



## ХИМИЯ

УДК 543.064: 663.952

### ПАРАМЕТРЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЙ: ОТНОСИТЕЛЬНАЯ АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ЧАЯ

**И.П. Анисимович**  
**В.И. Дейнека**  
**Л.А. Дейнека**  
**П.А. Фролов**  
**П.А. Мясникова**

Белгородский  
государственный  
университет,  
Россия, 308015, г. Белгород,  
ул. Победы, 85

E-mail: [deineka@bsu.edu.ru](mailto:deineka@bsu.edu.ru)

В работе впервые обсуждаются особенности оценки антиоксидантной активности соединений. Обращено внимание на то, что при сопоставлении этих параметров для различных соединений следует различать кинетические и емкостные характеристики; для медленно развивающихся систем «оксидант – антиоксидант» предлагается относительная (промежуточная) характеристика, в которой используется подходящее вещество сравнения. Относительная (промежуточная) антиоксидантная активность не зависит ни от времени выдержки, ни от использованных концентраций антиоксидантов. На примере чая показана возможность ее определения при использовании в качестве вещества сравнения кверцетина и железо-восстанавливающей системы с  $\alpha, \alpha'$ -дипиридиллом. Показано, что нет существенных различий между антиоксидантной активностью черного и зеленого чая.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, кинетическая, емкостная, относительная (промежуточная) характеристики, железо-восстанавливающий метод, чай.

Антиоксидантная активность (АОА) в настоящее время является одной из важнейших и популярнейших характеристик веществ, определению которой уделяется особое внимание в большом количестве работ по исследованию биологически активных соединений. Главная задача антиоксиданта – перехват свободных радикалов, возникающих в результате некоторых процессов в клетке живого организма и способных атаковать жизненно важные мишени, если естественный природный механизм их нейтрализации оказывается неспособным справиться с этой задачей. И поскольку анализ механизмов биологической активности веществ чаще всего приводит к выводу о ключевой роли в этой активности именно антиоксидантных свойств рассматриваемых соединений, то понятно пристальное внимание к антиоксидантам в настоящее время.

Известен целый ряд различных методов, используемых для определения антиоксидантной активности [1-4], среди которых можно выделить простые в исполнении спектрофотометрические методы. Например, в так называемых железо-восстанавливающих (iron или ferric reducing) методах ионы (а точнее – ионы-радикалы) железа (III) могут окислять антиоксидант (Ao), восстанавливаясь до ионов железа (II):



где  $A_1$  - продукт окисления исходного антиоксиданта Ao, который также может обладать антиоксидантными свойствами.

Контроль за течением процесса в этом случае можно вести двумя способами: по убыли ионов железа (III) или по увеличению концентрации ионов железа (II). Для этого используют вспомогательные вещества, образующие окрашенные комплексы с одним из этих ионов. На таком принципе построена интегрированная аналитическая система определения уровней свободных радикалов и биологического антиоксидантного потенциала в крови человека, доступная в приборном оформлении (FRAS 4).



Действие прибора основано на измерении абсорбции окрашенных роданидных комплексов железа (III). Образование окрашенных комплексов ионов железа (II) с  $\alpha, \alpha'$ -дипиридилем положено в основу метода, предложенного в работе [5].

Результат любого химического процесса зависит от двух типов параметров - интенсивных и экстенсивных. Экстенсивный фактор связан с концентрацией антиоксиданта в реакционной смеси; интенсивный фактор определяется константой скорости реакции и может зависеть не только от строения антиоксиданта, но и от типа оксиданта (свободного радикала). Но тогда возникает вопрос о том, какой параметр вносит основной вклад в определяемую конкретным методом величину антиоксидантной активности. За некоторым исключением (см. [6]) в большинстве работ, посвященных определению АОА эта проблема остается без внимания. В одном из наиболее часто используемых методов определения АОА, основанном на обесцвечивании радикалов дифенилпикрилгидразида (метод DPPH), изначально (и в большей части современных исследований) в качестве меры антиоксидантной активности предполагалось использовать концентрацию вещества, в некоторых стандартных условиях восстанавливающую половину свободных радикалов до бесцветного продукта. Но затем было обращено внимание на необходимость учета и кинетической составляющей [7]. Необходимость получения нескольких экспериментальных точек (для различных концентраций антиоксиданта) в этом методе связана с нелинейностью соотношения «аналитический сигнал vs концентрация антиоксиданта», которая является следствием незавершенности окислительно-восстановительных реакций, что было обосновано компьютерным моделированием [8].

