

УДК 678.048:545

Инжекционно-проточная система с амперометрическим детектором для селективного определения антиоксидантов в пищевых продуктах и напитках

А. Я. Яшин

АЛЕКСАНДР ЯКОВЛЕВИЧ ЯШИН — кандидат химических наук, начальник отдела жидкостной хроматографии Научно-технического центра «Хроматография» НПО «Химавтоматика». Область научных интересов: высокоэффективная жидкостная и ионная хроматография, амперометрическое и кулонометрическое детектирование в жидкостной и ионной хроматографии, применение хроматографии в медицине для ранней диагностики заболеваний.

129226 Москва, ул. Сельскохозяйственная, 12а, НПО «Химавтоматика», E-mail yashinchrom@mail.ru

Введение

Исследования, выполненные в разных странах в последние десятилетия, подтверждают, что одной из основных причин патологических изменений в человеческом организме, приводящих к преждевременному старению и развитию многих болезней (более 100), в том числе самых опасных, таких как сердечно-сосудистые и онкологические заболевания, является избыточное содержание в биологических жидкостях свободных кислородных радикалов (супероксид-анион, гидроксильный радикал, пергидроксильный радикал и др.).

Постоянное повышенное содержание в межклеточных и внутриклеточных биологических жидкостях свободных радикалов создает условия для развития оксидантного стресса, выражающегося с биохимической точки зрения в том, что свободные радикалы окисляют стенки сосудов, белки, ДНК, липиды. Радикалы особенно активно взаимодействуют с мембранными липидами, содержащими ненасыщенные связи, и изменяют свойства клеточных мембран. Наиболее активные свободные радикалы способны разрывать связи в молекуле ДНК, повреждать генетический аппарат клеток, регулирующий их рост, что приводит к онкологическим заболеваниям. Липопротеиды низкой плотности после окисления могут откладываться на стенках сосудов, что вызывает развитие атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний [5, 6].

От воздействия свободных радикалов здоровый организм защищает естественная антиоксидантная система, содержащая ферментные и неферментные вещества, способные полностью нейтрализовать вредное воздействие радикальных форм кислорода.

Снижение активности естественной антиоксидантной системы человека и, следовательно, возрастание концентрации свободных радикалов в организме связано со многими неблагоприятными факторами: это радиоактивное и ультрафиолетовое облучение, ухудшение экологической обстановки, широкое распространение социальных заболеваний (алкоголизм, курение, наркомания), постоянные стрессы, потребление загрязненной пищи, неконтролируемый прием некоторых лекарственных препаратов.

Вредное воздействие свободных радикалов в случае оксидантного стресса можно уменьшить за счет регулярного употребления определенных пищевых продуктов и напитков, лекарственных препаратов, биологически активных добавок (БАД), обладающих антиоксидантной активностью.

Основные природные антиоксиданты — флавоноиды, ароматические гидрооксикислоты, антоцианы, витамины С и Е, каротиноиды и др. Исключительное значение имеют антоцианы, так как благодаря заряду на атоме кислорода в кольце антоцианидины и антоцианины легче проникают через мембраны клеток.

В последние десятилетия на первый план выходят биофлавоноиды, обладающие антиканцерогенными, антисклеротическими, противовоспалительными и антиаллергическими свойствами и по антиоксидантной активности в десятки раз превосходящие витамины Е, С и β-каротин. Особенно эффективно сочетание биофлавоноидов, содержащихся в овощах, ягодах, фруктах, зернах, семенах, орехах и пр. Рекомендуются уровни потребления некоторых флавоноидов приняты в РФ в 2004 году [1] (суммарно в пределах 350—1300 мг/сут., рекомендуемые нормы в других странах 800—1000 мг/сут. [2]).

Полезные свойства природных антиоксидантов убедительно подтверждаются особенностью питания жителей Средиземноморского региона, употребляющих в пищу большое количество продуктов с высокой антиоксидантной активностью. Именно поэтому в странах этого региона отмечается сравнительно низкий уровень сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний [3, 4].

