

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ОЦЕНКИ ОБЩЕЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ СЕМЯН

Поздняков В.В., Василенко А.А.

Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева НААН, Украина

В статье рассмотрены наиболее распространённые тест-системы проведения анализа общей антиоксидантной активности, используемые в настоящее время, дана краткая оценка присущих им недостатков, приведены основные требования к проведению анализа общей антиоксидантной активности семян зерновых и масличных культур. Представлен протокол проведения анализа антирадикальной активности семян с использованием стабильного радикала DPPH•.

Ключевые слова: антиоксидант, общая антиоксидантная активность (ОАА), тест-системы, DPPH•, ход проведения анализа

Введение. В последние годы все большее внимание исследователей обращено к проблеме повышения качества продуктов питания, в том числе и к методикам по определению антиоксидантных свойств, т.е. наличию в достаточном количестве витаминов С и Е, каротиноидов и многочисленных фенольных компонентов.

Анализ литературных источников, постановка проблемы. В живых организмах присутствует огромное количество самых разнообразных антиоксидантов, относящихся к разным классам химических соединений, способных в небольших количествах (по сравнению с количеством окисляемых субстратов) значительно замедлять или ингибировать скорость окисления этих субстратов [1].

Им присуща одна отличительная черта – все они являются донорами атомов водорода и электронов и поэтому участвуют в окислительно-восстановительных реакциях. В избытке они подавляют образование свободных радикалов в живых организмах, проявляя антиоксидантные свойства. Но многие антиоксиданты в низких концентрациях способны инициировать свободнорадикальные процессы (проявляя при этом прооксидантные свойства).

В связи с этим возникла необходимость количественно оценить антиоксидантные свойства различных продуктов питания и прогнозировать их влияние здоровье человека. Для этого разработано много различных методов определения антиоксидантной функции, основанных на использовании различных индукторов свободных радикалов и разных механизмах их действия [2, 3]. В различных методах определяются либо отдельные антиокислительные компоненты (например, количественный и изомерный состав витамина Е, содержание аскорбиновой кислоты и т.д.), либо общая антиокислительная активность (ОАА) биообъектов. По мнению многих исследователей, определение концентрации отдельного соединения, обладающего свойствами антиокислителя, часто менее информативно по сравнению с определением ОАА.

Многообразие протекающих в природе свободнорадикальных процессов делает маловероятным существование единого универсального метода для оценки антиокислительной активности соединений, а также возможность корректного сравнения результатов, полученных разными методами в разных лабораториях. Имеет значение, определяется ли антиокислительная активность соединения (или группы соединений), применяемого для стабилизации химических продуктов и полимеров, в исследованиях *in vitro*, или исследуется влияние антиоксидантов на процессы, протекающие в живой клетке *in vivo*.

В результате каждый исследователь выбирает готовые, создает новые или модифицирует уже известные методы, исходя из своих целей и возможностей.

В настоящее время доминирует представление о необходимости одновременного использования нескольких методов тестирования антиоксидантной активности *in vitro* для всесторонней оценки антиоксидантной эффективности [4]. В литературе накоплено много данных, свидетельствующих о синергизме между гидрофобными и гидрофильными системами антиоксидантов, поэтому, по возможности, следует проводить исследования этих систем параллельно [5, 6].

Антиоксиданты можно условно разделить на две большие группы: превентивные антиоксиданты и антиоксиданты, способные обрывать цепные реакции. В первую группу входят соединения, способные образовывать хелатные комплексы с ионами переходных металлов (Fe, Cu, Mn, Zn, Co и др.), такие как металлотионеин, нейромеланин, трансферрин, осуществляя их хранение и транспорт в органах и тканях, а также антиоксидантные ферменты (каталаза, супероксиддисмутаза, глутатион редуктаза, пероксидазы и др.). Ко второй группе относятся соединения, способные нейтрализовать свободные радикалы и препятствовать развитию свободно-радикальных цепных реакций. Наиболее значимыми представителями этой группы являются витамины С и Е, каротиноиды и полифенолы [4, 7, 8].

Продукты растительного происхождения обеспечивают большое разнообразие необходимых антиоксидантов, суммарные и синергические свойства которых вместе с другими существенными компонентами пищи (например, минералы, пищевые волокна и др.) оказывают благотворное влияние на здоровье человека. Наиболее известным примером синергического взаимодействия антиоксидантов является пара витаминов С и Е.