В данной работе впервые предлагается системный подход к оценке антиоксидантной активности.

#### Методика исследования относительной антиоксидантной активности

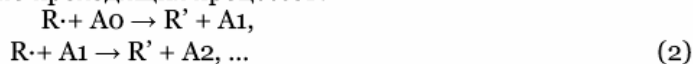
В мерные колбы на 100 мл наливают 50 мл воды, 5 мл 0.01 М раствора железоммонийных квасцов, 1 мл 1% спиртового раствора  $\alpha, \alpha'$ -дипиридила и аликвотную часть антиоксиданта, доводят содержимое до метки дистиллированной водой. Измеряют оптическую плотность растворов при аналитической длине волны 512 нм при выдерживании в кварцевой кювете (длина оптического пути 2 см).

Для получения напитков чая один пакетик чая (или 2 г развесного чая) заваривают в течение 5 минут в 150 мл воды, напиток охлаждают до комнатной температуры в тече водопроводной воды. Для анализа отбирают аликвотные объемы 0.05, 0.1 и 0.15 мл.

В качестве раствора сравнения используют 0.001 М раствор кверцетина (аликвотные объемы 0.4, 0.6 и 0.8 мл).

#### Результаты и обсуждение

Медленное течение реакции обычно характерно и для тестовых систем антиоксидант -  $Fe^{3+}$  -  $\alpha, \alpha'$ -дипиридил. Наши экспериментальные данные, рис. 1 (на рисунке приводится расход количества ионов железа (III), отнесенный к одному моль исходного антиоксиданта), не согласуются с обычными порядками необратимых реакций, что не удивительно, поскольку, скорее всего, суммарный итог является следствием не одного, а нескольких одновременно проходящих процессов:



где R- оксидант;  $A_0$  - исходный антиоксидант и  $A_1, A_2, \dots$  - продукты его последовательного одноэлектронного окисления.

То, что последовательные реакции могут быть причиной нелинейности в количественной характеристике АОА подтверждается представленными на рис.1 экспериментальными данными. Аскорбиновая кислота в условиях эксперимента достаточно быстро отдает два электрона, что соответствует ее окислению до дегидроаскорбиновой кислоты - вещества, малоактивного как антиоксиданта. В этих же условиях кверцетин, один из важнейших представителей обширного класса типичных природных антиоксидантов [9], также быстро отдает 2 электрона. По литературным данным [10] предполагается его окисление на первой стадии до соединения хиноидной структуры.



Но на этом превращения не заканчиваются - чуть больше времени требуется на потерю еще двух электронов, и в дальнейшем наблюдаются более медленные процессы в цепи окислительного метаболизма; в итоге 1 моль кверцетина способен восстановить более 8 моль ионов  $Fe^{3+}$ .

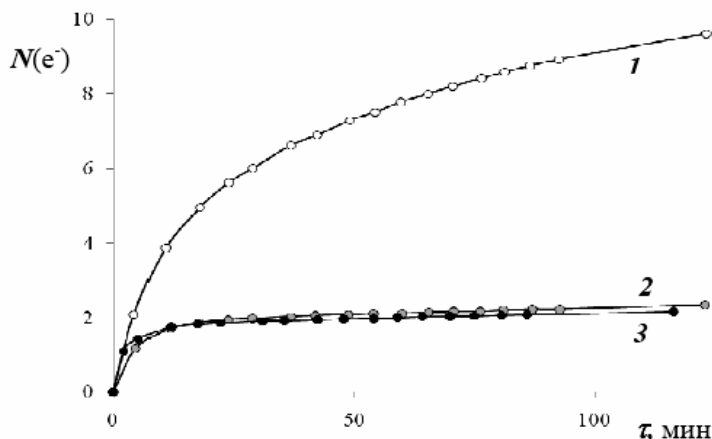


Рис. 1. Оценка антиоксидантной активности железо-восстанавливающим методом  $N(e^-)$  – число электронов, отдаваемых одним моль веществ: 1 – кверцетин; 2 – дигидрокверцетин; 3 – аскорбиновая кислота,  $T = 15^\circ C$

По положению экспериментальных данных на рис.1 очевидно, что суммарная антиоксидантная активность дигидрокверцетина в аналогичных условиях значительно меньше, чем кверцетина, но единую количественную оценку относительной антиоксидантной активности в данном случае предложить невозможно, - результат будет зависеть от времени инкубации реакционной среды. Поэтому для индивидуальных антиоксидантов можно различать, как минимум, три количественные характеристики: кинетическую, емкостную и относительную промежуточную.