Отметим, что во многих странах разрабатываются программы антиоксидантной защиты населения, программы функционального питания, пищи как лекарства.

Измерение антиоксидантной активности

Природные антиоксиданты широко используются для лечения в клиниках и в оздоровительных центрах, они включены в программы диетического питания.

В рекламе на БАДы обычно указывается, что они обладают высокой антиоксидантной активностью, хотя в подавляющем большинстве случаев это утверждение ничем не подкрепляется. Содержание антиоксидантов в пищевых продуктах, напитках, БАДах, как правило, неизвестно. Поэтому измерение и контроль содержания антиоксидантов — актуальная аналитическая задача, имеющая социально-защитное значение.

За прошедшее десятилетие разработано много методов определения антиоксидантной активности, предложены новые реагенты, созданы модельные системы и приборы аналитического контроля.

В основе методов определения антиоксидантной активности чаще всего лежат принципы прямого или косвенного измерения скорости или полноты реакции антиоксидантов с соответствующими реагентами [5—7]. Можно выделить три типа методов в зависимости от того, какой регистрируется процесс:

- потребление кислорода;
- образование продуктов окисления;
- поглощение (или связывание) свободных радикалов.

В первом и втором случаях антиоксидантная активность определяется по ингибированию скорости потребления реагента или образования продуктов реакции окисления. В этих методах антиоксидантная активность есть функция многих параметров, в частности, природы исследуемого вещества, концентрации антиоксиданта и других соединений, времени, температуры и т.д. Поэтому данные одних методов обычно не коррелируют с данными других методов.

Для количественного определения антиоксидантов наиболее надежным представляется амперометрический метод. Амперометрический метод анализа — единственный метод, который позволяет непосредственно измерить содержание всех антиоксидантов в пробе. Другие методы — не прямые, в них оценивается ингибирование реакционных смесей (в частности, свободных радикалов), генерированных в ходе реакций.

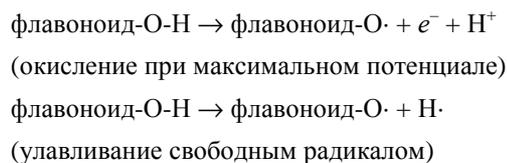
Амперометрический метод основан на измерении электрического тока, возникающего при электрохимическом окислении исследуемого вещества (или смеси

веществ) на поверхности рабочего электрода при определенном его потенциале. В условиях амперометрического детектирования хорошо окисляются соединения, содержащие гидроксильные группы, предел их обнаружения лежит в интервале 10^{-9} — 10^{-12} г, в благоприятных условиях некоторые соединения определяются на уровне 10^{-15} г. Основные и наиболее активные природные антиоксиданты имеют фенольную природу (природные полифенолы, разные типы флавоноидов, фенольные гидроокислоты, витамины и др.). Таким образом, амперометрический метод наиболее пригоден для оценки антиоксидантной активности.

Антиоксидантную активность трудно измерить по отношению к свободным радикалам непосредственно *in vivo*, поэтому действие антиоксидантов оценивается степенью их окисления *in vitro*.

Чувствительность амперометрического метода определяется природой рабочего электрода и приложенным к нему потенциалом. Материалом для рабочего электрода обычно служит стеклоуглерод.

Электрохимическое окисление может быть использовано при измерении интенсивности поглощения свободных радикалов, выделяющихся, например, в результате следующих процессов [8]:



Таким образом, способность к захвату свободных радикалов флавоноидами или другими полифенолами (т.е. их антиоксидантная активность) может измеряться величиной окисляемости этих соединений на рабочем электроде амперометрического детектора.

Как известно, амперометрический метод детектирования обладает рядом преимуществ. Это низкий предел обнаружения, высокая селективность (определяются только соединения, молекулы которых могут окисляться, другие соединения, присутствующие даже в больших концентрациях не определяются), малый объем электрохимической ячейки (0,1—5 мкл), простота обслуживания.

Приведем ряд примеров реализации амперометрического метода для измерения антиоксидантной активности пищевых продуктов и напитков.

