

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Национальный исследовательский Томский государственный университет»

На правах рукописи



Дамзина Анна Андреевна

ТВЕРДОФАЗНОЕ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММАРНОГО
СОДЕРЖАНИЯ АНТИОКСИДАНТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНДИКАТОРНОЙ
СИСТЕМЫ Cu (II) / Cu (I)- НЕОКУПРОИН (Nc), ИММОБИЛИЗОВАННОЙ В
ПОЛИМЕТАКРИЛАТНУЮ МАТРИЦУ

1.4.2. – Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
д.х.н., профессор КАХ ТГУ Гавриленко Наталия Айратовна

Томск – 2024

Оглавление

Введение.....	4
Глава 1 Методы определения антиоксидантов	9
1.1 Методы определения антиоксидантов на основе переноса электрона.....	9
1.2 Твердофазные системы.....	19
1.3 Способы выражения и оценка правильности определения суммарного содержания антиоксидантов	24
Глава 2 Аппаратура, объекты исследования и методики эксперимента	32
2.1 Используемые вещества и реагенты	32
2.2 Аппаратура.....	34
2.3 Методики проведения экспериментов	35
2.3.1 Приготовление колориметрического сенсора	35
2.3.2 Подготовка объектов к анализу.....	35
2.3.3 Методика твердофазного спектрофотометрического определения Σ АО методом CUPRAC (ПММ-Cu(II)-Nc).....	36
2.3.4 Методика определения фенольных соединений	37
2.3.5 Методика количественного определения флавоноидов и танинов	39
2.3.6 Методика количественного определения антоцианов.....	41
2.3.7 Исследование условий взаимодействия антиоксидантов с индикаторной системой Cu(II)-Nc, иммобилизованной в ПММ	43
2.3.8 Методика твердофазного спектрофотометрического определения суммарного содержания АО методом CUPRAC (ПММ-Cu(II)-Nc) с использованием колориметрии цифрового изображения.....	44
2.3.9 Метод оценки показателей качества разработанных методик.....	45
Глава 3 Твердофазное спектрофотометрическое определение суммарного содержания антиоксидантов с использованием индикаторной системы Cu(II)-Nc, иммобилизованной в ПММ.....	48
3.1 Создание аналитической системы ПММ-Cu(II)-Nc для определения суммарного содержания антиоксидантов.....	48

3.2 Условия взаимодействия антиоксидантов с окислительно-восстановительной системой Cu(II)-(Nc), иммобилизованной в ПММ.....	52
3.3 Результаты исследования влияния выбора вещества-стандарта на определение суммарного содержания антиоксидантов с использованием системы Cu(II)-Nc, иммобилизованной в ПММ.....	55
3.4 Оценка показателей качества твердофазного спектрофотометрического способа определения Σ АО с использованием системы Cu(II)-Nc, иммобилизованной в ПММ.....	60
3.4.1 Сопоставительный анализ суммарного содержания антиоксидантов с аналогичными показателями пищевых продуктов.....	60
3.4.2 Определение основных характеристик погрешности измерения суммарного содержания антиоксидантов с использованием ПММ-Cu(II)-Nc	72
Глава 4 Применение алгоритма интервальной оценки суммарного содержания антиоксидантов методом CUPRAC с использованием ПММ-Cu(II)-Nc.....	79
4.1 Интервальные оценки суммарного содержания антиоксидантов для анализа соковой продукции.....	79
4.2 Исследование возможности нивелирования коэффициентов чувствительности определения антиоксидантов.....	89
4.2.1 Влияние времени контакта ПММ-Cu(II)-Nc с раствором АО.....	89
4.2.2 Влияние отношения объема анализируемого раствора к массе твердой фазы.....	91
4.2.3 Колориметрия цифрового изображения Cu(I)-Nc-ПММ после контакта с растворами антиоксидантов.....	95
Заключение.....	102
Выводы.....	105
Список используемой литературы.....	107

Введение

Актуальность работы обусловлена необходимостью разработки новых и корректировке существующих способов определения суммарного содержания антиоксидантов, препятствующих окислительному стрессу в организме человека. К антиоксидантам (АО) относят витамины, ферменты, фенольные соединения и подобные вещества, которые поступают вместе с продуктами питания и напитками в организм человека и ингибируют цепные реакции образования свободных радикалов, которые приводят к окислительному стрессу. Классическим подходом для оценивания суммарного содержания АО (Σ АО) является использование окислительно-восстановительных систем, т.к. большинство АО характеризуются высокой восстановительной активностью, в частности, к катионам металлов переменной валентности (Fe(III), Cu(II), Ce(IV), Cr(VI), Au(III) и Ag(I)). При этом возрос интерес к портативным сенсорным платформам на основе использования аналитических систем, иммобилизованных на твердых носителях, которые позволяют повысить чувствительность методики, а также сделать ее более удобной и недорогой для массового применения за счет миниатюризации и экономии аналитических реагентов. Перспективным представляется совмещение классического подхода с индикаторной системой Cu(II)-неокупроин (Nc) и проведение окислительно-восстановительной реакции в среде полиметакрилатной матрицы (ПММ) для твердофазного определения Σ АО. Применение ПММ в качестве твердой фазы позволяет проводить иммобилизацию аналитических реагентов без потери способности вступать в реакцию с определяемым веществом, при этом продукты аналитической реакции не влияют на прозрачность сенсорного материала, что дает возможность определения Σ АО в окрашенных продуктах питания и напитках с использованием стандартного спектрофотометрического оборудования.

Цель работы. Разработка аналитической системы медь-неокупроин в среде полиметилметакрилатной матрицы (ПММ-Cu(II)-Nc) и использование ее в качестве аналитической формы для твердофазно-спектрофотометрического

определения суммарного содержания АО в лекарственных настойках и продуктах питания.

Для реализации цели поставлены следующие **задачи**.

1. Изучение иммобилизации комплекса Cu(II)-Nc и условий проведения аналитической реакции с индивидуальными АО в среде ПММ для создания твердофазной аналитической системы ПММ-Cu(II)-Nc.

2. Теоретическое и экспериментальное обоснование возможности использования системы ПММ-Cu(II)-Nc для определения Σ АО в зависимости от выбора вещества-стандарта.

3. Разработка способа твердофазно-спектрофотометрического определения Σ АО с использованием ПММ-Cu(II)-Nc в лекарственных настойках и продуктах питания, расчет показателей качества методики методом варьирования навески согласно РМГ 61-2010.

4. Применение алгоритма интервальных оценок к разработанному твердофазному спектрофотометрическому способу определения Σ АО в лекарственных настойках и продуктах питания без использования вещества-стандарта.

Научная новизна. Впервые изучена иммобилизация неокупроина и Cu(II) путем твердофазной экстракции в аналитическую среду ПММ и получена аналитическая система ПММ-Cu(II)-Nc для определения Σ АО в лекарственных настойках и продуктах питания. Установлено отсутствие влияния среды ПММ на реакционную способность иммобилизованного комплекса Cu(II)-Nc по отношению к АО в анализируемых образцах. Впервые исследованы особенности взаимодействия АО с ПММ-Cu(II)-Nc от pH раствора, обусловленные строением и константами ионизации АО. Доказано, что для всех исследуемых АО существует общий диапазон pH 3–4, в котором протекает их окислительно-восстановительная реакция с Cu(II)-Nc в среде ПММ.

Впервые показана возможность использования аналитической системы ПММ-Cu(II)-Nc для определения суммарного содержания АО с аскорбиновой кислотой, тролоксом, галловой кислотой и лютеолином в качестве вещества-

стандарта с погрешностью определения, не превышающей 18-24 % и не зависящей от вещества-стандарта. Для учета влияния разной чувствительности определения вещества-стандарта на величину $\Sigma\text{АО}$ впервые применен алгоритм интервальной оценки методом CUPRAC с использованием аналитической системы ПММ-Cu(II)-Nc без вещества-стандарта.

Практическое значение работы. Разработан оригинальный твердофазно-спектрофотометрический способ определения $\Sigma\text{АО}$, основанный на их реакции с Cu(II)-Nc в твердой прозрачной среде ПММ. Рассчитанные аналитические и метрологические характеристики предложенного способа соответствуют современным методикам, одновременно способ имеет преимущества в области «зеленой химии», связанные с отсутствием применения токсичных растворителей и минимизацией использования реактивов, в том числе при пробоподготовке.

Аналитическая система ПММ-Cu(II)-Nc применена для определения $\Sigma\text{АО}$ в лекарственных настойках, соковой продукции и чае. Доказано влияние природы АО на аналитические характеристики их суммарного определения на основе расчета показателей качества методом варьирования навески согласно РМГ 61-2010. Показана возможность регистрации колориметрического аналитического сигнала путем обработки цифрового цветного изображения образцов ПММ-Cu(II)-Nc после контакта с растворами АО. Использование параметра желтизны в качестве аналитического сигнала позволяет проводить определение АО в диапазоне определяемых содержаний от 0,7 до 53,0 10^{-6} , моль-экв/л, что сопоставимо с результатами метода твердофазной спектрофотометрии.

Положения и результаты, выносимые на защиту.

1. Аналитическая система ПММ-Cu(II)-Nc для определения $\Sigma\text{АО}$, полученная путем иммобилизации реагентов Cu(II) и неокупроина в среде ПММ.
2. Рабочие условия определения $\Sigma\text{АО}$ новой аналитической системой ПММ-Cu(II)-Nc с возможностью одновременной твердофазно-спектрофотометрической и колориметрической регистрации аналитического сигнала.
3. Результаты оценивания влияния выбора вещества-стандарта на определение $\Sigma\text{АО}$ с использованием системы ПММ-Cu(II)-Nc.

4. Оценка показателей качества твердофазного спектрофотометрического способа определения Σ АО с использованием аналитической системы ПММ-Cu(II)-Nc.

5. Результаты применения алгоритма интервальной оценки Σ АО методом CUPRAC с использованием аналитической системы ПММ-Cu(II)-Nc.

Личный вклад автора. Автором проведен анализ литературных данных по теме диссертации, экспериментальные исследования аналитической системы ПММ-Cu(II)-Nc и апробация разработанного способа определения Σ АО в лекарственных настойках и продуктах питания. Автором, совместно с научным руководителем, сформулирована актуальность, определена цель и поставлены задачи исследования, спланирована экспериментальная часть, сформулированы основные выводы и научные положения, подготовлены публикации.

Автор выражает благодарность к.х.н., доценту Саранчиной Н. В. за интерес, проявленный в ходе написания работы и обсуждения полученных результатов.

Апробация работы. Основные результаты работы изложены и обсуждены на научных и научно-практических конференциях международного уровня: XXII, XXIII и XXV Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых им. Л. П. Кулёва и Н. М. Кижнера «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2022, 2023, 2024 г.); XIX, XXI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2022, 2024 г.)

Диссертационная работа выполнена в соответствии с направлением научных исследований кафедры аналитической химии Национального исследовательского Томского государственного университета и при поддержке Научного фонда им. Д. И. Менделеева № 8.1.33.2017.

Публикации. По тематике диссертационной работы опубликовано 8 научных работ, в том числе 3 статьи в журналах, индексируемых в Scopus и включенных в рекомендованные ВАК РФ рецензируемые научные издания, 5

публикаций в сборниках материалов всероссийских с международным участием научных конференций, включенных в РИНЦ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 123 страницах, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, заключения и списка цитируемой литературы из 146 наименований. Работа содержит 37 рисунков и 35 таблиц.

Глава 1 Методы определения антиоксидантов

1.1 Методы определения антиоксидантов на основе переноса электрона

Многочисленные исследования, посвященные антиоксидантам и их положительному влиянию на организм человека [1-6], привели к разработке различных способов определения суммарного содержания АО. В настоящее время существует большое разнообразие данных методов, которые основаны на химических, физико-химических и биохимических механизмах [7]. С помощью данных подходов возможно определение суммарного содержания антиоксидантов в продуктах питания, напитках, лекарственных настойках, биологических активных добавках (БАД), а также в «живой» клетке [8]. Интерес к определению Σ АО в пищевых продуктах, настойках и БАДах связан со способностью АО уменьшать негативное влияние активных форм кислорода и замедлять процессы перекисного окисления липидов, что приводит к снижению развития некоторых хронических заболеваний и увеличению срока хранения пищевых и фармацевтических продуктов соответственно. В тоже время определение суммарного содержания антиоксидантов в клетке основано на способности антиоксидантов образовывать защитную систему клетки, удаляя и подавляя активные формы кислорода и азота, а также восстанавливая повреждения в структуре клетке [9]. При этом для определения суммарного содержания антиоксидантов в пищевых, фармацевтических продуктах и «живых» клетках используются различные методы анализа, классификация которых представлена ниже. R. Арак с коллегами, используя комплексный подход к существующему многообразию анализов и опыт других исследователей [9-13], предложил разделить все известные методы на пять категорий [14]:

1. Методы на основе переноса атома водорода ((НАТ)-based assays);
2. Методы на основе переноса электрона ((ЕТ)-based assays);
3. Методы на основе переноса атома водорода и электрона (НАТ/ЕТ);
4. Методы *in vivo*;
5. Гибридные методы.

Первая группа методов – анализы на основе переноса атома водорода измеряют способность антиоксиданта подавлять свободные радикалы путем отдачи атома водорода. Типичными примерами анализов на основе НАТ-являются: oxygen radical absorbance capacity (ORAC), total radical trapping antioxidant parameter (TRAP), total oxidant scavenging capacity (TOSC), crocin bleaching assay (CBA) и β -carotene bleaching assay [15-19]. К достоинствам данной группы можно отнести быстрое протекание химических реакций от нескольких секунд до нескольких минут и не зависимость механизма от природы растворителя и pH. Недостатком является применение дорогостоящих реагентов и оборудования, нестабильность используемых реактивов и осложнение механизма в присутствии металлов-восстановителей, что может привести к ошибочно завышенным результатам анализа [20].