Вследствие многообразия комплекса антиоксидантов изучение отдельных антиоксидантных соединений является дорогостоящим и может иметь ограниченное значение, так как при этом не учитываются возможные синергические взаимодействия между самими антиоксидантными компонентами. Поэтому при изучении антиоксидантных свойств продуктов питания и различных диет больше внимания уделяют оценке ОАА, а не отдельным компонентам. Кроме того, очень важно, чтобы антиоксиданты могли в процессе пищеварения попасть в достаточном количестве из пищи в органы-мишени, например, α -токоферол – в печень, γ -токоферол – в кожные покровы, β -каротин – в жировую ткань и кожу, в которой проявляет защитную активность от солнечных лучей. Таким образом, их состав в организме человека может сильно отличаться в количественном и качественном отношении от состава экстрактов, получаемых с помощью различных экстрагирующих растворов в ходе выполнения лабораторных анализов [9].

Оптимальный метод определения антиоксидантной активности должен соответствовать определенным требованиям:

1. Очевидный физический смысл определяемого параметра. Для выполнения этого требования необходимо, чтобы определение было основано на хорошо разработанной теории, которая, в свою очередь, требует, чтобы процессы, происходящие в тестирующей системе, были детально известны и описаны определенной кинетической схемой.

2. Воспроизводимость результатов измерений не только в отдельной работе, но также и возможность повторения этого определения в любой другой лаборатории. Это требование может быть выполнено, прежде всего, благодаря использованию достаточно простых аналитических тест-систем и наличием в продаже коммерческих препаратов необходимой чистоты. Кроме того, результаты определений должны быть независимыми от изменений в условиях проведения эксперимента (например, температура растворов).

3. Непрерывный контроль, делающий возможным автоматизировать определение и получать хорошие кинетические данные о функционировании антиоксидантов, содержащихся в тестируемых образцах. Методы, позволяющие осуществлять непрерывный контроль, являются более предпочтительными, чем методы, в которых предусматривается отбор повторностей.

4. Достаточно высокая производительность выполнения рутинных анализов. Это требование не обязательно при проведении фундаментальных научных исследований.

5. Относительная простота процедуры, чтобы можно было проводить определение в любой лаборатории, специализирующейся в области химии продуктов питания и смежных областях [10].

Для определения ОАА, предотвращающей развитие цепных реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ), используют два подхода: прямой и опосредованный. При использовании опосредованного подхода наиболее часто изучают способность антиоксиданта нейтрализовать некоторые свободные радикалы, которые никак не связаны с реально идущими в природе процессами окислительного распада, или эффектами переходных металлов. Например, часто используют некоторые стабильные окрашенные свободные радикалы, растворы которых способны активно поглощать в видимом диапазоне. В этом случае мы вместо определения способности ОАА предотвращать развитие цепных реакций оцениваем их способность генерировать активные ионы водорода. Строго говоря, это не совсем корректно, хотя зачастую эти показатели хорошо коррелируют друг с другом. В целом, исследователи отмечают низкую корреляцию результатов определения ОАА в природных продуктах, полученных в разных исследованиях с применением разных методов. Обычно они плохо воспроизводимы, в первую очередь из-за того, что природные продукты плохо воспроизводимы в принципе (влияние сорта, абиотических факторов, климатических особенностей вегетационного периода и т.д.). Несмотря на это, непрямые методы оценки ОАА используются чаще, чем прямые методы. Каждый из методов имеет свои характерные особенности, недостатки и преимущества [11, 12, 13].

Прямые методы более адекватны в принципе, особенно это касается методов, основанных на хорошо изученной модели протекания процессов, контролирующих развитие цепных реакций. Кроме того, они обычно более чувствительны. Однако существенным недостатком этих методов является присущая им большая длительность проведения измерений и необходимость наличия квалифицированных аналитиков для установления кинетических параметров реакций. Поэтому, прямые методы определения ОАА плохо приспособлены для проведения рутинных анализов природных продуктов и контролем селекционного материала на разных этапах селекции, сопровождаемым большим количеством промежуточных образцов и форм [3, 4, 19].

Следует подчеркнуть, что существует отличие между понятиями «антирадикальная» и «антиоксидантная» активность и они зачастую не совпадают. В литературе встречаются различные термины: антиоксидантные свойства биообразцов называют антиоксидантной активностью, антиоксидантной способностью [14, 15], антиоксидантной мощностью [16] или антиоксидантным потенциалом [17]. Антиоксидантная активность имеет дело с кинетиками реакции между антиоксидантом и прооксидантом или радикалом, которые он восстанавливает или нейтрализует. В то же время, антиоксидантная способность определяет термодинамическую эффективность превращения окисленной пробы при реакции с антиоксидантом. Антирадикальная активность характеризуется способностью компонента реагировать со свободными радикалами [18], а антиоксидантная активность отражает способность ингибировать в целом процессы окисления (которые обычно, по крайней мере в отношении липидов, включают в себя несколько различных реакций).