Амперометрический метод был успешно применен для определения антиоксидантной способности различных вин [9]. По результатам измерений метод был оценен как прямой, точный, объективный и быстрый. В работе [10] определяли антиоксидантную способность оливкового масла, произведенного в разных странах (Италия, Греция, Франция, Испания, Марокко, Тунис). Показано, что метод позволяет установить подлинность оливкового масла. В работе [11] определена антиоксидантная активность присутствующих в овощах липофильных соединений, таких, как каротиноиды, хлоро-

филл, токоферолы. Оценена антиоксидантная активность индивидуальных соединений: ликопен > β -каротин > зеаксантин > α -каротин > β -криптоксантин > лутеин > α -токоферол > капсаицин > хлорофилл *a* > хлорофилл *b* > астаксантин > сантаксантин. Результаты измерения антиоксидантной активности для экстрактов из пяти овощей и двух фруктов сравнивались с данными, полученными методом ABTS (ABTS — 2, 2'-азинобис(3-этилбензтиазолино-6-сульфоная кислота, с пероксидазой и пероксидом водорода образует стабильный катион-радикал с максимумом поглощения при 414 нм. В присутствии антиоксиданта задерживается появление окраски). Получена хорошая корреляция результатов определения по обоим методам, за исключением данных по шпинату. Авторы делают заключение, что амперометрический метод может успешно использоваться для прямого, быстрого и надежного мониторинга антиоксидантной способности липофильных экстрактов пищевых продуктов.

Амперометрический метод применяется также для оценки антиоксидантного статуса человека [12]. Так, в [13] амперометрическим методом в комбинации с высокоэффективной жидкостной хроматографией определяли содержание полифенолов в пищевых продуктах и напитках, кверцетина в плазме человека после употребления зеленого чая, аскорбиновой и дигидроаскорбиновой кислот в плазме.

Прибор Цвет Яуза-01-АА для суммарного определения антиоксидантов

В НПО «Химавтоматика» создан прибор Цвет Яуза-01-АА (первоначальное название Цвет Яуза-АА-01), предназначенный для прямого количественного измерения содержания антиоксидантов в пробах анализируемых продуктов и напитков (рис. 1). Функциональная



Рис. 1. Общий вид прибора Цвет Яуза-АА-01 (первая модель прибора)

схема прибора (рис. 2) включает емкость для растворителя, насос, дозатор, выполненный в виде многоходового крана, амперометрический детектор, представляющий собой термостатируемую электрохимическую ячейку со сменными рабочими электродами, усилитель тока, аналого-цифровой преобразователь и устройство регистрации выходного сигнала. Амперометрический детектор может функционировать в трех режимах: при постоянном потенциале, при импульсных потенциалах и при сканировании потенциалов во всем диапазоне. Варьируя полярность электродов и величины приложенных потенциалов, можно определять не только суммарную антиоксидантную активность, но и активность отдельных классов биологических соединений [14, 15].