Вторая группа методов – анализы на основе переноса электронов выявляют способность антиоксиданта переносить электрон для восстановления ионов металлов, карбониллов и радикалов. Спектроскопические анализы на основе ET-включают: анализ Фолина-Чокальтеу, железовосстанавливающую антиоксидантную способность (ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay), медь восстанавливающую антиоксидантную способность (cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay), церий и хром восстанавливающую способность соответственно (cerium reducing antioxidant capacity (CERAC) assay и chromium reducing antioxidant capacity (CHROMAC) assay) [21-25]. Кроме того, к анализам на основе ET- также относятся электрохимические и нанотехнологические методы: циклическая, дифференциально-импульсная, квадратно-волновая вольтамперометрия [26-28] и колориметрические методы анализа, использующие наночастицы благородных металлов (Au, Ag) [29-33]. Достоинства данной группы методов – простота аппаратного оформления, доступность и стабильность реагентов. Недостатки – более медленное протекание химических реакций в отличие от НАТ- анализов и плохая воспроизводимость результатов анализов в присутствии примесей [22].

При этом не все методы определения Σ АО можно отнести к механизмам, основанным на НАТ- assay или ЕТ- assay, в некоторых подходах используются оба механизма. Анализы смешанного механизма (третья группа методов) (НАТ/SET) включают: анализ АВТС (2,2'-азино-бис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота), анализ удаления радикалов DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил) и анализ удаления радикалов DMPD (N, N-диметил-п-фенилендиамин дигидрохлорид) [34, 35].

Анализы *in vivo* – это четвертая группа методов в классификации, предложенной R. Арак, которые основаны на определении суммарного содержания антиоксидантов в клетке. Анализы *in vivo* позволяют оценить восстановительный потенциал антиоксидантных соединений, способность улавливать свободные радикалы, а также проницаемой мембраны клетки и её метаболизм. В отличие от методов *in vitro*, *in vivo* рассматривают антиоксиданты как соединения, способные изменять окислительно-восстановительное состояние клетки. Однако недостатками данных анализов является то, что они более трудоемкие и дорогостоящие [11, 36-38].

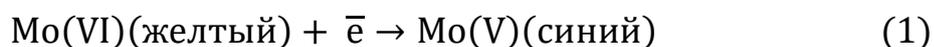
Еще одна группа методов – это анализы высокоэффективного скрининга суммарного содержания антиоксидантов, которые представляют собой сочетание высокоэффективной жидкостной хроматографии и методов *in vitro* (анализ DPPH, FRAP, АВТС) [39-43]. Совмещение таких подходов позволяет проводить более селективное и чувствительное онлайн детектирование антиоксидантов. Недостатком таких методов является использование дорогостоящего оборудования.

Из вышеизложенного следует, что наиболее удобными и простыми в реализации являются методы, основанные на переносе электрона.

Определение полифенольных соединений методом Фолина-Чокальтеу

Анализ Фолина-Чокальтеу представляет собой реакцию, основанную на переносе электронов, которая измеряет восстановительную способность антиоксидантов. Перенос электронов связан с окислением фенольных соединений в щелочной среде реактивом, содержащим фосфотвольфрамовые и

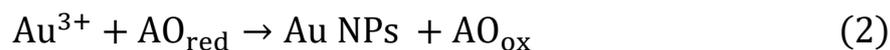
фосфомолибденовые гетерополикислоты, с получением окрашенного продукта синего цвета (вольфрамовая синь или гетерополисини), максимум поглощения которого соответствует $\lambda=750-765$ нм, а интенсивность окраски – пропорциональна содержанию полифенольных соединений в анализируемом образце [44] (1):



Метод Фолина-Чокальтеу является улучшенным вариантом метода определения фенольных соединений с использованием реактива Фолина-Дениса, открытого в 1912 году профессорами Гарвардской медицинской школы О. Фолиным и У. Г. Денисом для определения полифенольных соединений в моче человека [45]. В 1927 году для устранения недостатка при использовании реактива Фолина-Дениса (образование белого осадка), в реактив дополнительно внесли сульфат лития и увеличили долю фосфомолибденовой кислоты в комплексе гетерополикислот (для повышения чувствительности), что и привело к созданию метода и реактива Фолина-Чокальтеу. Первоначально метод Фолина-Чокальтеу предназначался для определения содержания тирозина, триптофана и белка, но оказался подходящим и для количественного определения фенольных соединений [46]. В настоящее время метод Фолина-Чокальтеу претерпел разнообразные модификации, связанные с изменением объемов, соотношения и концентраций реактивов, и используется для определения содержания полифенольных соединений в растительных, пищевых продуктах и биологических образцах отечественными и зарубежными авторами [47-49]. Результаты анализа Фолина-Чокальтеу хорошо коррелируют с результатами, полученными с помощью других антиоксидантных анализов, используемых в анализе пищевых продуктов, таких как ABTS и DPPH. Однако недостатком анализа является не специфичность реагента; реагент хорошо реагирует на фенолы, лимонную кислоту, многие амины, аминокислоты и сахара из-за высокого окислительно-восстановительного потенциала, также с помощью данного анализа невозможно определение липофильных антиоксидантов [50].

Использование наночастиц благородных металлов для определения содержания антиоксидантов

В последнее время возрос интерес к антиоксидантным анализам на основе наночастиц (NP). Эти анализы либо используют способность АО восстанавливать частицы благородных металлов (AuCl_4^- , Ag^+) до соответствующих наночастиц (AuNPs, AgNPs) [51-54] по реакции:



либо применяют антиоксиданты в качестве восстановителей для роста и укрупнения наночастиц [55-57].



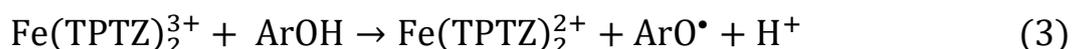
При этом оптическая плотность коллоидных суспензий наночастиц зависит от свойств поверхностно-резонансных плазмонных полос, наблюдаются интенсивные колориметрические и хроматические переходы, которые используются в качестве меры антиоксидантной активности. Недостатком методов с использованием наночастиц благородных металлов для определения содержания антиоксидантов является наличие множества механизмов реакции и принципов определения АО, которые требуют уточнения.

Методы с использованием других окислительных реагентов

Метод CERAC основан на окислении АО сульфатом Ce(IV) в разбавленной серной кислоте при комнатной температуре, с дальнейшим определением остаточного Ce(IV) при $\lambda = 320$ нм [24]. Метод CHROMAC включает в себя восстановление Cr(VI) антиоксидантами до Cr(III) в кислом растворе при pH 2,8 в течение 50 мин. Оставшийся Cr(VI) измеряют спектрофотометрически с использованием 1,5-дифенилкарбазида при $\lambda = 540$ нм [25]. Метод Permanganate reducing antioxidant capacity основан на проведении окислительно-восстановительных реакций между АО и перманганатом калия в сернокислой среде, что приводит к обесцвечиванию KMnO_4 . Изменение цвета перманганата калия пропорционально концентрации антиоксидантов; поэтому, измеряя поглощение при длине волны 535 нм, можно экстраполировать восстанавливающую способность АО [58].

Железовосстанавливающая антиоксидантная способность (Ferric reducing antioxidant power)

Метод FRAP впервые был опубликован Benzie и Strain в 1996 году, как экспрессный способ оценки содержания АО в плазме крови [59] и связан с восстановлением комплексного соединения железа с 2,4,6-трипиридил-*s*-триазином (Fe(III) – TPTZ) аналитами – антиоксидантами до комплекса $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{2+}$ (синее окрашивание, $\lambda_{\text{max}} = 593 \text{ нм}$), согласно уравнению (3), стандартным веществом выступали ионы Fe^{2+} :



Интенсивность окраски образовавшегося комплексного соединения, т.е. его количество пропорционально содержанию антиоксидантов в исследуемых образцах, например, в продуктах питания или биологических объектах [59-65]. Недостатком метода является невозможность проводить определение антиоксидантов тиолового типа и каротиноидов, а также большая кислотность используемой системы [66, 67]. Позднее были предложены модифицированные способы классического метода FRAP, основанные на образовании окрашенных комплексных соединений железа Fe(II) с другими реагентами, такими как гетерополициклические диамины *o*-фенантролин и 2,2'-дипиридил ($\lambda = 512 \text{ нм}$ и $\lambda = 522 \text{ нм}$ соответственно) [62, 68-71], пиридиндикарбоновая кислота [72] и феррозин [73].

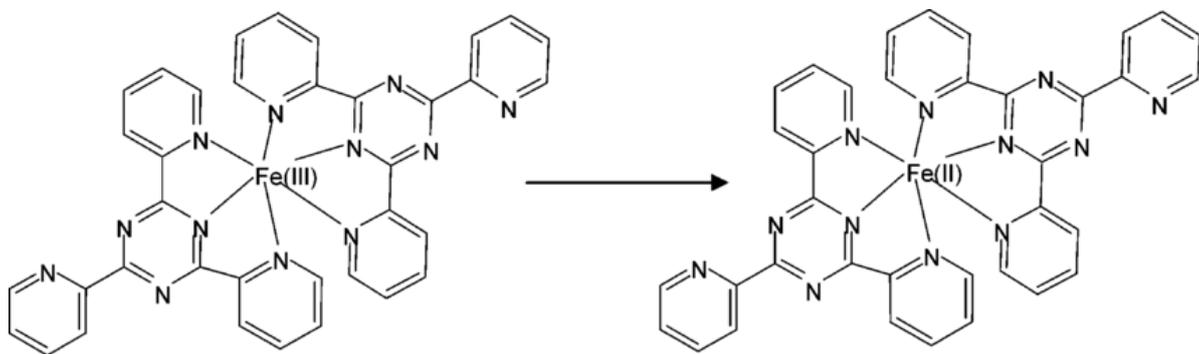
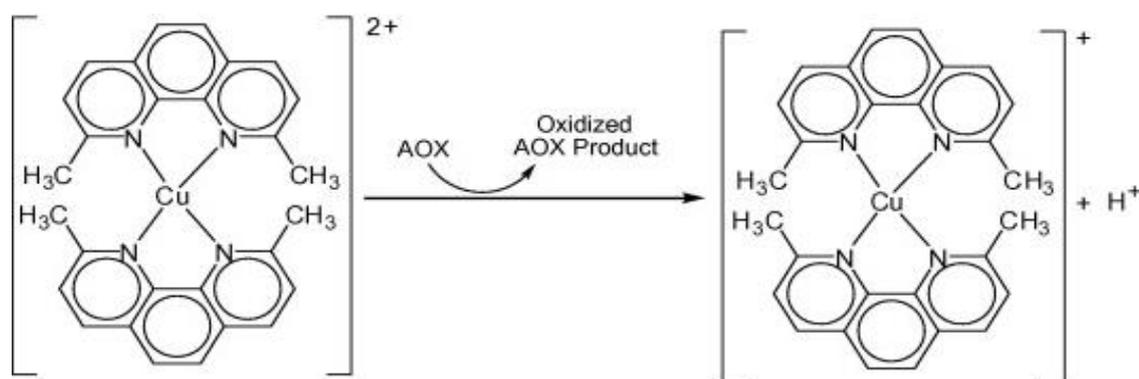
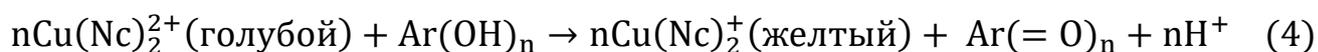


Рисунок 1 – Схема реакции восстановления в методе FRAP при взаимодействии с АО [20]

Медь восстанавливающая антиоксидантная способность (Cupric reducing antioxidant capacity)

Классический метод CUPRAC

Метод CUPRAC был предложен в начале 2000-х годов турецким химиком R. Арак с коллегами [74] и связан с измерением оптической плотности комплексного соединения желтого цвета Cu(I)-Nc, образующего в результате окислительно-восстановительной реакции антиоксидантов с реагентом метода CUPRAC (неокупроин (2,9-диметил-1,10-фенантролин) в комплексе с Cu (II)), при $\lambda = 450$ нм. Реакция восстановления в методе CUPRAC протекает согласно уравнению, представленному ниже. В ходе реакции фенольные группы антиоксидантов окисляются до Ar=O, аскорбиновая кислота до дегидроаскорбиновой кислоты, а тиолы до соответствующих дисульфидов. При этом соотношение компонентов (меди и неокупроина) в реагенте метода CUPRAC выше, чем стехиометрически необходимо для смещения окислительно-восстановительного равновесия в сторону продуктов реакции.



где АОХ – антиоксидант.

Рисунок 2 – Схема реакции восстановления в методе CUPRAC при взаимодействии с АО [14]

Следует отметить, что при протекании окислительно-восстановительной реакции в методе CUPRAC фактическим окислителем является $\text{Cu}(\text{Nc})_2^{2+}$, а не

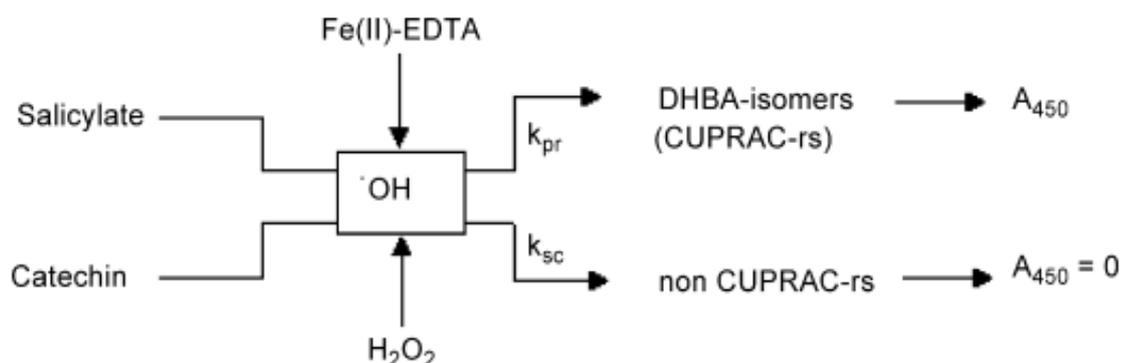
просто Cu^{2+} , так как потенциал комплекса Cu(II/I)-Nc (0,60 В) намного выше, чем у пары $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ (0,17 В) [75], что соответствует окислительно-восстановительному потенциалу многих биологически активных антиоксидантов (0,20 - 0,60 В), позволяя окислить их. А количество образующегося хелата (Cu(I)-Nc) эквивалентно суммарному содержанию антиоксидантов в растворе.