#### Кинетическая характеристика АОА

Для многих методов, в том числе и железо-восстанавливающих, определение констант скоростей реакций выполнить без специального оборудования не так просто, рис.2.

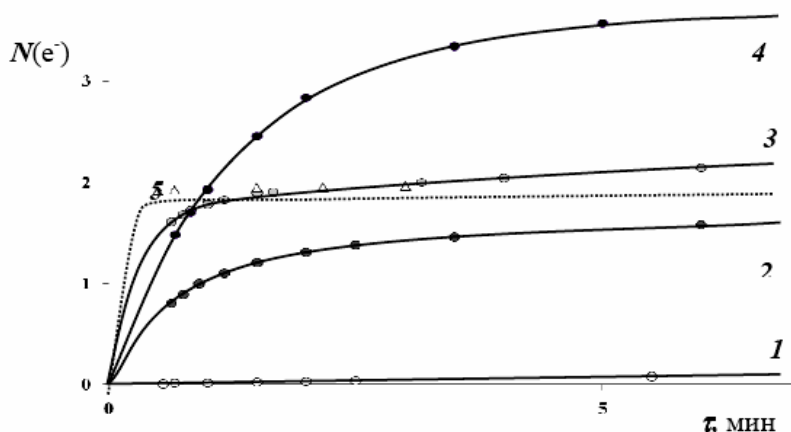


Рис.2. Начальный участок развития системы «антиоксидант –  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  - дипиридил. Антиоксиданты: 1 – *para*-кумаровая; 2 – феруловая; 3 – кофейная, 4 – синаповая и 5 – аскорбиновая кислоты;  $23^\circ C$

Так, *para*-кумаровая кислота является слабым антиоксидантом – окраска в реакционной смеси развивается медленно. В случае феруловой кислоты реакция протекает заметно быстрее, причем легче всего она теряет первые два электрона, но в обоих случаях экспериментальные данные не соответствуют первому порядку по антиокси-



данту, следовательно, и продукт этой реакции далее окисляется ионами железа (III). Концентрация кофейной кислоты в течение первых 30 секунд уменьшается примерно на 75 % с потерей 2-х электронов, а дальнейшие превращения происходят даже медленнее, чем в случае феруловой кислоты. Начальная скорость окисления синаповой кислоты несколько больше, чем феруловой, но меньше, чем кофейной, а вот скорость вторичных превращений у нее наивысшая среди рассматриваемых соединений. Аскорбиновая кислота в аналогичных условиях практически полностью окисляется за 30 секунд.

#### **Емкостная характеристика АОА**

Для индивидуальных антиоксидантов можно определить характеристику, принципиально отличающуюся от кинетической, и которую формально можно назвать псевдоэкстенсивной, - не в смысле ее зависимости от концентрации. Эта характеристика, для которой наиболее подходит название емкостная, может быть определена числом электронов, которые может отдать исходное вещество по последовательным реакциям с избранным окислителем.

Рассмотренные выше параметры не тождественны и дополняют друг друга: вещество А может быть более сильным антиоксидантом в кинетическом смысле, но более слабым – в емкостном. Поэтому вывод о соотношении антиоксидантных активностей веществ зависит от способа определения этих параметров. Например, интенсивно пропагандируемое в качестве антиоксиданта вещество – дигидрокверцетин [11], по емкостной антиоксидантной активности (по нашим данным для различных окислителей -  $Fe^{3+}$  и DPPH) в 4-5 раз слабее, чем кверцетин. В то же время при использовании в качестве окислителя  $Cu^{2+}$  и выдержке реакционной смеси в течение 120 мин емкостные параметры антиоксидантной активности кверцетина, катехина и дигидрокверцетина оказываются примерно одинаковыми (чуть более 9 электронов на один моль флавоноида) [9]. В цитированной работе по железо-восстанавливающей методике антиоксидантная активность дигидрокверцетина и в начальный период примерно в 5 раз меньше, чем для кверцетина.

Одно из решений для получения более стабильных значений емкостных характеристик АОА - ускорение реакций, для которого имеются две альтернативы: увеличение температуры, что не очень удобно, или более простое решение - увеличение концентрации оксиданта. При использовании тестовой системы  $Fe^{3+}$  -  $\alpha, \alpha'$ -дипиридил [5] такая возможность существует, поскольку избыток ионов железа (III) ускоряет процесс и не мешает определению железа (II) в окрашенном комплексе.

