueous media // *J. Electroanal. Chem.* 2012. v. 682, p. 90–94.
 14. **Neto J.R., Rezende S.G., de Fatima C.** et.al. Electrochemical behavior and determination of major phenolic antioxidants in selected coffee samples // *Food Chem.* 2016. v. 190, p. 506–512.
 15. **Nogueira F.J., Wirley M.F., Ribeiro P.** et.al. Evaluation of antioxidant action by electrochemical and accelerated oxidation experiments of phenolic compounds derived from cashew nut shell liquid // *Ind. Crops Prod.* 2015. v. 67, p. 281–286.
 16. **Masek A., Chrzescijanska E., Kosmalska A.** et.al. Characteristics of compounds in hops using cyclic voltammetry, UV-VIS, FTIR and GC-MS analysis // *Food Chem.* 2014. v. 156, p. 353–361.
 17. **Barroso M.F., C. Delerue-Matosa M.B., Oliveira P.P.** Electrochemical evaluation of total antioxidant capacity of beverages using a purine-biosensor // *Food Chem.* 2012. v. 132, p. 1055–1062.
 18. **Andlauer W., Heritier J.** Rapid electrochemical screening of antioxidant capacity (RESAC) of selected tea samples // *Food Chem.* 2011. v. 125, p. 1517–1520.