В качестве лиганда для стабилизации иона Cu(II) в методе CUPRAC может выступать не только неocupроин, но и другие производные фенантролина, такие как, 2,9-диметил-4,7-дифенил-1,10-фенантролиндисульфоновая кислота и бицинхониновая кислота [76, 77], а также тетрабензо[b,f,j,n]-[1,5,9,13] тетраазациклогексадецин [78]. Однако только неocupроин нашел широкое применение в качестве комплексообразователя при определении суммарного содержания антиоксидантов [79-83]. Так как использование бицинхониновой кислоты в качестве лиганда приводит к невозможности поддержания избытка свободных ионов Cu(II) , что вызывает изменение окислительно-восстановительного потенциала системы и ошибки при определении $\Sigma\text{АО}$, 2,9-диметил-4,7-дифенил-1,10-фенантролиндисульфоновая кислота в комплексе с Cu(I) имеет более высокий общий заряд, из-за присутствия отрицательно заряженных сульфонатных групп на фенантролиновом кольце, а индикаторная система Cu(II)/Cu(I) -тетрабензо[b,f,j,n]-[1,5,9,13] тетраазациклогексадецин нитрат обладает низким окислительно-восстановительным потенциалом, что ограничивает ее применение для определения широкого круга восстановителей.

Модифицированные методы на основе метода CUPRAC

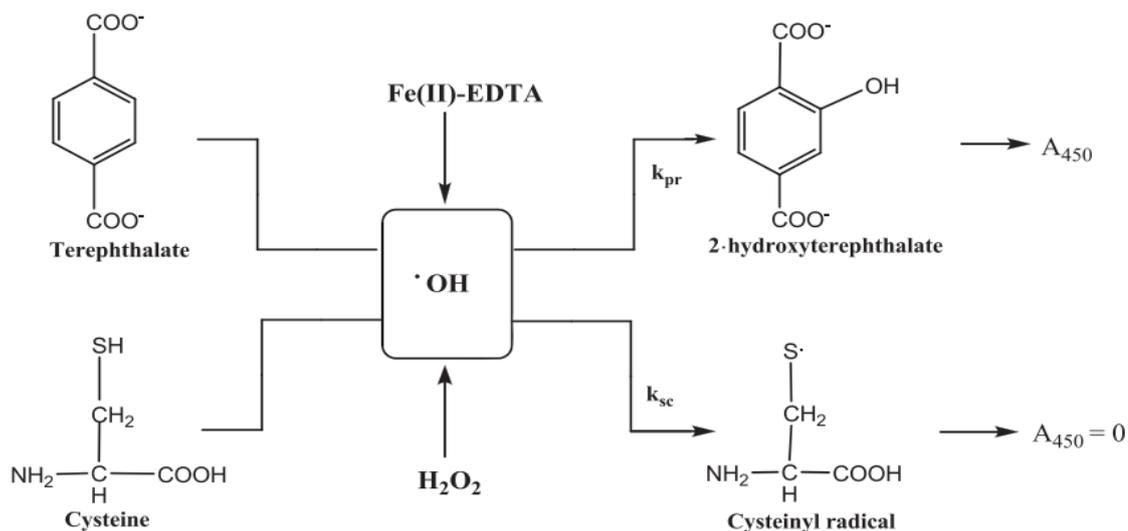
Вместе с тем классический метод CUPRAC дает начало многим модифицированным методам исследования антиоксидантов [50]. Например, авторы [84-86] предложили исследовать способность улавливания гидроксильных радикалов антиоксидантами-поглотителями в присутствии бензоатов, салицилата натрия или терефталата в сочетании с классическим методом CUPRAC. Генерацию гидроксильных радикалов проводили, используя систему Фентона (Fe(II) – этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), H_2O_2), ЭДТА необходима для хелатирования железа. После чего добавляли бензоаты, салицилат натрия или

терефталат и антиоксидант-поглотитель, инкубировали на водяной бане при 37 °С, добавляли реагенты метода CUPRAC и измеряли поглощение при 450 нм относительно раствора без антиоксиданта-поглотителя. Присутствие антиоксиданта-поглотителя в реакционной среде способствовало уменьшению поглощения при 450 нм вследствие связывания гидроксильных радикалов антиоксидантом. На рисунке 3 и 4 представлены схемы конкурентных реакций за поглощение гидроксильных радикалов.



где k_{pr} , k_{sc} – константы скорости реакции в отсутствие и присутствии антиоксиданта; DHBA-isomers – продукты гидроксирования салицилата после атаки гидроксильных радикалов.

Рисунок 3 – Схема конкурентных реакций салицилата натрия и катехина за поглощение гидроксильных радикалов [85]



где k_{pr} , k_{sc} – константы скорости реакции в отсутствие и присутствии антиоксиданта.

Рисунок 4 – Схема конкурентных реакций терефталата и цистеина за поглощение гидроксильных радикалов [86]

Применение таких подходов дало развитие менее длительным и более специфичным методам для обнаружения гидроксильных радикалов с тиобарбитуровой кислотой [87, 88].

Другими модификациями метода CUPRAC являются подходы, связанные со способностью антиоксидантов ингибировать активность «опасных» соединений, частиц, таких как пероксид водорода, супероксид радикал, или удалять их [89-91]. Для проведения анализа в реакционную смесь вносили «опасные» соединения, антиоксиданты, инкубировали на водяной бане при определённой температуре, после чего добавляли реагенты метода CUPRAC (медь-неокупроин) и измеряли поглощение при 450 нм относительно холостого раствора, не содержащего антиоксидантов. Результаты, полученные с помощью данные методов, хорошо согласуются с результатами высокоэффективной жидкостной хроматографии, а совмещение с классическим методом CUPRAC позволяет проводить определение активности удаления «опасных» веществ в видимой области спектра.

Таким образом [50], метод CUPRAC находит широкое применение, благодаря преимуществам:

- $\text{Cu}(\text{Nc})_2^{2+}$ является стабильным и доступным реагентом, легко окисляет АО тиолового типа;

- $\text{Cu}(\text{Nc})_2^{2+}$ имеет более низкий окислительный потенциал, чем железо в присутствии лигандов типа фенантролина ($\text{Fe}(\text{phen})_3^{3+}$) или трипиридилтриамина ($\text{Fe}(\text{tptz})_3^{3+}$);

- окислительно-восстановительная реакция образования цветного хелата $\text{Cu}(\text{I})\text{-Nc}$ относительно нечувствительна к ряду параметров: воздух, солнечный свет, влажность и pH до некоторой степени;

- метод позволяет одновременно определять водо- и жирорастворимые АО [92].

На данный момент известно всего несколько недостатков метода: в системе не должны присутствовать энтеросорбенты (например, ЭДТА) и сильные восстановители (кроме антиоксидантов); при наличии изолированных

углеводородных двойных связей (например, феруловая и кумаровая кислоты) вещество, вероятно, не атакуется комплексом Cu(II)-Ns .

1.2 Твердофазные системы

В последнее время наблюдается интерес к различным портативным сенсорным платформам на основе использования аналитических систем, иммобилизованных на твердых носителях, что позволяет повысить чувствительность и селективность используемой методики, а также сделать ее более удобной и недорогой для массового применения за счет экономии аналитических реагентов и миниатюризации процесса. Эти системы находят широкое применение: в твердофазной спектрофотометрии, в качестве готовых аналитических форм для тестовых систем [78], и оптических сенсоров [93-97], что приводит к повышению чувствительности используемых методик, делает их более удобными и недорогими для массового применения за счет экономии аналитических реагентов и миниатюризации процесса. Также твердофазные системы могут использоваться для количественной оценки содержания аналита без использования спектрофотометра через обработку цветного изображения. Внедрение в жизнь планшетных сканеров и различных компьютерных программ обработки цветного изображения дает возможность проведения быстрой, объективной и автоматизированной оценки цветометрических характеристик окрашенных объектов в фазе сорбента [98]. При этом твердые носители при определении суммарного содержания антиоксидантов являются не только средой для иммобилизации окислительно-восстановительных систем, но и могут выступать в качестве фазы для концентрирования полученных окрашенных продуктов после взаимодействия окислительно-восстановительных систем с антиоксидантами [99].

В качестве твердых носителей могут использоваться полимерные материалы природного (каррагинан, целлюлоза) и синтетического происхождения (нафионовая мембрана)), а также неорганические материалы, такие как силикагель. Каждая из твердых фаз может использоваться для определения

суммарного содержания антиоксидантов и антиоксидантной активности. Особенности использования твердых носителей представлены в таблице 1. Для силикагеля и пластин для ТСХ характерна малая химическая устойчивость. Для природных полимеров, в частности каррагинана и целлюлозы, характерно что такие твердые фазы могут легко разрушаться микроорганизмами, а их синтез редко воспроизводим. Для синтетических полимеров, в частности нафионовой мембраны, характерна высокая стоимость и короткий срок хранения материала.

Таблица 1 – Характеристики различных аналитических систем для определения суммарного содержания АО и антиоксидантной активности

Твердая фаза	Индикаторная система	Особенности использования	Литература
<i>Полимерные материалы синтетического происхождения</i>			
Нафионовая мембрана	Cu(II) / Cu(I)-неокупроин Fe(III)-о-фенантролин	высокая стоимость и короткий срок годности материала (пожелтение пленок).	[93, 94, 97]
Амберлит	Cu(II) / Cu(I)-неокупроин	высокая стоимость, необходимость утилизации.	[99]
<i>Полимерные материалы природного происхождения</i>			
Целлюлоза	AuCl ₄ ⁻ / AuNPs	разрушаются микроорганизмами, синтез редко воспроизводим.	[95]
Каррагинан	Cu(II) / Cu(I)-неокупроин		[96]
<i>Неорганические материалы</i>			
Силикагель	Cu(II) / Cu(I) – тетрабензо[b,f,j,n]-[1,5,9,13] тетраазациклогексадецин нитрат	малая химическая стойкость при pH <2 и pH >9 растворяется в кислотах и щелочах.	[78]
ТСХ	Cu(II) / Cu(I)-неокупроин		[98]

Нафионовая мембрана представляет собой сополимер тетрафторэтилена и сомономера, имеющего боковые цепи перфторированного винилового эфира, оканчивающиеся сульфогруппами. В методе проводили электростатическую иммобилизацию системы Cu(II)-неокупроин на катионообменную мембрану Нафийон, далее помещали в водно-спиртовой раствор, содержащий аналит, выдерживали в течение некоторого времени (30 минут) для развития окраски от

светло-голубого до желтого. После проводили спектрофотометрический анализ, используя изменение оптической плотности при $\lambda=450$ нм, возникающее в результате восстановления Cu(II) до Cu(I), образующей комплекс с неocupроином. Сигнал фиксировали на фоне однотонной мембраны, полученной в тех же условиях, но в отсутствии аналита [93, 94]. Схема процесса представлена на рисунке 5.

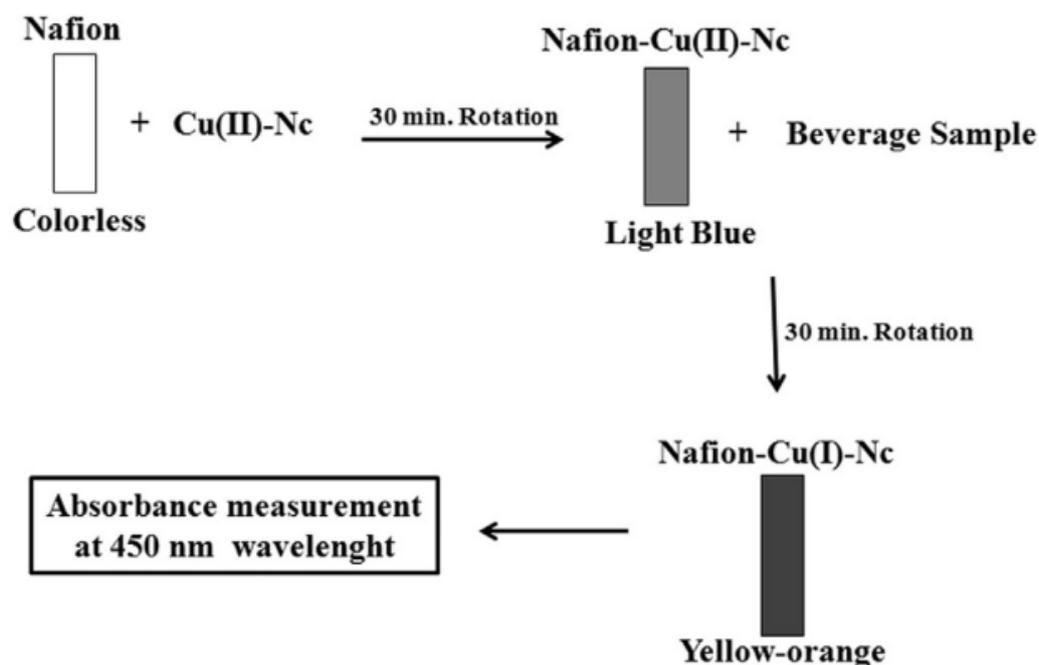


Рисунок 5 – Схема процессов иммобилизации Cu(II)-Nc в нафионовую мембрану и твердофазно-спектрофотометрического определения Σ АО в соковой продукции с использованием метода CUPRAC [100]

Авторы работы [95] предлагают проводить определение суммарного содержания антиоксидантов с использованием наночастиц золота, интегрированных в оптический сенсор на основе целлюлозы. Данный подход основан на способности антиоксидантов восстанавливать ионы золота до AuNPs, вызывая хроматические переходы, интенсивность которых зависит от структуры и концентрации антиоксидантов. При этом показано, что образование и рост AuNPs могут происходить непосредственно на поверхности бумаги, без необходимости использования дополнительных реагентов или этапов реакции, кроме введения образца. Что значительно упрощает анализ, снижает расход реагентов и увеличивает пропускную способность проб.

В работе [96] показано применение полисахарида – каррагинана, в качестве твердой фазы для индикаторной системы Cu(II)-неокупроин. Имобилизацию хромогенного реагента меди-неокупроина в каррагинан проводили благодаря наличию сульфатных групп в структуре биополимерной пленки полисахарида. После чего сенсор выдерживали в водно-спиртовом растворе, содержащем антиоксидант, в течение 90 минут до развития желтой окраски комплексного соединения Cu(I)-Nc. Далее проводили спектрофотометрический анализ при длине волны 450 нм относительно эталонной пленки, не взаимодействующей с антиоксидантом. Схема анализа представлена на рисунке 6.