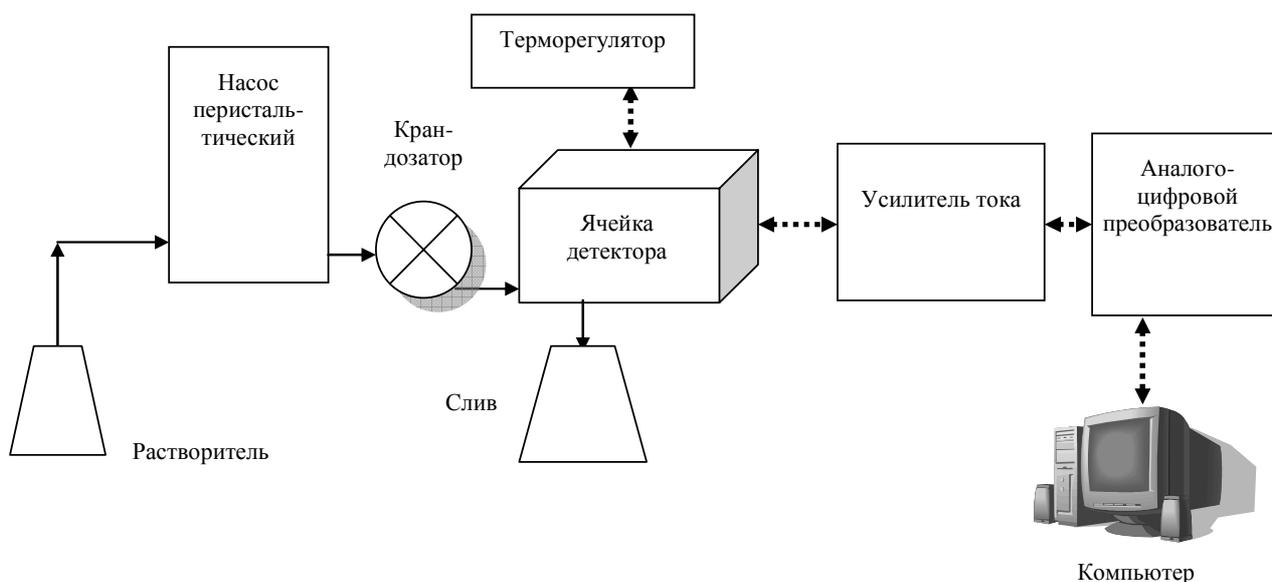


Рис. 2. Функциональная схема прибора Цвет Яуза-01-АА для определения антиоксидантной активности

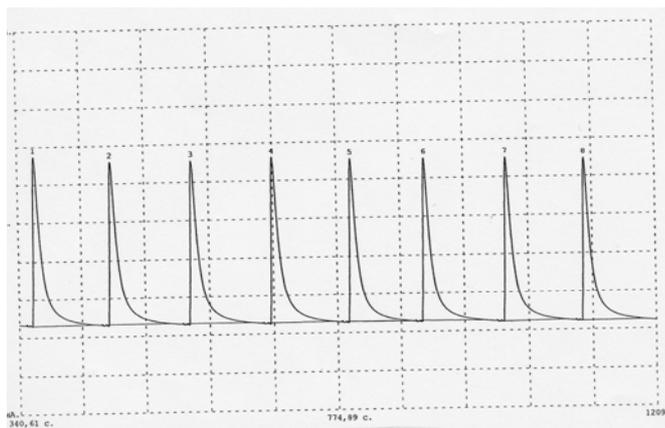


Рис. 3. Сигналы, зарегистрированные при восьми последовательных анализах разбавленных растворов бальзама «Тайга» прибором Цвет Яуза-01-АА.

Среднее квадратичное отклонение менее 3%

Прибор работает следующим образом. Насос непрерывно прокачивает растворитель через всю систему. При положении крана-дозатора «Ввод пробы» исследуемый раствор с помощью стандартного шприца (1 см^3) подается в дозируемую петлю. Поворотом ручки крана в положение «Анализ» поток растворителя направляет определенную дозу исследуемого вещества в ячейку детектора. В результате окисления исследуемого вещества на поверхности рабочего электрода возрастает электрический ток, протекающий между двумя электродами.

Возникающие электрические токи очень малы, в пределах 10^{-6} — 10^{-9} А. Эти аналоговые сигналы усиливаются, а затем с помощью аналого-цифрового преобразователя преобразуются в цифровой сигнал, который регистрируется на дисплее компьютера. В случае необходимости выходной сигнал можно распечатать на принтере (рис. 3).

Рабочий электрод выполнен из стеклоглуглерода — наиболее универсального материала для определения полифенольных соединений. Потенциал на электродах можно варьировать от 0 до 2 В, потенциалы ионизации фенольных соединений изменяются в пределах 100—1000 мВ.