Следовательно, все тест-системы, использующие стабильные радикалы, дают информацию о нейтрализации радикалов, т.е. об антирадикальной активности. Для получения информации о действительной антиоксидантной активности в отношении липидов или стабильности продуктов питания, необходимо проводить исследования непосредственно на самих продуктах (растительных маслах, липопротеинах и др.), а не в модельных тест-системах с использованием экстрактов из этих продуктов [19]. Это особенно важно для проведения тестов в условиях *in vivo*, в которых результаты будут зависеть также от ряда дополнительных факторов, таких как абсорбция, превращения метаболитов, наличие конкурирующих ферментов и других антиоксидантов и прооксидантов.

Химическое разнообразие природных антиоксидантов (а также избыток их гликозидов и изомеров) затрудняет разделение, детекцию и количественное определение индивидуальных антиоксидантов в сложных биопробах и продуктах питания. Более того,

общая антиоксидантная активность часто более информативна для оценки общеоздоровительных эффектов продуктов питания в связи с кооперативным действием отдельных видов антиоксидантов. В настоящее время наиболее популярны методы оценки антиоксидантной активности, основанные на ингибировании окисления различных липидных субстратов с последующим определением продуктов окисления. Соответствующие методики длительны и дают плохо воспроизводимые результаты, поэтому разработка новых методик, сочетающих экспрессность с достоверностью и высокой воспроизводимостью данных, остается актуальной задачей.

Разработано большое количество различных методов определения антиоксидантной способности/активности биообразцов, которые можно классифицировать по типу реакции на две большие группы:

- 1) методы, основанные на реакции переноса атома водорода;
- 2) методы, основанные на переносе электронов.

Среди методов первой группы наиболее часто применяются тест-системы **ORAC** (oxygen radical absorbance capacity), **TRAP** (total peroxyl radical-trapping antioxidant parameter), использующий R – фикоэритрин как флуоресцентную метку, метод обесцвечивания кроацина с использованием генератора радикалов AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride) и метод обесцвечивания β -каротина [2, 3].

В большинстве методов, основанных на переносе электронов, действие антиоксиданта тестируется специально подобранными окислителями, а именно, антиоксиданты вместо пероксидного радикала реагируют с флуоресцентным или окрашенным соединением (окисляющие агенты). Спектрофотометрические методы позволяют измерять антиоксидантную способность по изменению интенсивности окраски растворов, коррелирующей с концентрацией антиоксиданта в пробе. В тест-системах с использованием красителей ABTS (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) и DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) измеряется уменьшение оптической плотности растворов, а в методах с использованием реактива Фолина-Чиокалтеу, FRAP (ferric reducing/antioxidant power) или CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity) – увеличение оптической плотности растворов. С целью повышения чувствительности метода при относительно небольшой стоимости анализа был разработан достаточно простой метод с использованием лиганда феррозина, который при окислении антиоксидантов ионами Fe^{3+} образует окрашенный комплекс с очень высокой удельной оптической плотностью [20].

До настоящего времени широко используются методы оценки антиоксидантной активности, основанные на ингибировании окисления различных липидных субстратов с последующим определением продуктов окисления, имитируя поведение антиоксидантов *in vivo*. Соответствующие методики длительны и дают плохо воспроизводимые результаты, поэтому разработка новых, сочетающих экспрессивность с достоверностью и высокой воспроизводимостью данных, остается актуальной задачей.

Одним из наиболее удачных, распространенных непрямых методов оценки ОАА является метод с использованием свободного радикала DPPH•. Еще в 1950-е годы этот метод был предложен для обнаружения доноров протона в природных материалах, впоследствии был модифицирован для количественной оценки антиоксидантного потенциала, как отдельных фенолов, так и продуктов питания и других биообъектов. DPPH• достаточно избирателен и не реагирует с флавоноидами, не содержащими гидроксильных групп в В-кольце [21], а также с ароматическими кислотами, содержащими только одну гидроксильную группу [22].

Метод основан на способности стабильного свободного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразида (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl – DPPH•) реагировать с донорами протонов, включая фенолы. Поскольку это соединение обладает очень интенсивным светопоглощением в видимой области спектра (с пиком в диапазоне 514–517 нм), его концентрация в растворе может быть количественно определена на спектрофотометре. После стадии нейтрализации свободных радикалов в стандартных условиях проводится измерение либо уровня, либо скорости окисления радикала DPPH• различными методами. Даже при использовании фиксированных комбинаций инициаторов, субстратов и конечной точки измерения, возможны различные варианты аналитических процедур. Они включают в себя:

- измерение в фиксированной точке времени проведения реакции окисления;
- измерение скорости реакции;
- измерение периода лаг-фазы;
- измерение интегрированной скорости реакции.

В первых двух вариантах реагенты смешиваются и значение ОАА в конечной точке определяется после предварительного установления необходимого промежутка времени для окончания реакции в первом варианте и мониторинга изменения скорости реакции во втором варианте. В обоих случаях присутствие антиоксидантов в реакционной смеси снижает изменение параметров в конечной точке. В третьем варианте измеряется длина лаг-периода, т. е. задержки начала реакции окисления: чем выше ОАА образца, тем больше лаг-период. Четвертый вариант включает в себя интеграцию конечной точки реакции против временной кривой и используется в тех случаях, когда кинетика реакции не простого порядка.