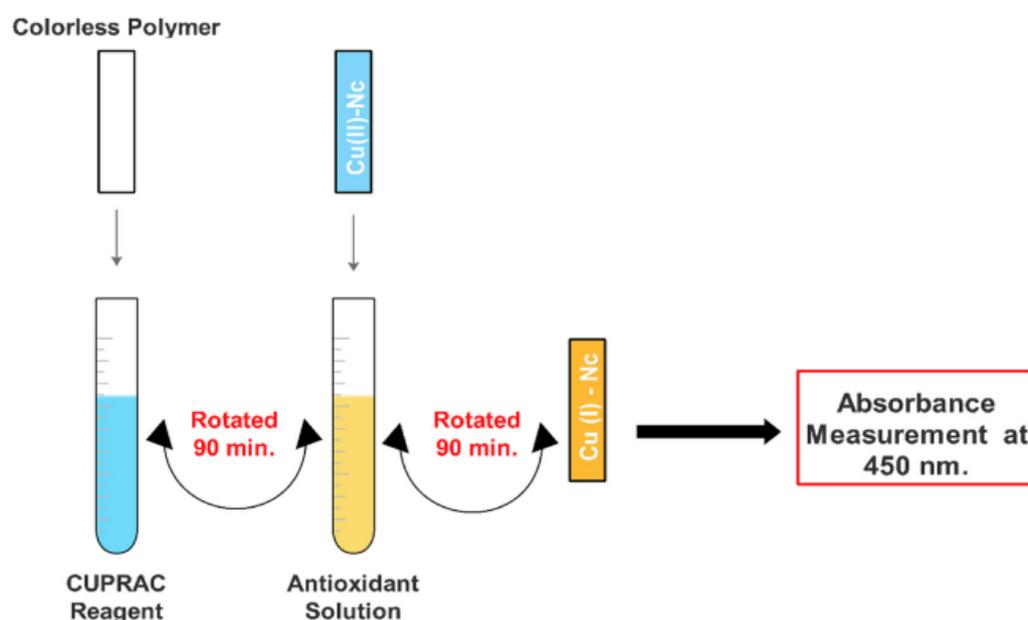


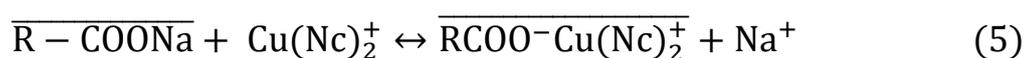
Рисунок 6 – Схема процессов иммобилизации Cu(II)-Nc в каррагинан и твердофазно-спектрофотометрического определения Σ АО с использованием метода CUPRAC [96]

Запорожец О. А. с коллегами предложили метод определения суммарного содержания антиоксидантов с помощью индикаторной системы Cu(II)-тетрабензо[b,f,j,n]-[1,5,9,13] тетраазациклогексадецин нитрат, нанесенной на слой силикагеля, в качестве твердой фазы [78, 101]. При взаимодействии с раствором АО наблюдается восстановление комплекса тетрабензо[b,f,j,n]-[1,5,9,13] тетраазациклогексадецин медь (II) нитрат, адсорбированного на силикагеле, до комплекса с медь(I) ($\lambda=712$ нм). К недостаткам предложенного способа определения можно отнести сложность измерения светопоглощения суспензии силикагеля, что ведет к необходимости использования метода «двух длин волн» для учета влияния неоднородности сорбента на величину измеряемого сигнала.

Кроме того, используемая в предложенном способе индикаторная система Cu(II)/Cu(I)-тетрабензо[b,f,j,n]-[1,5,9,13] тетраазациклогексадецин нитрат обладает низким окислительно-восстановительным потенциалом, что приводит к невозможности определения некоторых восстановителей [102].

В работе [98] представлен «новый колориметрический метод CUPRAC» для определения суммарного содержания антиоксидантов без использования спектрофотометра через сканирование изображений пластинок для тонкослойной хроматографии (ТСХ), на которые нанесена индикаторная система CUPRAC с образцом антиоксиданта. Недостатком такого подхода является длительность обработки полученных изображений пластинок при определении суммарного содержания антиоксидантов.

Авторы работы [99] рассмотрели применение слабокислотного катионита, сополимер метакриловой кислоты с дивинилбензолом – амберлита IRC-50 ($\overline{R - COONa}$) для концентрирования получаемого хелатного соединения $Cu(Nc)_2^+$ в методе CUPRAC с целью определения ΣAO в образцах, содержания антиоксидантов в которых ниже предела чувствительности метода, или для получения фракций богатых антиоксидантами. Реакция концентрирования получаемого комплексного соединения желтого цвета $Cu(Nc)_2^+$ в амберлите IRC-50 протекает в соответствие с уравнением:



Использование системы Cu(II)-неокупроин в растворе и твердой фазе характеризуются отличиями и описываются авторами [94]. Окислительно-восстановительная реакция, проходящая между АО и системой Cu(II) – неокупроин, иммобилизованной в твердую фазу, первоначально требует диффузии аналита к поверхности твердой фазы. Поэтому ожидается уменьшение скорости реакции в сравнении с процессом, проходящим в растворе. Также замедляющим фактором проведения таких реакций являются большие заместители полифенольных антиоксидантов и метильные группы, иммобилизованного в твердую фазу неокупроина. Однако твердая фаза является менее гидрофильной средой по сравнению с раствором, а так как многие

фенольные соединения растворимы в спирте, они будут лучше взаимодействовать в менее гидрофильной среде. Кроме того, локальное концентрирование окислительно-восстановительного комплекса в твердой фазе может привести к увеличению скорости реакции по сравнению с гомогенным раствором.

1.3 Способы выражения и оценка правильности определения суммарного содержания антиоксидантов

Способы выражения содержания антиоксидантов также разнообразны, как и методы их определения. При этом не существует стандартных единиц выражения суммарного содержания антиоксидантов или антиоксидантной активности, так как наблюдается зависимость от многих параметров, таких как: время, скорость, температура, субстрат, концентрация антиоксиданта или концентрация других веществ (кислорода, пероксидов или других антиоксидантов).

При фиксированном наборе параметров, представленных выше, антиоксидантная активность (АА), согласно авторам работы [66], может быть, определена независимо от метода испытания по формуле:

$$AA = \frac{t - t_{ct}}{[AH] \cdot t_{ct}}, \quad (6)$$

где t – время субстрата до достижения заданного уровня окисления в соответствии с методом испытания;

t_{ct} – время эталонного субстрата для достижения такого же уровня окисления;

$[AH]$ – концентрация антиоксиданта.

Исходя из этого уравнения, АА будет равно нулю, если $t_{ct} = t$ и будет увеличиваться при больших t , при этом данное выражение можно переписать с учетом скоростей окисления. Стоит отметить, что расчет антиоксидантной активности по формуле (6) используют в кинетических методах определения АО.

Для спектрофотометрических методов анализа более значимой мерой, может быть, относительная антиоксидантная активность ($AA_{отн}$):

$$AA_{отн} = \frac{AA_1}{AA_{ct}}, \quad (7)$$

где AA_1 – суммарное содержание антиоксидантов в исследуемой пробе;

$AA_{ст}$ – суммарное содержание антиоксидантов в эталонной пробе.

Выразив из уравнения (7) AA_1 , получим:

$$AA_1 = AA_{отн} \cdot AA_{ст}, \quad (8)$$

Уравнение (8) является общим способом выражения антиоксидантной активности или суммарного содержания антиоксидантов, который показывает антиоксидантную активность (суммарное содержание АО) в исследуемом образце относительно эталонной пробы, т.е. вещества-стандарта. Преимущество этого подхода состоит в том, что общие методы определения содержания антиоксидантов могут использоваться для расчета антиоксидантной активности (суммарного содержания АО) через различные единицы измерения веществ-стандартов, используемых в данных методах.

Расчет ΣAO с использованием методов, основанных на протекании окислительно-восстановительных систем (CUPRAC, FRAP и тд), представленных выше, чаще всего проводят по градуировочной зависимости для вещества-стандарта ($X_{ст}$) и выражают в виде количества $X_{ст}$, производящего антиоксидантный эффект [60, 71, 93, 103] согласно формуле (9).

$$\Sigma C_{АО}^{X_{ст}} = \frac{A_x}{b} = \frac{A_x \cdot C^{X_{ст}}}{A_{ст}}, \quad (9)$$

A_x – оптическая плотность раствора исследуемой пробы в максимуме полосы поглощения образованного комплексного соединения;

b – коэффициент в уравнении градуировочной зависимости для вещества-стандарта, представленной в виде $A_{ст} = b \cdot C^{X_{ст}}$.

Необходимость пересчета суммарного содержания антиоксидантов на вещество-стандарт обусловлена сложностью химического состава реальных объектов и взаимным влиянием антиоксидантов друг на друга, синергетический эффект. При этом вещества-стандарты могут являться компонентами пробы (внутренний стандарт) или веществами, отсутствующими в ней (внешний стандарт). Вещества-стандарты должны быть не токсичны, хорошо растворимы, иметь низкую стоимость и устойчивость при хранении. Можно встретить

выражение TEAC – суммарное содержание АО, выраженное в тролокс-эквивалентах. Тролокс, как вещество-стандарт часто используют для данного показателя [68, 93-98, 102-105]. Помимо тролокса в качестве других веществ можно использовать галловую кислоту (GAE – эквивалент галловой кислоты) [49], аскорбиновую кислоту (AAE – эквивалент аскорбиновой кислоты) [49, 106] и кверцетин (QE – кверцетин эквивалент) [60].

При этом точность оценки суммарного содержания антиоксидантов в пересчете на вещество-стандарт, сильно зависит от выбора $X_{ст}$. В работе [107, 108] предложены рекомендации для выбора вещества-стандарта. Так как общим требованиям к стандартам соответствует слишком много веществ, автор предлагает введение специфических требований при выборе оптимального $X_{ст}$:

1. Состав, структура и свойства стандарта должны соответствовать веществам, суммарное содержание которых оценивается;
2. Чувствительность определения стандарта, т. е. его коэффициент чувствительности ($K_{ст}$) должен соответствовать условию (10);

$$K_{min} < K_{ст} < K_{max}, \quad (10)$$

где K_{max} и K_{min} – максимальное и минимальное значения и выборки коэффициентов чувствительности веществ искомой группы.

3. Рекомендуется использовать в качестве вещества-стандарта вещество, которое определяется со средней чувствительностью по применяемой методике:

$$K_{ст} = 0,5 \cdot (K_{min} + K_{max}) \quad (11)$$

4. Если выбранное $X_{ст}$ – смесь веществ, входящих в искомую группу, то лучше, если их соотношение отвечает ожидаемому соотношению тех же компонентов в анализируемых пробах.

Таким образом, после определения оптимального вещества-стандарта, процедура нахождения суммарного содержания антиоксидантов через вещество-стандарт включает несколько стадий:

1. Построение одномерной градуировочной зависимости по стандартному веществу;

2. Измерение аналитического сигнала всех компонентов пробы в тех же условиях, и по той же методике, что и стандартное вещество;
3. Выражение суммарного содержания антиоксидантов через вещество-стандарт по полученной градуировочной зависимости.

Однако иногда такая процедура расчета – выражение суммарного содержания антиоксидантов на вещество-стандарт, приводит к появлению систематической погрешности, полученное содержание АО в объекте может отличаться от реального значения вследствие неодинаковой чувствительности определения $X_{ст}$ и АО, присутствующих в пробе [109, 110]. В. И. Вершинин с коллегами предложили новый подход для расчета суммарного содержания аналитов [107] – алгоритм интервальных оценок (ИО), который позволяет учесть разную чувствительность определения однотипных аналитов. Данный алгоритм основан на формировании «веера» градуировок для группы однотипных веществ с близкими структурными и химико-аналитическими свойствами для расчёта интервала, в котором находится суммарное содержание искомого аналита, и успешно применен в ряде работ [111, 112]. На рисунке 7 представлен «веер» градуировочных зависимостей кверцетина (КВ), галловой кислоты (ГК), рутина (РТ), протокатеховой кислоты (ПКК), аскорбиновой кислоты (АК), пирокатехина (КТ) и феруловой кислоты (ФК).

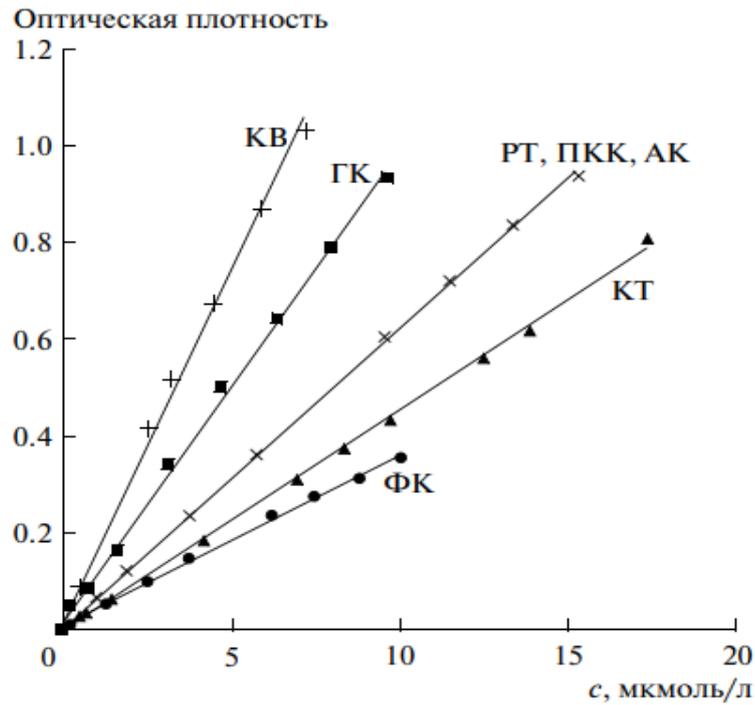


Рисунок 7 – «Веер» градуировочных зависимостей при определении суммарного содержания АО с использованием индикаторной системой Fe – дипиридил [112]

Интервал суммарного содержания одготипных веществ с применением алгоритма интервальной оценки рассчитывается по формуле (12) [107]:

$$\frac{A_{\Sigma}}{K_{\max}} \leq C_{\Sigma} \leq \frac{A_{\Sigma}}{K_{\min}}, \quad (12)$$

где A_{Σ} – обобщенный аналитический сигнал, оптическая плотность при выбранной длине волны;

C_{Σ} – суммарное содержание одготипных веществ.