#### **Относительная промежуточная характеристика АОА**

Пусть некоторое вещество Б относительно медленно восстанавливает избранный оксидант: для полного завершения реакции необходима нерационально длительная инкубация смеси. Тогда в простейшем случае можно найти соединение А, характер временной зависимости превращения которого подобен веществу Б. Под подобием в этом случае следует понимать совпадение положения экспериментальных точек в координатах «аналитический сигнал vs время инкубации» за счет масштабирования аналитического сигнала (умножения на константу) при,

- во-первых, сопоставлении результатов для двух различных концентраций одного и того же антиоксиданта, Б, (коэффициент масштабирования должен быть равным соотношению концентраций антиоксиданта) и,
- во-вторых, при сопоставлении исследуемого антиоксиданта с подобранным веществом сравнения, А. Тогда АОА вещества Б может быть выражена в единицах вещества А, причем этот параметр уже не будет зависеть от времени инкубации смеси.

Как было показано компьютерным моделированием [8], на начальном участке (т.е. при малых степенях превращения) аналитический сигнал прямо пропорционален концентрации антиоксиданта с приближающимся к нулю интерсептом,  $a(i)$ :

$$AC(i) = a(i) + b(i) \cdot [i], \quad (3)$$

где  $AC(i)$  – величина аналитического сигнала для антиоксиданта  $i$ ,  $b(i)$  – коэффициент пропорциональности, зависящий от времени выдерживания смеси, и от константы скорости первой стадии и/или констант скоростей последующих превращений для антиоксиданта  $i$ ,  $[i]$  – начальная концентрация этого антиоксиданта в смеси. В таком случае можно воспользоваться соотношением тангенсов углов наклона прямых линий



на графике «аналитический сигнал как функция количества добавленного антиоксиданта» чтобы выразить относительную антиоксидантную активность, взяв, например, вещество А в качестве вещества сравнения:

$$\text{АОА(Б)} = b(\text{Б})/b(\text{А}). \quad (4)$$

Если соблюдаются оговоренные условия, то результат не должен зависеть ни от концентрации исследуемых веществ, ни от времени инкубации реакционной смеси.

Известно деление чая на несколько типов, отличающихся способом ферментации, среди которых чаще всего выделяют два – зеленый и черный. Различие в химическом составе напитков, получаемых из этих материалов, хорошо известно [12] и не вызывает вопросов. Но относительно антиоксидантной активности можно обнаружить противоречащие друг другу данные. Так, например, известен вывод о примерно эквивалентной антиоксидантной активности обоих типов чая относительно окисления липопротеинов низкой плотности [13]; близкие результаты получены и при определении АОА по методу ТЕАС (trolox equivalent antioxidant capacity) [14]. Однако, полная антиоксидантная активность, определенная по погашению радикалов АВТС, 2,2'-азинобис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты), у черного чая оказалась в четыре раза более высокой по сравнению с зеленым чаем [15]. В этой же работе сообщается о том, что АОА, определенная по методу DPPH, оказалась примерно одинаковой для черного и зеленого чая. Примерное равенство антиоксидантной активности этих типов чая вытекает и из данных, представленных в работе [16], но удивляют только большие доверительные интервалы для приведенных значений АОА (до 50%).

Для экстрактов зеленого и черного чая развитие окраски (при использовании системы «антиоксидант –  $\text{Fe}^{3+}$  –  $\alpha, \alpha'$ -дипиридил») по нашим данным, как и для индивидуального кверцетина (рис.1), развивается по пропорциональной схеме, рис.3.

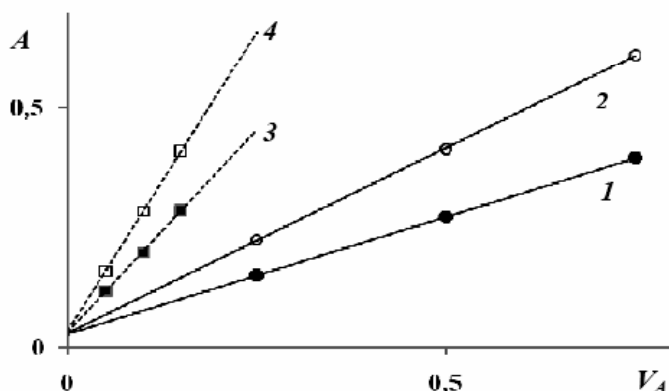


Рис.3. Соотношения «оптическая плотность vs объем аликвотной порции раствора антиоксиданта» в системе «антиоксидант –  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  – дипиридил»  
Антиоксиданты: раствор кверцетина при выдержке смеси в течение 1 – 10 мин, 2 – 40 мин;  
напиток чая Brooke Bond при выдержке смеси в течение 3 – 10 мин, 4 – 40 мин.