Исходя из этих соображений тест-система с DPPH• была разработана в двух вариантах, динамическом и статическом. В первом случае измеряют скорость нейтрализации радикала DPPH• в растворе после добавления образца, содержащего молекулы фенолов, которая характеризует реакционную способность антиоксидантов в образце. В статическом варианте определяют количество DPPH•, нейтрализованного тестируемым образцом, т.е. стехиометрию реакции DPPH• с донором протонов для каждого индивидуального образца или количество активных гидроксильных групп в биообразце, представляющим из себя обычно сложную смесь различных соединений. Наиболее часто результаты анализов выражают как:

- 1) антирадикальную активность, т. е. способность нейтрализовать радикалы, %;
- 2) индекс IC₅₀, который показывает количество образца, необходимое для нейтрализации половины присутствующих в растворе молекул DPPH•;
- 3) эквивалент стандартного антиоксиданта (хлорогеновая кислота, аскорбиновая кислота, Trolox и др.), выраженный в мкг стандарта на 1 г образца с учетом разведений в соответствии с построенным калибровочным графиком.

Цель и задачи исследования. Основная цель исследования состояла в апробации тест-систем DPPH• для оценки общей антиоксидантной активности семян при массовом анализе (скрининг растительного генофонда Украины и селекционного материала).

Обсуждение результатов. Определение антирадикальной активности проводят с использованием стабильного радикала (DPPH•) согласно методу, описанному в статье S. Arabshahi, A. Urooj [23] с небольшими изменениями: метиловый спирт в элюирующем растворе был заменен на нетоксичный этиловый спирт [24, 25]; концентрация DPPH• была выбрана таким образом, чтобы максимальная экстинкция растворов не превышала 1,4 един. и светопропускание всех растворов находилось в пределах линейного участка калибровочного графика. Время реакции было увеличено с 30 мин до 2 часов, чтобы уменьшить влияние колебаний температуры в лаборатории (от + 13 °С до + 30 °С) и увеличить количество образцов, анализируемых в одном опыте до 32 (в трех повторностях).

В результате проведенных многочисленных экспериментов нами был принят следующий ход проведения анализа. Семена дополнительно подсушивают в термостате при 25 °С в течение 4–5 дней. Размалывание образца проводят на лабораторной мельнице в течение 1 мин (3 × 20 сек). Муку, навеской в 0,5 г, помещают в виалы (с герметично закрывающимися крышечками), заливают 4,5 мл 80 % раствором этанола в дистиллированной воде и экстрагируют 18–20 часов при комнатной температуре в темноте. Пробы центрифугируют (10 мин при 3000 × g) на центрифуге ОПН-3 и по 2 мл надосадочных растворов переносят в чистые виалы.

Готовят спиртовой раствор радикала растворением 22 мг DPPH• в 400 мл 80 % этанола на магнитной мешалке в условиях рассеяного света, небольшие крупинки нерастворившегося красителя растирают дополнительно фарфоровым пестиком. Раствор фильтруют и хранят в течение дня проведения анализа.

Перед началом анализа проводят измерение оптической плотности раствора, полученного добавлением 0,5 мл 80 % раствора этанола к 3,5 мл раствора DPPH• на спектрофо-

тометре при 517 нм и если экстинция превышает 1,4 един., то раствор дополнительно разводят 80 % раствором этанола, чтобы его экстинция была равна 1,4 един. (рабочий раствор DPPH•, примерно 125 мкМ).

К 3,5 мл рабочего раствора DPPH• приливают 0,5 мл экстракта семян при комнатной температуре, быстро перемешивают, ставят на 2 часа в темное место и регистрируют изменение светопоглощения полученной смеси. Реакция вначале идет очень быстро и практически полностью заканчивается в пределах 1,5–2 час. В контрольном образце к 3,5 мл рабочего раствора DPPH• добавляют 0,5 мл 80 % этанола.

Способность образца нейтрализовать стабильный свободный радикал DPPH• (антирадикальная активность – АА) определяется как: (1)

$$AA = (A - B)/A \times 100 \% \quad (1)$$

где А – светопоглощение контрольного образца, В – светопоглощение опытного образца (через 2 часа после смешивания с рабочим раствором радикала DPPH•).

В качестве стандарта антиоксидантной активности используют хлорогеновую кислоту и ОАА выражают в мг хлорогеновой кислоты на 1 г образца.

В случае проведения анализа ОАА семян с очень высокими значениями этого показателя (подсолнечник, ячмень, особенно голозерный, темно-окрашенные семена фасоли и пр.), следует уменьшить количество добавляемого экстракта к раствору DPPH•, например, 0,2 мл. В этом случае делается новый калибровочный график стандарта.