Для косвенного доказательства правильности полученных значений суммарного содержания АО проводят сравнение теоретических и экспериментальных значений суммарного содержания антиоксидантов в модельных смесях, через уравнения количественного соответствия [74, 93, 113] или сопоставление с известными суммарными показателями, такими как, содержание фенольных соединений, флавоноидов, танинов или антоцианов с использованием корреляционного анализа [50].

Например, рассматривая аскорбиновую кислоту, как оптимальное вещество-стандарт [113], уравнения регрессии для зависимости аналитического сигнала от

количества аскорбиновой кислоты и от количества исследуемого восстановителя имеют вид:

$$y_{\text{АК}} = a \cdot x_{\text{АК}}(\text{мг}) + b, \quad (13)$$

$$y_{\text{ВОСТ}} = a' \cdot x_{\text{ВОСТ}}(\text{мг}) + b', \quad (14)$$

где $y_{\text{АК}}$, $y_{\text{ВОСТ}}$ – оптическая плотность фотометрируемого раствора аскорбиновой кислоты и исследуемого восстановителя соответственно;

a , b – коэффициенты в уравнении регрессии для зависимости аналитического сигнала от количества аскорбиновой кислоты;

a' , b' – коэффициенты в уравнении регрессии для зависимости аналитического сигнала от количества исследуемого восстановителя;

$x_{\text{АК}}(\text{мг})$, $x_{\text{ВОСТ}}(\text{мг})$ – масса аскорбиновой кислоты (восстановителя) в растворе, мг.

Тогда расчет теоретической величины суммарного содержания антиоксидантов в мг проводили по формуле (15), выведенной из уравнения количественного соответствия между исследуемым объектом и аскорбиновой кислотой, путем приравнивания значений функций:

$$\Sigma \text{АО}_{\text{теор}} = \frac{a' \cdot x_{\text{ВОСТ}}(\text{мг})}{a} + \frac{b' - b}{a} \quad (15)$$

Экспериментальное суммарное содержание антиоксидантов рассчитывали по усредненному уравнению регрессии для зависимости аналитического сигнала от количества аскорбиновой кислоты.

Рассматривая тролокс, как оптимальное вещество стандарт [74, 93], теоретическое значение суммарного содержания антиоксидантов в модельных смесях в миллимолях рассчитывали путем умножения коэффициента ТЕАС каждого АО, входящего в модельную смесь, на его концентрацию и суммированием полученных произведений:

$$\Sigma \text{АО}_{\text{теор}} = \text{ТЕАС}_1 \cdot C_1 + \text{ТЕАС}_2 \cdot C_2 + \dots + \text{ТЕАС}_n \cdot C_n, \quad (16)$$

где 1, 2 ... n – индивидуальные восстановители модельной смеси;

ТЕАС коэффициент – отношение молярного коэффициента поглощения восстановителя к молярному коэффициенту поглощения тролокса ($\epsilon_{\text{ТР}}$);

Экспериментальное суммарное содержание антиоксидантов ($\Sigma\text{AO}_{\text{эксп}}$) рассчитывали, как отношение наблюдаемого аналитического сигнала к молярному коэффициенту поглощения стандарта-тролокса:

$$\Sigma\text{AO}_{\text{эксп}} = \frac{A_{450}}{\varepsilon_{\text{ТР}}}, \quad (17)$$

Рассуждения об оценке показателей правильности определения ΣAO представлены в работе [114], согласно которой существует несколько подходов для определения метрологических характеристик аналитических методик, которые представлены в таких нормативных документах как ГОСТ Р 5725-2002 и РМГ 61-2010 [115, 116]. Однако для определения правильности, повторяемости и точности оценки суммарного содержания АО пищевых продуктов, авторы [114] рекомендуют использовать метод варьирования навески (объема пробы). Так как применение других подходов связано с рядом особенностей. Например, использование однофакторных планов экспериментов включает учет изменяющихся факторов пробы, что создает определенные трудности при анализе пищевых продуктов, обладающих сложным и изменчивым составом. Использование стандартных образцов также не представляется возможным, так как нет адекватных аттестованных смесей для определения суммарного содержания АО в продуктах питания.

Заключение

Анализ литературных данных показал, что методы определения ΣAO или антиоксидантной активности, основанные на использовании окислительно-восстановительных систем, иммобилизованных на твердых фазах, являются перспективными для исследований, так как проведение окислительно-восстановительных реакций в твердой фазе, в отличие от раствора, позволяет повысить чувствительность используемой методики, а также сделать ее более удобной и недорогой для массового применения за счет экономии аналитических реагентов и миниатюризации процесса. Из всех перечисленных окислительно-восстановительных методов наибольший интерес представляет метод CUPRAC,

так как обладает множеством достоинств, такими как применимость к определению как гидрофильных, так и липофильных АО, стабильность и доступность реагентов. В качестве твердых носителей для реализации метода CUPRAC возможно использования природных и синтетических полимеров, а также неорганических материалов, таких как силикагель. Однако для силикагеля и пластинок для ТСХ характерна малая химическая устойчивость в сильнокислотных или сильноосновных среда, для природных полимеров (каррагинан и целлюлоза) – разрушение микроорганизмами и плохо воспроизводимый синтез, для синтетических полимеров (нафионовой мембраны) – высокая стоимость и создание специальных условий для хранения материала. Таким образом, для изучения свойств системы Cu(II)-неокупроин и определения ΣАО методом CUPRAC предлагаем использовать в качестве аналитической среды полиметилметакрилатную матрицу (ПММ), обладающую такими достоинствами как: прозрачность, отсутствие собственной окраски и влияния на способность иммобилизованных реагентов вступать в аналитическую реакцию с определяемым веществом [117, 118].

Использование ПММ в качестве аналитической среды позволит с высокой точностью проводить непосредственное измерение оптических характеристик твердой фазы для определения суммарного содержания антиоксидантов в различных окрашенных продуктах питания и напитках без проведения сложных операций на этапе пробоподготовки с представлением результатов суммарного содержания антиоксидантов как в пересчете на вещество-стандарт после выбора $X_{ст}$, так и в виде диапазона, в котором находится истинное суммарное содержание антиоксидантов (алгоритм ИО).

Глава 2 Аппаратура, объекты исследования и методики эксперимента

2.1 Используемые вещества и реагенты

Применяемые реактивы соответствовали необходимому классу чистоты (х.ч. и ч.д.а.) и использовались без дополнительной очистки. Растворы АО готовили в день проведения эксперимента растворением точной навески в соответствующем растворителе (табл. 2)

Таблица 2 – Условия приготовления растворов органических восстановителей

Антиоксидант	M _r , г/моль	Масса навески г	Условия приготовления раствора	Концентрация	
				C, г/дм ³	C·10 ⁻³ , моль/дм ³
Аскорбиновая кислота (АК)	176,12	0,1000±0,0002	Растворить в 100 см ³ бидистиллированной воды	1,0	5,7
Цистеин (Ц)	121,16	0,1000±0,0002	Растворить в 100 см ³ бидистиллированной воды	1,0	8,3
Галловая кислота (ГК)	170,12	0,1000±0,0002	Растворить в 100 см ³ бидистиллированной воды	1,0	5,9
Рутин (Р)	610,52	0,0100±0,0002	Добавить 10 см ³ этилового спирта, растворить при нагревании в 60-70 см ³ бидистиллированной воды, довести объем до 100 см ³ .	0,1	0,16
Кверцетин (КВ)	302,24	0,0100±0,0002	Растворить в 100 см ³ этилового спирта	0,1	0,33
Гидрат катехина (К)	308,28	0,1000±0,0002	Растворить в 100 см ³ бидистиллированной воды	1,0	3,3
Дигидрокверцетин (ДКВ)	304,25	0,0100±0,0002	Растворить в 100 см ³ этилового спирта	0,1	0,33
Лютеолин (Л)	286,24	0,0100±0,0002	Растворить в 100 см ³ этилового спирта	0,1	0,35

Продолжение таблицы 2

Танин (Т)	1709,20	0,1000±0,0002	Растворить в 100 см ³ бидистиллированной воды	1,0	0,59
Тролокс (ТР)	250,29	0,0100±0,0002	Растворить в 100 см ³ этилового спирта	0,1	0,40

Реактивы для твердофазного спектрофотометрического определения Σ АО методом CUPRAC (ПММ-Cu(II)-Nc):

Рабочие растворы АО (0,1 г/дм³) в случае необходимости готовили разбавлением их исходных растворов в день эксперимента. Для приготовления 1 % спиртового раствора Nc точную навеску реагента растворяли в этиловом спирте. Раствор ионов меди(II) с концентрацией 1 мг/см³ получали растворением навески сульфата меди в бидистиллированной воде в соответствии с ГОСТ 4212-2016 [119]. pH от 3,5 до 4 создавали цитратным буферным раствором. Для этого навеску лимонной кислоты массой 2,1014 г растворяли в 20 см³ одномолярного раствора гидроксида натрия, с последующим доведением бидистиллированной водой до 100 см³. После из полученного раствора отбирали 67,9 см³ и доводили 0,1 М раствором HCl до 100,0 см³

Реактивы для определения фенольных соединений:

В работе использовался реактив Фолина-Чокальтеу производителя Merck (Германия). Приготовление одномолярного раствора гидроксида натрия осуществляли следующим образом: в мерную колбу вместимостью 100,0 см³ помещали небольшое количество воды, приливали 5,2 см³ концентрированного гидроксида натрия, доводили до метки бидистиллированной водой.

Реактивы для определения флавоноидов и таннинов:

Раствор рутина готовили растворение навески вещества (0,02500 г) при нагревании в этиловом спирте ($V_k=25,0$ см³). При приготовлении раствора танина навеску такой же массы растворяли в бидистиллированной воде и доводили до метки в колбе на 25,0 см³. Для приготовления AlCl₃ навеску 0,5000 г растворяли в этаноле ($V_k=25,0$ см³).

Реактивы для определения содержания антоцианов:

1. Буферный раствора с $\text{pH}=1,0$;

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 переносили навеску хлористого калия массой $1,49 \text{ г}$, растворяли в бидистиллированной воде и доводили до метки бидистиллированной водой. Приготовление $0,2 \text{ М}$ соляной кислоты HCl осуществляли следующим образом: в мерную колбу вместимостью 100 см^3 цилиндрами на 100 и 5 см^3 соответственно вносили 75 см^3 бидистиллированной воды и $1,7 \text{ см}^3 \text{ HCl}_к$, после чего доводили до метки бидистиллированной водой. Затем в стакане смешивали 25 см^3 полученного раствора KCl с 67 см^3 раствора HCl ($0,2 \text{ М}$).

2. Буферный раствор с $\text{pH}=4,5$.

$1,64 \text{ г}$ уксуснокислого натрия растворяли в бидистиллированной воде ($V_k=100,0 \text{ см}^3$).

В случае необходимости pH буферных растворов доводили с помощью концентрированной соляной кислоты [120].

Получение полиметакрилатной матрицы. ПММ получали радикальной блочной полимеризацией метакриловых мономеров в виде прозрачных пластин толщиной порядка $(0,60 \pm 0,04) \text{ мм}$ по методике [121]. Готовые образцы разрезали на пластины размером $6,0 \times 8,0 \text{ мм}$ или $4,0 \times 4,0 \text{ мм}$ и массой около $0,04 \text{ г}$ или $0,01 \text{ г}$ соответственно для дальнейшей работы.

2.2 Аппаратура

Измерение оптических характеристик ПММ проводили на двухлучевом спектрофотометре Shimadzu UV-1800, относительно полиметакрилатной матрицы с иммобилизованной Cu(II)-Nc после контакта с раствором, не содержащим АО. Спектры поглощения ПММ измеряли в диапазоне $300 - 900 \text{ нм}$, а оптическую плотность при длине волны 450 нм , соответствующей максимуму поглощения комплексного соединения Cu(I)-Nc , образованного в ПММ после контакта матриц с раствором АО. Перемешивание растворов с ПММ выполняли на мульти-ротаторе MultiBio RS-24. Контроль pH среды растворов АО проводили

стеклянным электродом на «Иономере И-160», в качестве электрода сравнения выступал хлорсеребряный электрод. Отбор навесок для приготовления растворов осуществляли при помощи аналитических весов «Shimadzu AUX 120». Отбор аликвот осуществляли с помощью дозаторов с переменными объемами. На различных этапах анализа применялась разнообразная лабораторная химическая посуда.

2.3 Методики проведения экспериментов

2.3.1 Приготовление колориметрического сенсора

Иммобилизацию индикаторной системы в ПММ проводили в одну стадию путем перемешивания матриц с раствором Cu(II)-Nc. Пластинки полиметилметакрилатной матрицы окрашивались в голубой цвет за счет экстракции Cu(II)-Nc из водно-спиртового раствора. Условия иммобилизации были подобраны путем изменения количества меди и неокупроина, а также их соотношения на величину аналитического сигнала, полученного после контакта Cu(II)-Nc в ПММ с раствором АК.

2.3.2 Подготовка объектов к анализу

В качестве объектов для анализа были выбраны: лекарственные настойки, соковая продукция, черные и зеленые чаи, приобретенные в аптеках и магазинах г. Томска (таблица 3).