Это позволило определить относительную антиоксидантную активность чая – по уравнению (4) с использованием кверцетина в качестве вещества сравнения.

С использованием предложенной выше методики были одновременно исследованы железо-восстанавливающая активность чая и кверцетина. По полученным величинам оптической плотности определяли функциональный вид зависимости «оптическая плотность vs количество раствора антиоксиданта», и рассчитывали относительную антиоксидантную активность по уравнениям (3) и (4), с поправкой на концентрацию раствора кверцетина, если количество антиоксидантов определяется объемом аликвотных порций:

$$\begin{aligned} A(i) &= a(i) + b(i) \cdot V(i), \\ \text{АОА(Б)} &= c(\text{А}) b(\text{Б})/b(\text{А}), \end{aligned}$$



где  $A(i)$  – оптическая плотность реакционной смеси при заданном времени выдержки;  $V(i)$  – объем аликвотной порции антиоксиданта,  $a(i)$  – интерсепт, приближающийся к оптической плотности «холостой пробы»,  $b(i)$  – тангенс угла наклона прямолинейной зависимости для  $i$ -го антиоксиданта, АОА(Б) – относительная антиоксидантная активность вещества Б,  $c(A)$  – концентрация раствора вещества сравнения (кверцетина).

О том, каких результатов удастся добиться при этом, можно судить по данным, представленным в таблице.

Таблица

**Относительная (промежуточная) антиоксидантная активность напитков чая, определенная по железо-восстанавливающей методике**

t <sub>inc</sub> <sup>*</sup> , мин	Относительная антиоксидантная активность напитков чая, ммоль/л кверцетина									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
15	3.13	4.68	4.37	3.14	2.85	2.24	2.7	2.27	2.71	3.59
25	3.10	4.77	3.87	2.83	2.64	2.23	2.37	1.95	2.30	3.11
35	3.10	4.87	3.71	2.85	2.59	2.34	2.30	1.91	2.26	3.04
45	2.99	4.63	3.84	2.93	2.75	2.39	2.41	2.00	2.36	3.18
Среднее:	3.08	4.74	3.95	2.94	2.71	2.30	2.44	2.04	2.41	3.23
Δ(max) <sup>**</sup> , %	2.9	2.8	11	6.8	4.3	2.9	10	12	13	11

\* - время инкубации реакционной смеси; \*\* - относительное максимальное отклонение от среднего значения. Напитки марок: 1 - China Green Special (Curtis); 2 - Ceilon Sunny Gold (Curtis); 3 - Принцесса Ява; 4 - Lipton Label Tea; 5 - Brooke Bond; 6 - Pickwick Strawberry; 7 - Японская зелёная Банча (Gruenewald); 8 - Китайский, Чун Ме (Gruenewald); 9 - Генпаудер; 10 - Китайский, Сенга Ор.

Как видно из представленных данных, результаты определения относительной (промежуточной) антиоксидантной активности напитков получаются довольно близкими для различных времен инкубации реакционной смеси. Несколько завышенными оказались результаты для 15-минутной выдержки, хотя отклонение в этом случае от среднего значения для четырех различных времен выдержки смеси не превышает 13 %, подтверждая справедливость предложенного метода. Результаты для выдержки в течение 25 – 45 мин оказываются еще более близкими – расхождения между ними не превышает 2-3 %. Наивысшую относительную антиоксидантную активность проявил настой черного чая марки Ceilon Sunny Gold (Curtis); заметно уступил ему по антиоксидантной активности настой зеленого чая марки «Принцесса Ява», и с примерно таким же отставанием далее расположился один из исследованных зеленых чаев - China Green Special (Curtis). Для остальных марок получены достаточно близкие результаты.

### Заключение

В работе на основе анализа кинетических кривых превращения антиоксидантов, обычно оцениваемых по исчезновению оксиданта, предложена градация количественных критериев антиоксидантной активности по трем неэквивалентным и независимым параметрам: кинетическая, емкостная и относительная (промежуточная) антиоксидантная активность.

При этом экспериментально показано, что по антиоксидантной активности напитки чая подобны растворам кверцетина: восстановительная активность компонентов медленно падает в течение длительного времени. Следовательно, кверцетин может быть использован в качестве стандарта при определении относительной (промежуточной) антиоксидантной активности, не зависящей от времени инкубации и концентрации пробы, взятой при исследовании. Черный чай и зеленый чай, компоненты экстрактивных веществ которых имеют различное строение, тем не менее, имеют близкую относительную антиоксидантную активность.