Необходимо отметить некоторые ограничения метода. Как правило, хорошо отработанные непрямые методы, такие как тест-системы с использованием DPPH•, более производительны и просты в проведении анализов. Критичным для их использования является низкая информативность полученных результатов, которые дают общее представление о способности природных образцов нейтрализовать стабильные свободные радикалы в образце и позволяют произвести оценку ОАА только в первом приближении. Остается открытым вопрос о соответствии полученных данных и действительной способности природных образцов ингибировать окислительные процессы.

Другой проблемой использования непрямых методов оценки ОАА является низкая воспроизводимость результатов и меньшая чувствительность анализов. Для метода с использованием DPPH• характерен еще один недостаток – узкий линейный участок диапазона концентрации красителя, поэтому анализы образцов с наибольшей ОАА приходится переделывать с дополнительным разведением экстрактов. Раствор стабильного радикала имеет ограниченный срок службы, поэтому готовить свежий раствор необходимо ежедневно.

Учитывая неполную растворимость красителя в 80 % растворе этанола (осадок в виде крупинок, которые желательно растереть пестиком) и необходимость фильтрования полученного раствора, трудно получить растворы DPPH• с одинаковой оптической плотностью.

И, наконец, показано, что реакция DPPH• с некоторыми фенолами является частично обратимой и результаты определения способности нейтрализовать радикалы являются заниженными [26].

Современные методы скрининга антиоксидантной активности имеют как концептуальные, так и технические ограничения [21]. Они разрабатывались на основе предположения, что экстракты антиоксидантов в тест-системах *in vitro* будут нейтрализовывать свободные радикалы по тем же механизмам, как они это делают в реальных биосистемах (т.е. *in vivo*), пренебрегая тем фактом, что большинство антиоксидантов адсорбировано на стенках внутриклеточных органелл с полисахаридами и сложными белковыми комплексами и работают в тесной кооперации друг с другом, что и заложено в основу понятия функционирования единой антиоксидантной системы как отдельных клеток, органов и тканей, так и всего организма (растения или животного) в целом.

Выводы. За последние годы направленность использования методов определения антиоксидантной активности постепенно сдвигается в сторону разработки и использования простых и недорогих методов оценки большого количества биологических образцов. Это вызвано не только растущим интересом к поиску новых источников ценных продуктов функционального питания, но и необходимостью проведения скрининга растительного генофонда, с целью выделения наиболее перспективных для биофортификации образцов.

Список использованных источников

1. Halliwell B. Antioxidants: the basics – what they are and how to evaluate them. *Adv. Pharmacol.* 1997. Vol. 38. P. 3–20.
2. Huang D., Ou B., Prior R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 2005. Vol. 53. P. 1841–1856.
3. Prior R.L., Wu X., Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 2005. Vol. 53, No. 10. P. 4290–4302.
4. Číž M., Čížova H., Denev P., Kratchanova M., Slavov A., Lojek A. Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food Control.* 2010. Vol. 21. P. 518–523.
5. Aruoma O.I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research.* 2003. Vol. 523–524. P. 9–20.
6. Schlesier K., Harwat M., Bohm V., Bitsch R. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Rad. Res.* 2002. Vol. 36, No. 2. P. 177–187.
7. Davies K.J.A. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBM Life.* 2000. Vol. 50, No. 4–5. P. 279–289.
8. Prior R.L., Hoang H., Gu L. W., Wu X., Bacchiocca M., Howard L., Hampsch-Woodill M., Huang D., Ou B., Jacob R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* 2003. Vol. 51, No. 11. P. 3273–3279.
9. Serrano J., Goñi I., Saura-Calixto F. Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. *Food Res. Int.* 2007. Vol. 40. P. 15–21.
10. Roginsky V., Lissi E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry.* 2005. Vol. 92. P. 235–254.
11. Хасанов В.В., Рыжова Г.Л., Мальцева Е.В. Методы исследования антиоксидантов. *Химия растительного сырья.* 2004. № 3. С. 63–75.
12. Бельтюкова С.В., Степанова А.А., Ливенцова Е.О. Антиоксиданты в пищевых продуктах и методы их определения. *Вісник ОНУ. Хімія.* Том 19. Вип 4 (52). С. 16–31.
13. Сажина Н.Н. Определение антиоксидантной активности различных биоантиоксидантов и их смесей амперометрическим методом. *Химия растительного сырья.* 2016. № 4. С. 71–76.
14. Cao G., Alessio H.M., Cutler R.G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.* 1993. Vol. 14. P. 303–311.
15. Pellegrini N., Re R., Yang M., Rice-Evans C. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying the 2,20-azinobis (3-ethylenebenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Methods in Enzymology.* 1999. Vol. 299. P. 379–389.
16. Benzie I.F.F., Strain J.J. Ferric reducing antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant function of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology, Oxidants and Antioxidants.* 1999. Vol. 299. P. 15–27.
17. Ghiselli A.A., Serafini M., Maiani G., Azzini E., Ferro-Luzzi A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Rad. Biol. Med.* 1995. Vol. 18, No 1. P. 29–36.