Таблица 3 – Исследуемые объекты и их пробоподготовка

Анализируемый объект	Определяемые компоненты	Подготовка объекта
Чай	Суммарное содержание АО Фенольные соединения Флавоноиды	Измельчение навески чая, экстракция на водяной бане, фильтрование через воронку Бюхнера, доведение фильтрата в мерной колбе на 250 см ³ . Разбавление в 10 раз по ГОСТ 19885-74 [122]
Лекарственные настойки	Танины	Разбавление в 10 раз

Продолжение таблицы 3

Соковая продукция	Суммарное содержание АО	Разбавление в 10 раз
	Фенольные соединения Антоцианы	Без разбавления

2.3.3 Методика твердофазного спектрофотометрического определения Σ АО методом CUPRAC (ПММ-Cu(II)-Nc)

Приготовление растворов для построения градуировочных зависимостей с целью определения АО твердофазно-спектрофотометрическим методом осуществляли следующим образом: в пробирки помещали 0,5 см³ цитратного буферного раствора (pH = 3,5–4), добавляли от 0,0 до 0,3 см³ рабочего раствора АО и доводили объем до 5 см³ бидистиллированной водой. В растворы помещали ПММ с иммобилизованной индикаторной системой Cu(II)-Nc, перемешивали в течение 20 мин, затем пластинки вынимали, подсушивали между листами фильтровальной бумаги и регистрировали спектры поглощения в диапазоне длин волн 300 - 900 нм или измеряли оптическую плотность при $\lambda = 450$ нм, соответствующей максимуму поглощения комплексного соединения Cu(I)-Nc, образованного в ПММ после контакта матриц с раствором АО.

В аналогичных условиях проводили определение Σ АО в реальных объектах.

Образцы лекарственных настоек предварительно разбавляли в 10 раз, затем аликвоты полученных растворов объемом от 0,01 до 0,4 см³ вносили в градуированные пробирки и разбавляли до 5 см³ бидистиллированной водой.

Для образцов черного и зеленого чая проводили экстракцию по ГОСТ 19885-74. Из полученного экстракта отбирали аликвоту 10,0 см³ в колбу на 100 см³ для зеленого и черного чая. Затем аликвоты полученных растворов объемом от 0,04 до 0,16 см³ вносили в градуированные пробирки и разбавляли до 5 см³ бидистиллированной водой.

Образцы сока также предварительно разбавляли в 10 раз, затем аликвоты полученных растворов объемом от 0,04 до 2,00 см³ вносили в градуированные пробирки и разбавляли до 5 см³ бидистиллированной водой. Наличие

интенсивной окраски образцов не мешало определению $\Sigma\text{АО}$, что обусловлено особенностями использования ПММ в качестве твердой фазы.

Суммарное содержание АО ($\Sigma C_{\text{АО}}^{\text{хст}}$), моль/дм³, в лекарственных настойках и соковой продукции находили по формуле:

$$\Sigma C_{\text{АО}}^{\text{хст}} = \frac{\Delta A_{450} \cdot V \cdot 10}{b \cdot V_{\text{ал}}}, \quad (18)$$

ΔA_{450} – обобщенный аналитический сигнал, представляющий собой разность оптических плотностей полиметакрилатных матриц с иммобилизованной Cu(II)-Nc после контакта с раствором, содержащим и не содержащим АО при длине волны 450 нм;

b – коэффициент в уравнении градуировочной зависимости для вещества-стандарта, представленной в виде $\Delta A_{450} = b \cdot C^{\text{ст}}$.

$V_{\text{ал}}$ – объем сока или настойки, взятый для анализа, см³;

V – объем, до которого разбавлена проба, взятая для анализа, см³;

10 – коэффициент учета разбавления анализируемого объекта.

Суммарное содержание АО ($\Sigma C_{\text{АО}}^{\text{хст}}$) в чае, моль на 100 г листьев, находили по формуле:

$$\Sigma C_{\text{АО}}^{\text{хст}} = \frac{\Delta A_{450} \cdot V \cdot 10 \cdot V_{\text{к}} \cdot 100}{b \cdot V_{\text{ал}} \cdot m \cdot 1000}, \quad (19)$$

$V_{\text{ал}}$ – объем экстракта чая, взятый для анализа, см³;

V – объем, до которого разбавлена проба, взятая для анализа, см³;

10 – коэффициент учета разбавления анализируемого объекта;

$V_{\text{к}}$ – объем, до которого разбавлена проба фильтрата, дм³ ($V_{\text{к}} = 0,250$ дм³);

m – навеска чая, взятая на анализ, г;

$\frac{100}{1000}$ – пересчет на 100 г листьев.

2.3.4 Методика определения фенольных соединений

Сущность методики определения фенольных соединений основана на взаимодействии АО фенольной природы с реактивом Фолина-Чокальтеу, при

котором наблюдается появление синей окраски, вследствие окисления фенольных групп АО и восстановления реактива до смеси окислов (рис. 8) [123].

Построение градуировочной зависимости для вещества-стандарта (ГК):

В мерные колбы на 10,0 см³ отбирали аликвоты галловой кислоты от 0,1 до 0,4 см³ ($C_{ГК} = 0,0015$ моль/дм³), добавляли по 0,2 см³ реактива Фолина-Чокальтеу и 2,0 см³ одномолярного раствора гидроксида натрия с последующим доведением до метки бидистиллированной водой. Через 30 минут регистрировали спектры поглощения в диапазоне длин волн 300 - 1100 нм или измеряли оптическую плотность при длине волны 665 нм (толщина поглощающего слоя 1 см) относительно раствора сравнения, не содержащего реактив Фолина-Чокальтеу.

Определение содержания фенольных соединений в реальных образцах:

Определение содержание фенольных соединений в реальных образцах проводили аналогичным образом, заменив аликвоты ГК, аликвотами исследуемого объекта от 0,1 до 0,3 см³.

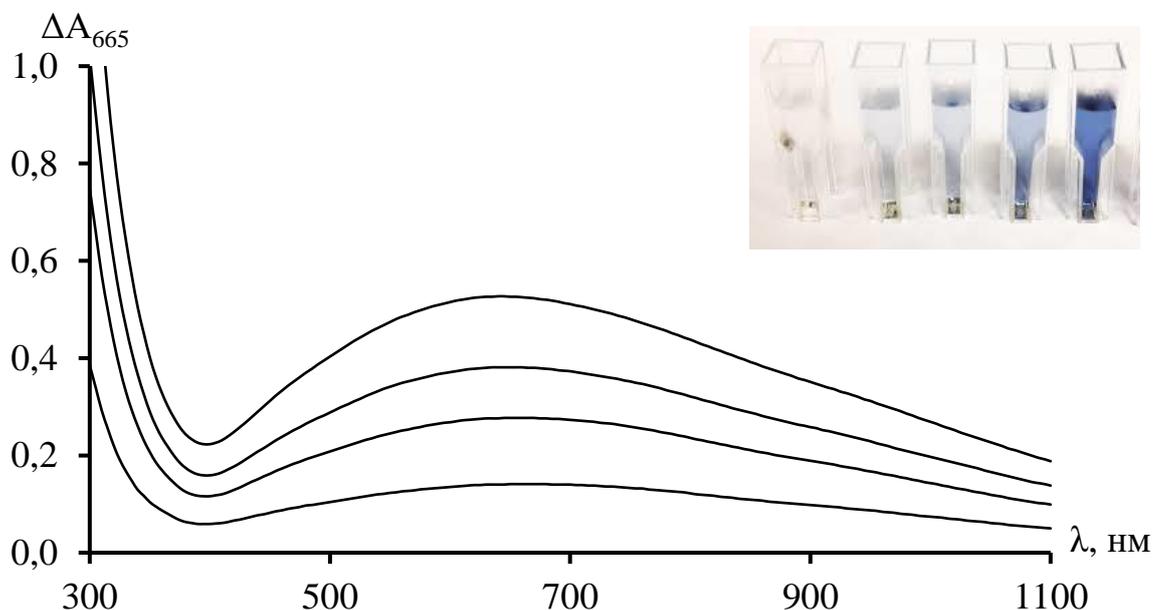


Рисунок 8 – Спектры поглощения фенольных соединений при взаимодействии с реактивом Фолина-Чокальтеу

Содержание фенольных соединений ($\Sigma C_{ФС}^{ГК}$), моль/дм³, в лекарственных настойках и соковой продукции находили по формуле:

$$\Sigma C_{ФС}^{ГК} = \frac{\Delta A_{665} \cdot V \cdot 10}{b \cdot V_{al}}, \quad (20)$$

ΔA_{665} – оптическая плотность раствора при длине волны 665 нм;

b – коэффициент в уравнении градуировочной зависимости для вещества-стандарта – галловая кислота, представленной в виде $\Delta A_{665} = b \cdot C^{ГК}$.

V_{al} – объем сока или настойки, взятый для анализа, $см^3$;

V – объем, до которого разбавлена проба, взятая для анализа, $см^3$;

10 – коэффициент учета разбавления, используемый для анализа лекарственных настоек.

Содержание фенольных соединений в чае, ($\Sigma C_{ФС}^{ГК}$), моль на 100 г листьев, находили по формуле:

$$\Sigma C_{ФС}^{ГК} = \frac{\Delta A_{665} \cdot V \cdot 10 \cdot V_K \cdot 100}{b \cdot V_{al} \cdot m \cdot 1000}, \quad (21)$$

V_{al} – объем экстракта чая, взятый для анализа, $см^3$;

V – объем, до которого разбавлена проба, взятая для анализа, $см^3$;

10 – коэффициент учета разбавления анализируемого объекта;

V_K – объем, до которого разбавлена проба фильтрата, $дм^3$ ($V_K = 0,250$ $дм^3$);

m – навеска чая, взятая на анализ, г;

$\frac{100}{1000}$ – пересчет на 100 г листьев.

2.3.5 Методика количественного определения флавоноидов и танинов

Количественное определение флавоноидов и танинов проводили согласно методике [124], сущность которой основана на способности данных соединений образовывать комплексы с $AlCl_3$, окрашенные в желтый цвет, вызывая батохромный сдвиг длинноволновой полосы поглощения, давая максимумы полосы поглощения при 410 и 320 нм для определения содержания флавоноидов и танинов соответственно. В качестве вещества-стандарта при определении содержания флавоноидов используют рутин, а при определении содержания танинов – танин.

Количественное определение содержания флавоноидов и танинов проводили следующим образом: в мерную колбу вместимостью 10,0 $см^3$ вносили 0,5 $см^3$ спиртового раствора $AlCl_3$, аликвоты рутина ($C_P = 0,0016$ моль/ $дм^3$) или танина ($C_T = 0,00058$ моль/ $дм^3$) от 0,05 до 0,15 $см^3$, или 5,0 $см^3$ исследуемого

реального образца и доводили до метки бидистиллированной водой. Через 40 минут регистрировали спектры поглощения в диапазоне длин волн 300 - 500 нм или измеряли оптическую плотность при длине волны 410 и 320 нм для определения флавоноидов и танинов соответственно. Раствор сравнения готовили аналогичным образом, заменив объем хлорида алюминия эквивалентным объемом бидистиллированной воды.

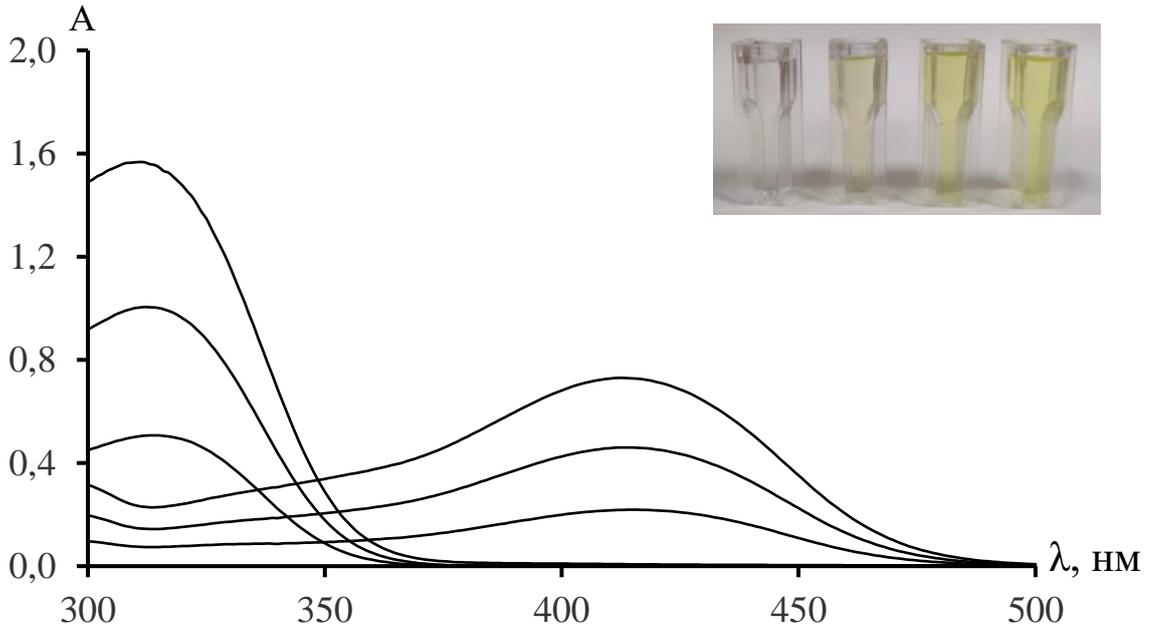


Рисунок 9 – Спектры поглощения флавоноидов и танинов при взаимодействии с хлоридом алюминия

Содержание флавоноидов ($\Sigma C_{\text{ФЛ}}^P$) / танинов (ΣC_{T}^T), в моль/дм³, в лекарственных настойках находили по формуле:

$$\Sigma C_{\text{ФЛ}}^P / \Sigma C_{\text{T}}^T = \frac{\Delta A_{410/320} \cdot V \cdot 10}{b \cdot V_{\text{al}}}, \quad (22)$$

$\Delta A_{410/320}$ – оптическая плотность раствора при длине волны 410/320 нм;

b – коэффициент в уравнении градуировочной зависимости для вещества-стандарта – галловая кислота, представленной в виде $\Delta A_{410/320} = b \cdot C^{P/T}$.

V_{al} – объем настойки, взятый для анализа, см³;

V – объем, до которого разбавлена проба, взятая для анализа, см³;

10 – коэффициент учета разбавления, используемый для анализа лекарственных настоек.

Содержание флавоноидов ($\Sigma C_{\text{Фл}}^P$) / танинов (ΣC_{T}^T) в чае, в моль на 100 г листьев, находили по формуле:

$$\Sigma C_{\text{Фл}}^P / \Sigma C_{\text{T}}^T = \frac{\Delta A_{410} \cdot V \cdot 10 \cdot V_K \cdot 100}{\frac{320}{b \cdot V_{\text{ал}} \cdot m \cdot 1000}}, \quad (23)$$

$V_{\text{ал}}$ – объем экстракта чая, взятый для анализа, см³;

V – объем, до которого разбавлена проба, взятая для анализа, см³;

10 – коэффициент учета разбавления, используемый для анализа лекарственных настоек.