Перед началом работ в день выполнения измерений проводят градуировку прибора. Для исключения случайных результатов и усреднения данных выполняют пять последовательных измерений для каждого из пяти градуировочных растворов кверцетина (природный антиоксидант из группы флавонолов). За результат принимают среднее арифметическое значение из пяти измерений (относительное среднее квадратичное отклонение не более 5%). По полученным данным строят градуировочную характеристику (рис. 4)

$$Y = aX + b$$

где X — концентрация кверцетина, мг/л; Y — сигнал кверцетина (площадь пика).

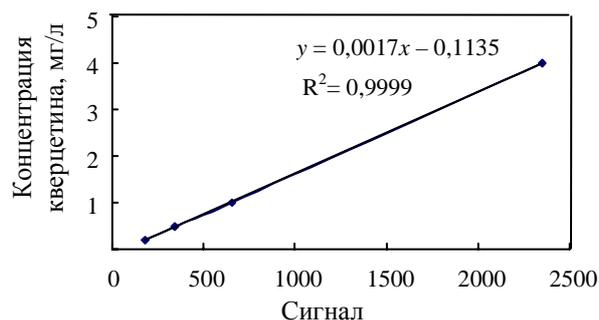


Рис. 4. Зависимость аналитического сигнала от концентрации кверцетина в растворе (градуировочная характеристика)

В табл. 1—5 приведены результаты измерений содержания антиоксидантов в ягодах, фруктах, овощах, напитках, выполненных на приборе Цвет Яуза-01-АА.

Заключение

Создание банка данных по содержанию антиоксидантов в пищевых продуктах и напитках — первоочередная задача в решении проблемы оксидантного стресса. Необходимо измерять содержание антиоксидантов в основных пищевых продуктах: овощах, фруктах, ягодах, соках, орехах, корнеплодах, специях, зернах, семенах, растительных маслах, рыбных продуктах, меде, чае, кофе, вине, пиве, коньяке и многих других. По результатам таких измерений должны вводиться поправки на сорта продуктов, на продолжительность их хранения.

Полученная информация, сформированная в виде банка данных, должна стать достоянием населения РФ, в первую очередь врачей, биохимиков, диетологов, специалистов оздоровительных центров и др. О содержании антиоксидантов в продуктах должны быть осведомлены:

- широкие слои населения (располагая данными о содержании антиоксидантов в различных продуктах, каждый человек будет иметь возможность сам составлять себе диету для максимально эффективного поддержания своего здоровья);
- производители пищевой продукции (в частности, эти данные будут стимулировать создание новых продуктов более высокого качества);
- врачи (информация позволит обоснованно применять антиоксидантную терапию, в частности, для онкологических больных до и после операции, после и при химиотерапии и облучении);
- работающие в тяжелых и вредных условиях труда;
- работники, подвергающиеся частым стрессам, перегрузкам и т.д.

Практическое использование информации об антиоксидантной активности пищевых продуктов, напитков, БАДов, лекарственных препаратов позволит обоснованно проводить не только «лечение» оксидантного стресса, но и его профилактику. Это обеспечит, во-первых, снижение заболеваемости в первую очередь наиболее

опасными болезнями, во-вторых, предупреждение преждевременного старения, что позволит увеличить продолжительность жизни в целом и продолжительность трудоспособного периода в частности.

Дальнейшими направлениями работы в области анализа антиоксидантов должны быть: исследование связи сигнала амперометрического детектора со строением

анализируемых молекул полифенолов, в частности, с числом гидроксильных групп в бензольных кольцах, их взаимного влияния, экранировки неактивными молекулами и т.д.; разработка новых сверхселективных рабочих электродов путем их модифицирования наночастицами, нанотрубками, токопроводящими полимерами, ферментами и др.

ИЗМЕРЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ЯГОД, ФРУКТОВ, ОВОЩЕЙ И НАПИТКОВ
ПРИБОРОМ ЦВЕТ ЯУЗА-01-АА (СТАНДАРТ — КВЕРЦЕТИН)

Таблица 1

Суммарное содержание антиоксидантов (А) в соках ягод

Ягоды	А, мг/г	Ягоды	А, мг/г
Черная смородина	7,65	Садовая клубника	1,58
Черная вишня	5,72	Кизил	1,41
Боярышник	5,7	Брусника	1,01
Черноплодная рябина	3,28	Ежевика	0,94
Калина	3,22	Белая черешня	0,59
Черника	2,91	Крыжовник	0,46
Клюква	2,7	Тернослива	0,4
Барбарис	2,3	Голубика	0,4
Черная черешня	2,21	Облепиха	0,4
Лесная клубника	2,1	Крыжовник красный	0,35
Красная смородина	2	Белая смородина	0,21
Малина	1,71	Слива	0,18
Лесная земляника	1,66	Арбузы	0,11

Таблица 2

Суммарное содержание антиоксидантов (А) в соках фруктов

Фрукты	А, мг/г
Лимоны (сок цедры)	2,85
Фейхоа	1,52
Яблоки (сорт «Симиренко»)	0,57
Груши	0,5
Киви	0,45
Лимоны	0,43
Нектарин	0,17
Абрикосы	0,14
Персики	0,12
Бананы	0,07

Таблица 3

Суммарное содержание антиоксидантов (А) в соках овощей

Овощи	А, мг/г	Овощи	А, мг/г
Свекла	2,17	Картофель	0,43
Сладкий перец красный	1,88	Дыни (сорт «Колхозница»)	0,37
Репа	1,35	Кабачки	0,35
Сладкий перец желтый	0,92	Ревень	0,32
Капуста белокочанная	0,69	Огурцы	0,22
Томаты	0,64	Морковь	0,19
Редис	0,62	Корень сельдерея	0,15
Баклажаны	0,54	Патиссоны	0,04

Таблица 4

Суммарное содержание антиоксидантов (А) в алкогольных напитках

Напитки	Число исследованных образцов	А, мг/мл
Бальзамы	21	0,4—3
Красные вина	70	1—2,5
Белые вина	10	0,3—0,5
Коньяки	15	0,1—0,3
Виски	5	0,1—0,3
Пиво темное (Премиум «Очаково»)	1	0,7
Пиво светлое	5	0,3—0,4

Таблица 5

Суммарное содержание антиоксидантов (А) в безалкогольных напитках

Напитки	Число исследованных образцов	А, мг/г
Зеленый чай	Более 50	10—200
Оолонг	5	10—150
Черный чай	20	5—100
Кофе	10	20—50
Какао	3	4—5
Соки	15	0,1—3

ЛИТЕРАТУРА

1. Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации, г. Москва 2004, 36 с.
2. *Болдырев А.А.* Соровский образовательный журнал, 2001, т. 7, № 4, с. 21.
3. *Simopoulos A.P.* J. Nutr., 2001, v. 131, p. 3065 S.
4. *Chiselli A., D'Amicis A., Giacasa A.* Eur. J. Cancer Prek., 1997, v. 6, p. 3—15.
5. *Roginsky V., Lissi E.A.* Food Chemistry, 2005, v. 92, p. 235.
6. *Perez D.D. e. a.* Biol. Research, 2000, v. 33, p. 71.
7. *Schleisier K. Harwat M., Böhm V., Bitsch R.* Free Radical Research, 2002, v. 36, p. 177.
8. *Peprat-Maillard M.N., Bonnely S., Berset C.* Talanta, 2000, v. 51, p. 709.
9. *Mannino S., Brenna O., Buratti S., Cosio M.S.* Electroanalysis, 1998, v. 10, p. 908.
10. *Mannino S. e. a.* Analyst, 1999, v. 124, p. 1115.
11. *Buratti S. e. a.* J. Agric Food Chem., 2001, v. 48 (II), p. 5135.
12. *Hansley K. J.* High Resolut. Chromatogr., 1999, v. 22, p. 429.
13. *Kusu F. Jin D.* Biomed. Chromatogr., 2004, v. 18, p. 25.
14. *Яшин А.Я., Яшин Я.И., Черноусова Н.И., Пахомов В.П.* Пиво и напитки, 2004, № 5, с. 32.
15. *Яшин А.Я., Яшин Я.И.* Приборы и автоматизация, 2004, № 11, с. 45.