18. Бурлакова Е.Б., Алесенко А.В., Молочкина Е.М, Пальмина Н.П., Храпова Н.Г. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. М.: Наука, 1975. 214 с.
19. Tirzitis G., Bartosz G. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochimica Polonica*. 2010. Vol. 57. P. 139–142.
20. Berker K.I., Guclu K., Demirata B., Apak R. A novel antioxidant assay of ferric reducing capacity measurement using ferrozine as the colour forming complexation reagent. *Anal. Methods*. 2010. Vol. 2. P. 1770–1778.
21. Apak R., Gorinstein S., Böhm V., Schaich K.M., Özyürek M., Güçlü K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem*. 2013. Vol. 85, No. 5. P. 957–998.
22. Von Gadov A., Joubert E., Hansmann C.F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT, and BHA. *J. Agric. Food Chem*. 1997. Vol. 45. P. 632–638.
23. Arabshahi S., Urooj A. Antioxidant Properties of Various Solvent Extracts of Mulberry *Morus indica* L. Leaves. *Food Chem*. 2007. Vol. 102. P. 1233–1240.
24. Bonoli M., Verardo V., Marconi E., Caboni M.F. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem*. 2004. Vol. 52. P. 5195–5200.
25. Zhou K., Yu L. Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol*. 2004. Vol. 37. P. 717–721.
26. Huang H.Y., Caballero B., Chang S., Alberg A., Semba R., Schneyer C., Wilson R.F., Cheng T.Y., Prokopowicz G., Barnes G.J. 2nd, Vassy J., Bass E.B. Multivitamin / mineral supplements and prevention of chronic disease. *Evid. Rep. Technol. Assess*. 2006. Vol. 139. P. 1–117.

References

1. Halliwell B. Antioxidants: the basics – what they are and how to evaluate them. *Adv. Pharmacol*. 1997; 38: 3–20.
2. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem*. 2005; 53: 1841–1856.
3. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem*. 2005; 53(10): 4290–4302.
4. Číž M, Čížova H, Denev P, Kratchanova M, Slavov A, Lojek A. Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food Control*. 2010; 21: 518–523.
5. Aruoma OI. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research*. 2003; 523–524: 9–20.
6. Schlesier K, Harwat M, Bohm V, Bitsch R. Assessment of Antioxidant Activity by Using Different In Vitro Methods. *Free Rad. Res*. 2002; 36(2): 177–187.
7. Davies KJA. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBM Life*. 2000; 50(4–5): 279–289.
8. Prior RL, Hoang H, Gu LW, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem*. 2003; 51(11): 3273–3279.
9. Serrano J, Goñi I, Saura-Calixto F. Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. *Food Res. Int*. 2007; 40: 15–21.
10. Roginsky V, Lissi EA. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*. 2005; 92: 235–254.
11. Khasanov VV, Ryzhova GL, Maltseva EV. Methods of antioxidant studies. *Khimiya rastitelnogo syrya*. 2004; 3: 63–75.

12. Beltyukova SV, Stepanova AA, Liventsova EO. Antioxidants in food products and methods for their determination. *Visnyk ONU. Khimiia*. 19(4-52): 16–31.
13. Sazhina NN. Determination of antioxidant activity of different bioantioxidants and their mixtures by amperometry. *Khimiya rastitelnogo syryia*. 2016; 4: 71–76.
14. Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.* 1993; 14: 303–311.
15. Pellegrini N, Re R, Yang M, Rice-Evans C. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying the 2,20-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Methods in Enzymology*. 1999; 299: 379–389.
16. Benzie IFF, Strain JJ. Ferric reducing antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant function of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology, Oxidants and Antioxidants*. 1999; 299: 15–27.
17. Ghiselli AA, Serafini M, Maiani G, Azzini E, Ferro-Luzzi A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Rad. Biol. Med.* 1995; 18(1): 29–36.
18. Burlakova EB, Alesenko AV, Molochkina EM, Palmina NP, Khrapova NG. Bioantioxidants in radiation injury and malignant growth. Moscow: Nauka, 1975. 214 p.
19. Tirzitis G, Bartosz G. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochimica Polonica*. 2010; 57: 139–142.
20. Berker KI, Guclu K, Demirata B, Apak R. A novel antioxidant assay of ferric reducing capacity measurement using ferrozine as the colour forming complexation reagent. *Anal. Methods*. 2010; 2: 1770–1778.
21. Apak R, Gorinstein S, Böhm V, Schaich KM, Özyürek M., Güçlü K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 2013; 85(5): 957–998.
22. Von Gadov A, Joubert E, Hansmann CF. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT, and BHA. *J. Agric. Food Chem.* 1997; 45: 632–638.
23. Arabshahi S, Urooj A. Antioxidant properties of various solvent extracts of Mulberry *Morus indica* L. Leaves. *Food Chem.* 2007; 102: 1233–1240.
24. Bonoli M, Verardo V, Marconi E, Caboni MF. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52: 5195–5200.
25. Zhou K, Yu L. Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 2004; 37: 717–721.
26. Huang HY, Caballero B, Chang S, Alberg A, Semba R, Schneyer C, Wilson RF, Cheng TY, Prokopowicz G, Barnes GJ 2nd, Vassy J, Bass EB. Multivitamin/mineral supplements and prevention of chronic disease. *Evid. Rep. Technol. Assess.* 2006; 139: 1–117.