V_K – объем, до которого разбавлена проба фильтрата, дм³ ($V_K = 0,250$ дм³);

m – навеска чая, взятая на анализ, г;

$\frac{100}{1000}$ – пересчет на 100 г листьев.

2.3.6 Методика количественного определения антоцианов

Количественное определение антоцианов основано на применении метода рН-дифференциальной спектрофотометрии, согласно которому содержание антоцианов определяют по изменению поглощения при $\lambda = 510$ нм при изменении рН растворов от 1,0 до 4,5 (рис. 10)

Согласно ГОСТ 32709-2014 для определения содержания антоцианов в мерные колбы на 25,0 см³ вносили аликвоты пробы ($V=2,0$ см³) и доводили до метки буферными растворами с рН 1,0 и 4,5. Через 15 минут снимали спектры поглощения в диапазоне длин волн 300 - 800 нм или измеряли оптическую плотность при длине волны 510 и 700 нм, для учета поглощения светом примесей [120].

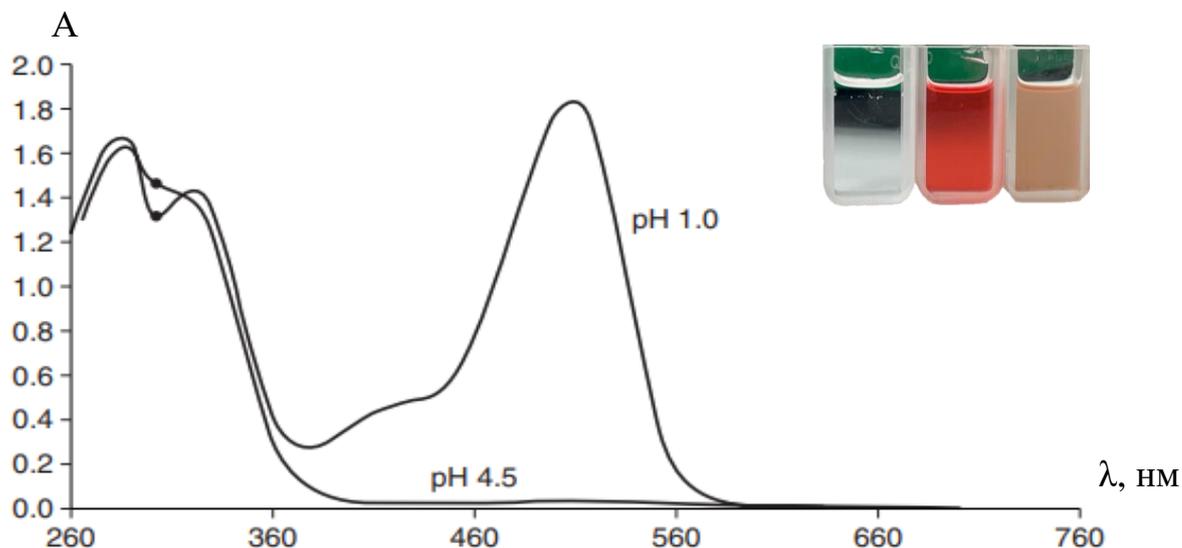


Рисунок 10 – Спектры поглощения антоцианов методом рН-дифференциальной спектрофотометрии при кислотности растворов рН = 1,0 и 4,5

Оптическую плотность антоцианов без учета поглощения примесей при разном значении рН рассчитывали по формуле:

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}=1,0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}=4,5}, \quad (24)$$

где A_{510} – оптическая плотность раствора пробы при длине волны 510 нм; A_{700} – оптическая плотность раствора пробы при длине волны 700 нм;

Содержание антоцианов (в пересчете на цианидин-3-глюкозид) $C(X)$, моль/дм³, рассчитывали по формуле:

$$C(X) = \frac{A \cdot V_1}{V_2 \cdot \varepsilon \cdot l}, \quad (25)$$

где A – измеренная оптическая плотность суммы антоцианинов;

V_1 – вместимость мерной колбы, взятой для разбавления, см³;

V_2 – объем пробы, отобранный для анализа, см³;

ε – молярный коэффициент экстинкции цианидин-3-глюкозида, равный 26900 [моль·см/дм³]⁻¹;

l – длина оптического пути кюветы, равная 1 см.

Проверку приемлемости результатов параллельных определений содержания антоцианов осуществляли по формуле:

$$|C_1 - C_2| \leq 0.01 \cdot r_{\text{отн}} \cdot C_{\text{ср}}, \quad (26)$$

где $r_{\text{отн}}$ – предел повторяемости, равный 14% [120];

C_1, C_2 – результаты параллельных определений антоцианов в пробе, моль/дм³;
 $C_{\text{ср}}$ – среднеарифметическое значение определения антоцианов, равное полусумме параллельных определений антоцианов, моль/дм³.

Результат определения антоцианов представляют в виде:

$$C_{\text{ср}} \pm \Delta, \quad (27)$$

где Δ – границы абсолютной погрешности определения, моль/дм³, рассчитанные по формуле:

$$\Delta = \frac{\delta \cdot C_{\text{ср}}}{100}, \quad (28)$$

где δ – значение относительной погрешности метода, равное 14%.

2.3.7 Исследование условий взаимодействия антиоксидантов с индикаторной системой Cu(II)-Nc, иммобилизованной в ПММ

Для исследования влияния pH растворов АО на их взаимодействие с ПММ-Cu(II)-Nc, матрицы с иммобилизованным реагентом помещали в 50 см³ раствора АО с различным значением pH в присутствии буферного раствора. Необходимое значение pH растворов создавали путем добавления соляной кислоты и гидроксида натрия. Растворы перемешивали в течение 20,0 мин, затем пластинки вынимали, подсушивали между листами фильтровальной бумаги и регистрировали спектры поглощения в диапазоне длин волн 300 - 900 нм или измеряли оптическую плотность при $\lambda = 450$ нм, соответствующей максимуму поглощения комплексного соединения Cu(I)-Nc, образованного в ПММ после контакта матриц с раствором АО.

Для исследования влияния времени контакта АО с индикаторной системой Cu(II)-Nc, иммобилизованной в ПММ в градуированные пробирки помещали 0,5 см³ цитратного буферного раствора, вносили от 0,019 до 0,041 см³ раствора АО и доводили объем до 5 см³ бидистиллированной водой. В растворы помещали ПММ с иммобилизованной индикаторной системой Cu(II)-Nc, перемешивали в течение 2,5–90,0 мин, затем пластинки вынимали в различные временные интервалы, подсушивали между листами фильтровальной бумаги и регистрировали спектры

поглощения в диапазоне длин волн 300 - 900 нм или измеряли оптическую плотность при $\lambda = 450$ нм, соответствующей максимуму поглощения комплексного соединения Cu(I)-Nc, образованного в ПММ после контакта матриц с раствором АО.

2.3.8 Методика твердофазного спектрофотометрического определения суммарного содержания АО методом CUPRAC (ПММ-Cu(II)-Nc) с использованием колориметрии цифрового изображения

ПММ с иммобилизованной индикаторной системой Cu(II)-Nc, полученные после контакта с растворами АО, просушивали между листами фильтровальной бумаги и выкладывали на белый лист бумаги, который помещали в фотобокс. Затем закрывали крышку, включали светодиодную ленту и делали снимки пластинок при следующих фиксированных настройках камеры смартфона: выдержка 1/1000, ISO 200, цветовая температура 3700. Обработку цифровых изображений осуществляли в мобильном приложении Color Picker, наводя курсор на середину ПММ, и определяли координаты цвета в системах RGB и XYZ (рисунок 11).

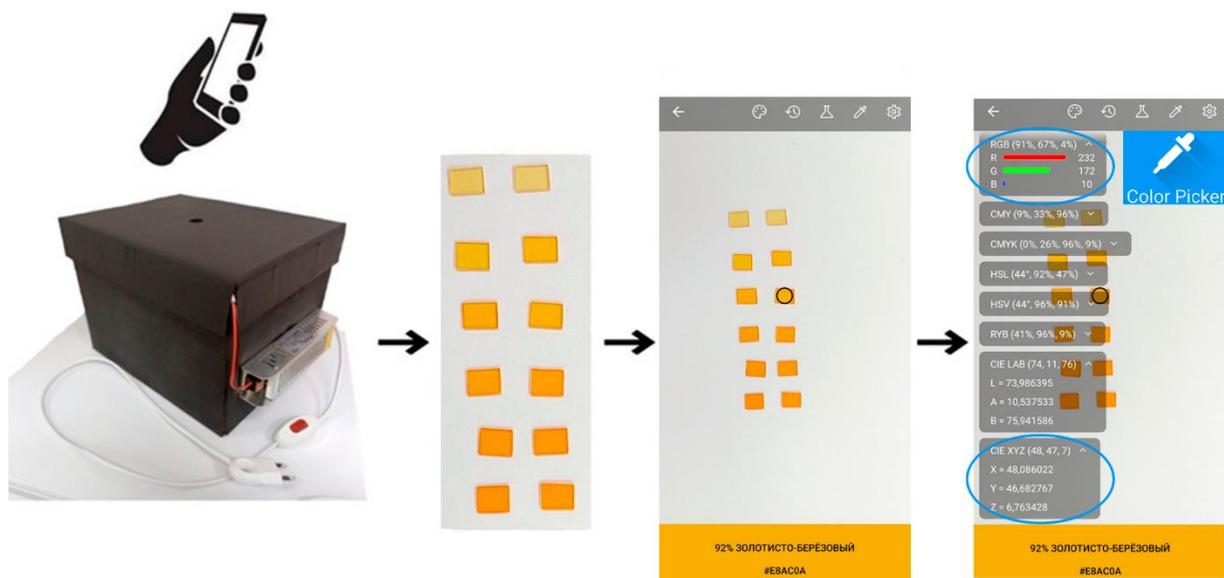


Рисунок 11 – Схема колориметрического определения суммарного содержания АО с использованием смартфона

При интерпретации колориметрических данных в роли аналитического параметра использовали величину (ΔE) и желтизну (G), вычисляемую на основе координат R, G, B и координат X, Y, Z соответственно [125].

Величину цветового различия (ΔE) рассчитывали по формуле 29:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta R^2 + \Delta G^2 + \Delta B^2}, \quad (29)$$

где ΔR – изменение в красном цветовом канале после протекания реакции;

ΔG – изменение в зеленом цветовом канале после протекания реакции;

ΔB – изменение в синем цветовом канале после протекания реакции.

Величину желтизны определяли по формуле:

$$G = \frac{100 \cdot (1,28 \cdot X - 1,06 \cdot Z)}{Y} \quad (30)$$

2.3.9 Метод оценки показателей качества разработанных методик

Оценка показателя повторяемости методики анализа

Для оценки показателя повторяемости методики анализа рассчитывали среднее арифметическое \bar{X}_n и выборочную дисперсию S^2 результатов единичного анализа содержания компонента в n -ом образце, полученных в условиях повторяемости (параллельных определений):

$$\bar{X}_n = \frac{\sum_{i=1}^L X_i}{L}, \quad (31)$$

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^L (\bar{X} - X_i)^2}{L - 1}, \quad (32)$$

где X_i – результат единичного анализа, полученный в условиях повторяемости;

L – число параллельных определений, предусмотренных методикой анализа для получения результата анализа.

По S^2 оценивали средние квадратические отклонения (СКО), характеризующие повторяемость результатов единичного анализа (параллельных определений), полученных для содержания, соответствующего содержанию компонента. СКО (S_r) рассчитывали по формуле:

$$S_r = \sqrt{S^2} \quad (33)$$

Показатель повторяемости методики анализа в виде СКО – σ_r для содержания, соответствующего содержанию компонента, устанавливали, принимая равным S_r .

Оценка показателя правильности методики анализа

В данном случае необходимый для расчета массив экспериментальных данных для каждого поддиапазона с принятым постоянным значением показателя воспроизводимости методики анализа получают в соответствии с методикой анализа в виде серии L результатов анализа определяемого компонента в пробе X и в «пробе с измененной навеской (измененным объемом)» X' , максимально варьируя при этом условия проведения анализа: разные лаборатории, разное время, разные операторы, разные наборы мерной посуды и т. д. Анализ каждой пары (пробы и «пробы с измененной навеской») проводят в одинаковых условиях, причем число L результатов анализа пробы и «пробы с измененной навеской» должно совпадать.

Рассчитывают значения следующих величин:

- среднее значение результатов анализа пробы

$$\bar{X} = \frac{\sum_{l=1}^L X_l}{L} \quad (34)$$

- среднее значение результатов анализа «пробы с измененной навеской»

$$\bar{X}' = \frac{\sum_{l=1}^L X'_l}{L} \quad (35)$$

- СКО, характеризующее случайный разброс результатов анализа пробы

$$S_1 = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L (X_l - \bar{X})^2}{L - 1}} \quad (36)$$

- СКО, характеризующее случайный разброс результатов анализа «пробы с измененной навеской»

$$S_2 = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L (X'_l - \bar{X}')^2}{L - 1}} \quad (37)$$

- значение смещения

$$\Theta = \bar{X} - \bar{X}' \quad (38)$$

- рассчитанное значение t-критерия

$$t = \frac{|\Theta|}{\sqrt{\frac{S_1^2}{L} + \frac{S_2^2}{L}}} \quad (39)$$

Расчетное значение t сравнивают с $t_{\text{табл}}$ при числе степеней свободы $f=L-1$ и доверительной вероятностью $P = 0,95$.

Если $t \leq t_{\text{табл}}$, то значение смещения незначимо на фоне случайного разброса, и в этом случае его принимают равным нулю ($\theta=0$).

Если $t > t_{\text{табл}}$, то значение смещения значимо на фоне случайного разброса. В этом случае может быть принято решение о введении в результаты анализа, получаемые при реализации данной методики, поправки на значение θ .