### Список литературы

1. Sancez-Moreno C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems // Food Sci. Tech. Int. – 2002. – Vol. 8. – P.121-137.
2. Schleisier K., Harwat M., Bohm V., Bitsch R. Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods // Free Radic. Res. – 2002. – Vol. 36. – P. 177-187.



3. Huang D., Ou B., Prior R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays // *J. Agric. Food Chem.* – 2005. – Vol. 53. – P. 1841-1856.
4. Хасанов В.В., Рыжова Г.Л., Мальцева Е.В. Методы исследования антиоксидантов // *Химия растительного сырья.* – 2004. – №3. – С. 63-75
5. Темердашев З.А., Храпко Н.В., Цюпко Т.Г., Воронова О.Б., Балаба А.Н. Определение антиоксидантной активности пищевых продуктов с использованием индикаторной системы Fe(III)/Fe(II) – органический реагент // *Заводская лаборатория. Диагностика материалов.* – Т.72, №11. – С.15-19.
6. Huang D., Ou B., Prior R.L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays // *J. Agric. Food Chem.* – 2005. – Vol. 53. – P. 1841-1856.
7. Sánchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols // *J. Sci. Food Agric.* – 1998. – Vol. 76. – P. 270-276.
8. Дейнека В.И., Анисимович И.П., Михеев А.Ю., Мясникова П.А., Шапошник Е.И., Дейнека Л.А. О некоторых особенностях определения антиоксидантной активности. / *Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. научн. тр. / под ред. М.В. Гаврилина.* – Пятигорск: Пятигорская ГФА, 2009. – Вып. 64. – С. 415-418.
9. Mira L., M. Fernandez T., Santos M., Rocha R., Floréncio M.H., Jennings K.R. Interactions of Flavonoids with Iron and Copper Ions: A Mechanism for their Antioxidant Activity // *Free Rad. Res.* – 2002. – Vol. 36. – P. 1199-1208.
10. Balcerzak M., Tyburska A., Świącicka-Füchsel E. Selective determination of Fe(III) in Fe(II) samples by UV-spectrophotometry with the aid of quercetin and morin // *Acta Pharm.* – 2008. – Vol. 58. – P. 327-334.
11. Бабкин В.А., Малков Ю.А., Остроухова Л.А., Онучина Н.А., Еськова Л.А. Эффективный антиоксидант из древесины лиственницы // *Хвойные бореальной зоны.* – 2003. – Вып.1. – С. 108-113.
12. Яшин Я.И., Яшин А.Я., Черноусова Н.И. Хроматография чая // *Наука и жизнь.* – 2005. – №3. – С. 50-53.
13. Leong L.K., Su Y., Chen R., Zhang Z., Huang Y., Chen Z.-Y. Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants // *J. Nutr.* – 2001. – Vol. 131. – P. 2248-2251.
14. Poulter J. Antioxidants in tea // *BNF Nutr. Bull.* – 1998. – Vol. 23. – P. 203-210.
15. Gramza A., Pawlak-Lemańska K., Korczak J., Wąsowicz E., Rudzińska M. Tea extracts as free radical scavengers // *Polish J. Environ. Studies.* – 2005. – Vol. 14. – P. 861-867.

#### **PARAMETERS OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF COMPOUNDS: RELATIVE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF TEA**

**I.P. Anisimovitch**  
**V.I. Deineka**  
**L.A. Deineka**  
**P.A. Frolov**  
**P.A. Miasnikova**

*Belgorod State University,  
 Pobedy Str., 85, Belgorod,  
 308015, Russia  
 E-mail: deineka@bsu.edu.ru*

It is for the first time that compounds antioxidant activity particularities are discussed from kinetics as well as capacity points of view. For slow developing processes of «antioxidant – oxidant interaction» an idea of a relative antioxidant activity is proposed, exploring a proper reference substance. The relative antioxidant activity does not depend upon time of reaction mixture incubation as well as upon concentration. The latter has been shown to be valid for the determination of relative antioxidant activity of tea by ferric-reducing system with  $\alpha, \alpha'$ -dipyridyl as indicator and quercetin as a reference substance. It has been found that relative antioxidant activity of black and green tea has no substantial differences.

Key words: antioxidant activity, kinetics, capacity relative (intermediate) parameters, ferric-reducing system, tea.