ВИКОРИСТАННЯ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ОЦІНКИ ЗАГАЛЬНОЇ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ НАСІННЯ

Поздняков В.В., Василенко А.О.

Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр`єва НААН, Україна

Вступ. Метод DPPH• (з використанням вільного радикалу), є одним з розповсюджених непрямих методів оцінки загальної антиоксидантної активності (ЗАА). DPPH• не реагує з флавоноїдами, які не містять гідроксильних груп у В-кільці, а також з ароматичними кислотами, що містять тільки одну гідроксильну групу. Метод базується на властивості стабільного радикалу 2,2-дифеніл-1-пікрглідразилу (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl – DPPH•) реагувати з донорами протонів, включно з фенолами.

Основна мета роботи полягала в апробації тест-системи DPPH• для проведення оцінки ЗАА насіння при масовому аналізі (проведення скрінінгу генофонду України і селекційного матеріалу).

Обговорення результатів. Визначення антирадикальної активності проводять з використанням стабільного радикалу (DPPH•) у відповідності до методики, представленої S. Arabshahi, A. Urooj (2007), але з деякими змінами: метиловий спирт в екстрагуючому розчині було замінено на нетоксичний етиловий; концентрацію DPPH• було обрано таким чином, щоб максимальна екстинція розчину не перевищувала 1,4 од. та світлопроникність всіх розчинів знаходилась у межах лінійного участку калібрувального графіка. Час реакції було збільшено з 30 хв. до 2 годин, для зменшення впливу коливань температури в приміщенні лабораторії (від + 13 °С до + 30 °С) та збільшення кількості зразків, що аналізували в одному досліді, до 32 (у трьох повтореннях).

У результаті проведених чисельних експериментів було прийнято наступний хід проведення аналізів. Насіння додатково підсушують у термостаті при 25 °С впродовж 4–5 діб. Зразок розмелюють на лабораторному млиночку впродовж 1 хв. (3× 20 сек). Борошно, наважкою 0,5 г, кладуть у віали (з кришками, які герметично закриваються), заливають 4,5 мл 80 % розчином етанолу в дистильованій воді і екстрагують 18–20 годин в темряві при кімнатній температурі. Проби центрифугують (10 хв. при 3000 × g) на ОПН-3, а потім по 2 мл надосадного розчину переносять у чисті віали. Спиртовий розчин радикалу готують наступним чином: розчиняють 22 мг DPPH• у 400 мл 80 % етанолу на магнітному розмішувачі при розсіяному світлі, а невеликі частинки барвника, що не розчинився, додатково розтирають порцеляновим товкачиком. Розчин фільтрують і зберігають впродовж дня проведення досліджень. Перед початком аналізу проводять вимірювання оптичної щільності розчину, що обув отриманий після додавання 0,5 мл 80 % розчину етанолу до 3,5 мл розчину DPPH• на спектрофотометрі при 517 нм. Якщо екстинція перевищує 1,4 од., то розчин додатково розбавляють 80 % розчином етанолу так, щоб його екстинція дорівнювала 1,4 од. (робочий розчин DPPH•, приблизно 125 мкМ). До 3,5 мл робочого розчину DPPH• додають 0,5 мл екстракту насіння при кімнатній температурі, швидко перемішують, розміщують у темному місці на 2 години і реєструють зміну світлопоглинання розчину. У контрольному зразку до 3,5 мл робочого розчину DPPH• додають 0,5 мл 80 % етанолу. Здатність зразка нейтралізувати стабільний вільний радикал DPPH• (антирадикальна активність – АА) визначали як: $AA = (A - B) / A \times 100\%$, де А – світлопоглинання контрольного зразка, В – світлопоглинання робочого зразка (через 2 години після змішування з робочим розчином радикалу DPPH•). В якості стандарту антиоксидантної активності використовували хлорогенову кислоту і ЗАА передавали в мг хлорогенової кислоти на 1 г зразка. В випадку проведення аналізу ЗАА насіння зернових з дуже високими значеннями цього показника, необхідним є зменшення кількості екстракту що додається до розчину DPPH•, наприклад, 0,2 мл. В цьому випадку необхідно зробити новий калібровочний графік стандарту.

Висновки. За останні роки спрямованість використання методів установа антиоксидантної активності поступово виходить в бік розробки і використання простих і не вартісних методів оцінки великої кількості біологічних зразків. Це викликано не тільки зростаючою цікавістю як спеціалістів харчової промисловості, так і дієтологів до пошуку нових джерел цінних продуктів харчування, але й необхідністю проведення скрінінгу рослинного генофонду з метою виділення найбільш перспективних зразків для біофікації.

Ключові слова: антиоксидант, загальна антиоксидантна здатність, тест-система, DPPH•, етап проведення аналізу

USE OF TEST SYSTEMS FOR ASSESSING THE TOTAL ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SEEDS

Pozdniakov V.V., Vasylenko A.A.
Plant Production Institute nd.a V.Ya. Yuriev of NAAS, Ukraine

Introduction. The method using the free radical DPPH • is one of the most successful, widespread indirect methods for assessing the total antioxidant activity (TAOA). DPPH • is sufficiently selective and reacts neither with flavonoids that do not contain hydroxyl groups in the B-ring nor with aromatic acids containing only one hydroxyl group. The method is based on the ability of the stable free radical of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH •) to react with proton donors, including phenols.

The aim and tasks of the study. The main objective of this study was to pilot the DPPH test systems for assessing the TAOA of seeds in routine analysis (screening of the plant genetic pool of Ukraine and of breeding material).

Results and discussion. The antiradical activity is determined using the stable radical (DPPH •) as described in [Arabshahi, Urooj, 2007] with minor changes: methanol in elution solution was replaced with non-toxic ethanol; the DPPH concentration was chosen so that the maximum extinction of solutions would not exceed 1.4 units. The light transmission of all solutions was within the linear part of the calibration curve. The reaction time was increased from 30 minutes to 2 hours to reduce the effect of temperature fluctuations in the laboratory (within +13°C - +30°C) and to increase the number of samples analyzed in one experiment to 32 (in 3 replicas). Having carried out numerous experiments, we adopted the following procedure: seeds were additionally dried in a thermostat at 25°C for 4-5 days; samples were ground in a laboratory mill for 1 minute (3 × 20 sec); weighted amounts of flour (0.5 g each) were placed in vials (with sealing caps); 4.5 ml of 80% ethanol (diluted with distilled water) was added; extraction lasted at room temperature in the dark for 18 to 20 hours; samples were centrifuged (10 min at 3,000 × g) in an OPN-3 centrifuge; 2 ml of supernatants were transferred to clean vials. Ethanol solution of the radical is prepared as follows: dissolve 22 mg of DPPH in 400 ml of 80% ethanol on a magnetic stirrer under diffuse light, small grains of undissolved dye are triturated additionally with a porcelain pestle. The solution is filtered and stored during the day of analysis. Before starting the analysis, the optical density of solution obtained by adding 0.5 ml of 80% ethanol to 3.5 ml of DPPH solution is measured on a spectrophotometer at 517 nm, and if the extinction exceeds 1.4, the solution is further diluted with 80% ethanol so that its extinction will be 1.4 (working solution of DPPH • is approximately 125 μM). 0.5 ml of a seed extract is added to 3.5 ml of working solution of DPPH • at room temperature, mixed rapidly, let to sit for 2 hours in a dark place, and then a change in light absorption of the mixture is recorded. In the control, 3.5 ml of working solution of DPPH is added to 0.5 ml of 80% ethanol. The ability of a sample to neutralize the stable free radical DPPH • (antiradical activity - ARA) is defined as: $ARA = (A-B) / A \times 100\%$, where A is the light absorption of the control, B is the light absorption of a sample (2 hours after mixing with the working solution of DPPH •). Chlorogenic acid is taken as the standard of antioxidant activity. TAOA is expressed in mg of chlorogenic acid per 1 g of a sample. If seed are noticeable for very high TAOA, the amount of an extract to be added to DPPH solution should be decreased, for example, 0.2 ml. In this case, a new calibration curve of the standard is plotted.

Conclusions. In recent years, the trend in use of methods for determining antioxidant activity has been gradually shifting towards the development and use of simple and inexpensive methods of evaluation of a large number of biological samples. This is attributed not only to the growing interest both of nutritionists and of dietitian to the search for new sources of valuable functional food products but also to the necessity of screening the plant gene pool in order to identify the most promising for biofortification accessions.

Key words: *antioxidants, total antioxidant activity (TAOA), test systems, DPPH •, analysis procedure*