При незначимости Θ или при принятом для методики анализа решении о введении в результаты анализа поправки показатель правильности методики анализа для принятой вероятности $P = 0,95$ рассчитывают по формуле:

$$\Delta_c = 1,96 \sqrt{\frac{S_1^2}{L} + \frac{S_2^2}{L}} = 1,96 \cdot \sigma_c \quad (40)$$

Оценка показателя точности методики анализа

Верхнюю (Δ_B) и нижнюю (Δ_H) границы, в которых погрешность результата анализа находится с принятой вероятностью $P = 0,95$, рассчитывают по формуле:

$$\Delta_B = |\Delta_H| = \Delta = 1,96 \sqrt{\sigma_r^2 + \sigma_c^2} = 1,96 \sigma \quad (41)$$

Глава 3 Твердофазное спектрофотометрическое определение суммарного содержания антиоксидантов с использованием индикаторной системы Cu(II)-Nc, иммобилизованной в ПММ

3.1 Создание аналитической системы ПММ-Cu(II)-Nc для определения суммарного содержания антиоксидантов

Механизм твердофазной экстракции в объем ПММ основан на гидрофильной силе полиэтиленгликоля, обеспечивающей диффузию вещества в матрицу. Селективность процесса диффузии обеспечивается химическими реакциями окисления-восстановления и комплексообразования с предварительно введенными в матрицу реагентами. Последовательная твердофазная экстракция ионов меди(II) и неocupроина помещает комплекс Cu(II)-Nc в ячейки жесткокаркасной структуры ПММ согласно рисунку 12.

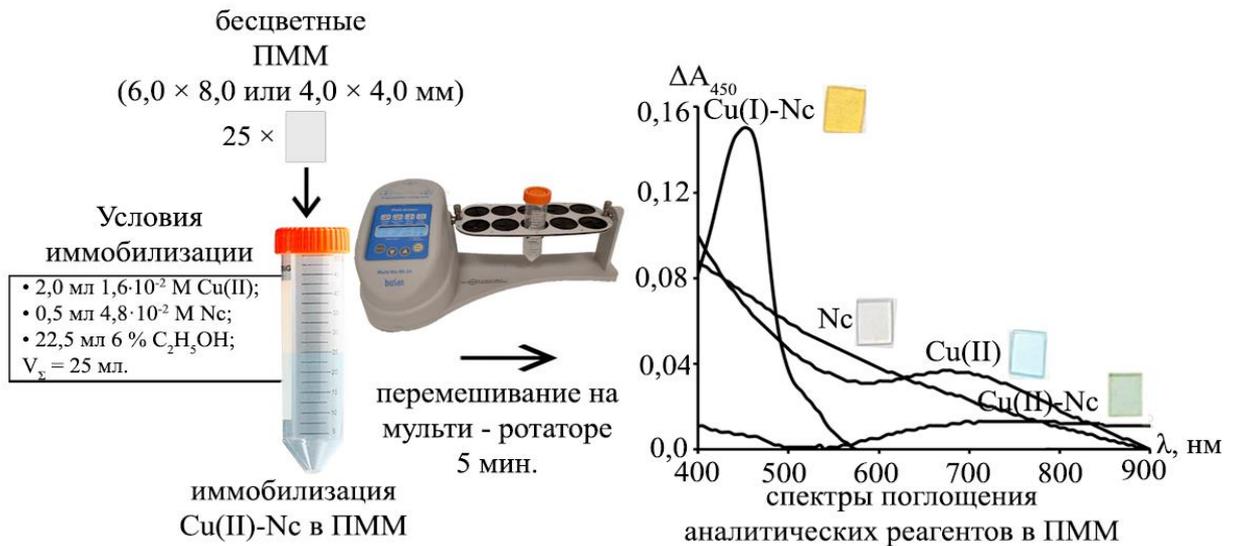


Рисунок 12 – Схема иммобилизации индикаторной системы Cu(II)-Nc в ПММ

Подбор условий иммобилизации индикаторной системы Cu(II)-Nc в полиметакрилатную матрицу проводили с помощью изучения концентрации неocupроина и меди, а также их варьирования на величину аналитического сигнала. Результаты представлены в таблице 4. Из таблицы 4 видно, что наибольший коэффициент градуировочной зависимости определения аскорбиновой кислоты наблюдается для состава номер 2, где медь и неocupроин

взяты не в стехиометрическом соотношении 1:2, а в избытке Cu(II) для смещения равновесия окислительно-восстановительной реакции вправо, т.е. в сторону образования продукта реакции.

Таблица 4 – Результаты подбора условий иммобилизации Cu(II)-Nc в ПММ

Номер состава	C(Cu(II))*, 10 ⁻³ моль/л	C(Nc)*, 10 ⁻⁴ моль/л	Коэффициент чувствительности градуировочной зависимости	R ²
1	5,0	7,7	0,36·10 ⁴ C _{AK}	0,971
2	1,3	7,7	0,40·10 ⁴ C _{AK}	0,990
3	5,0	1,9	0,09·10 ⁴ C _{AK}	0,990
4	1,3	1,9	0,13·10 ⁴ C _{AK}	0,996

*V_Σ = 25,0 см³

Таким образом, иммобилизацию Cu(II)-Nc в ПММ проводили в одну стадию. Двадцать пять бесцветных ПММ выдерживали в течение 5 минут в растворе, содержащем 0,5 см³ 1% раствора неокупроина в этиловом спирте, 1,6 см³ этилового спирта и 2,0 см³ раствора меди(II) 1 мг / см³ в объеме 25,0 см³.

Использование ПММ в качестве твердой фазы имеет преимущества во времени иммобилизации и размере сенсора по сравнению с другими твердыми фазами, такими как нафионовая мембрана и каррагинан (табл. 5).

Таблица 5 – Сравнение условий и размера сенсоров при иммобилизации индикаторной системы Cu(II)-Nc в твердую фазу

Фаза	Время иммобилизации, мин.	Размер сенсора, мм	Иммобилизация	Особенности подготовки сенсора
Каррагинан [96]	90	35,0 × 5,0	Твердофазная экстракция Cu(II)-Nc из водно-спиртового раствора	Длительность подготовки твердой фазы (24 ч) и иммобилизации реагентов, использование биополимера ограничивает срок годности сенсора

Продолжение таблицы 5

Нафионовая мембрана [93, 94]	30	45,0 × 5,0 или 20,0 × 10,0	Длительность иммобилизации, высокая стоимость материала, пожелтение твердой фазы при хранении
ПММ	5	6,0 × 8,0 или 4,0 × 4,0	Длительный срок хранения твердой фазы (до 10 лет), быстрая иммобилизация за счет твердофазной экстракции

На рисунке 13 представлена схема определения суммарного содержания АО методом CUPRAC с использованием ПММ-Cu(II)-Nc. Для определения суммарного содержания АО ПММ-Cu(II)-Nc опускали в раствор АО с последующим извлечением пластинки для измерения аналитического сигнала с помощью спектрофотометра или смартфона.

Рисунок 14 – Схема определения Σ АО методом CUPRAC

Иммобилизованная индикаторная система Cu(II)-Nc в ПММ сохраняет свою способность взаимодействовать с АО: тролокс, танин, гидрат катехина, цистеин, дигидрокверцетин, кверцетин, лютеолин, аскорбиновая кислота. После контакта АО с Cu(II)-Nc в ПММ наблюдается изменение цвета с голубого на желтый ($\lambda=450$ нм), вследствие восстановления Cu(II) до Cu(I) и образования хелатного комплекса Cu(I) с лигандом неocupроином. На рисунке 14 представлены спектры поглощения индикаторной системы Cu(II)-неocupроин, иммобилизованной в ПММ, до и после контакта с растворами АО.

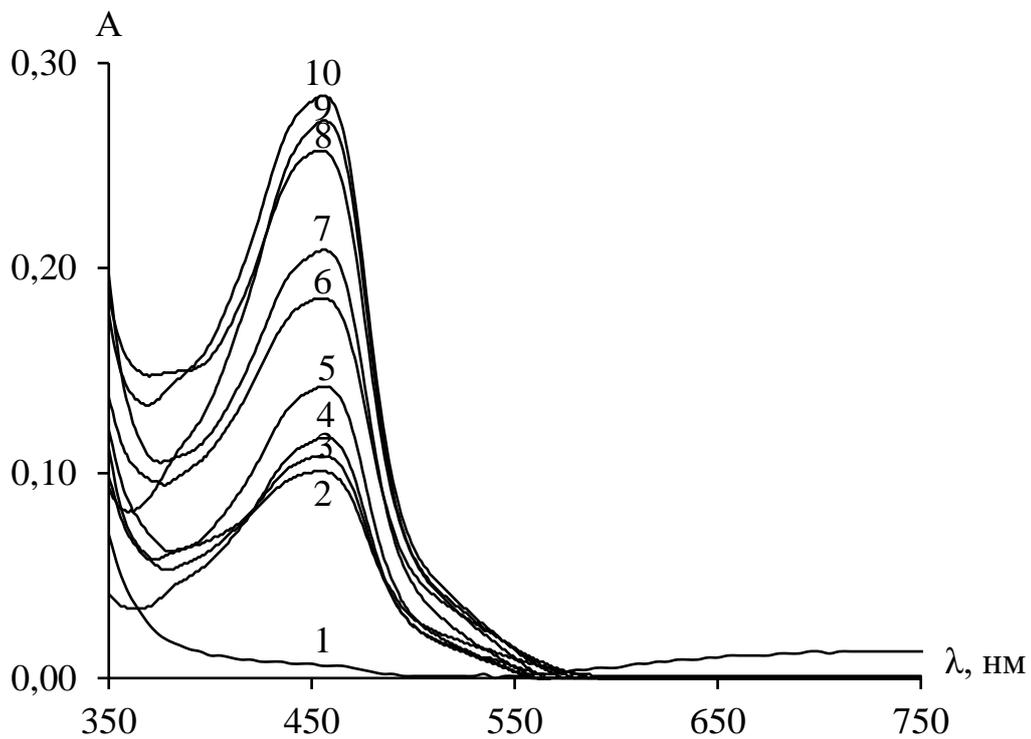


Рисунок 14 – Спектры поглощения ПММ с иммобилизованной индикаторной системой Cu(II)-неocupроин после контакта с раствором, не содержащим АО (контрольный опыт) (1); и растворами АО: тролокс (2); танин (3); гидрат катехина (4); цистеин (5), дигидрокверцетин (6), кверцетин (7), лютеолин (8), аскорбиновая кислота (9), галловая кислота (10)

3.2 Условия взаимодействия антиоксидантов с окислительно-восстановительной системой Cu(II)-(Nc), иммобилизованной в ПММ

Для установления оптимальных условий взаимодействия антиоксидантов с индикаторной системой Cu(II)-Nc, иммобилизованной в ПММ, были изучены зависимости изменения аналитического от pH раствора и времени контакта фаз.

Исследование влияния pH растворов АО на поглощение пластин ПММ-Cu(II)-Nc показало, что часть АО способно взаимодействовать в узкой области pH 2 – 4 (АК, ГК, ТР) в отличие от полифенольных соединений и тиоловых АО (Л, ДКВ, КВ, Т, К, Ц), характеризующихся широким диапазоном pH 3,5 – 10 (рис. 15). Следует отметить, что чем в более кислой области происходит ионизация АО, тем уже их диапазон взаимодействия, что обусловлено слабоосновным характером поверхности ПММ и ее способностью экстрагировать вещества в положительно заряженной и нейтральной формах из растворов. Однако, экспериментально показано существование общего для всех АО диапазона pH 3,5 – 4, в котором проведено определение Σ АО с использованием аналитической системы ПММ-Cu(II)-Nc.

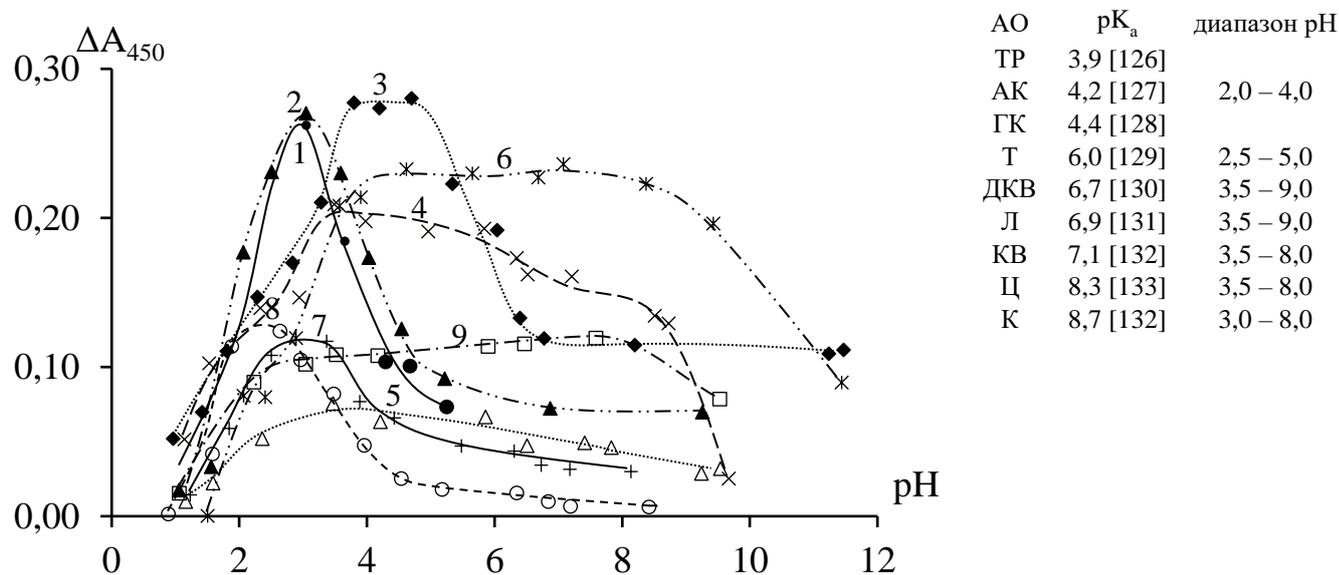


Рисунок 15 – Зависимость изменения аналитического сигнала от pH раствора антиоксидантов: 1 – аскорбиновая кислота, 2 – галловая кислота, 3 – кверцетин, 4 – дигидрокверцетин, 5 – цистеин, 6 – лютеолин, 7 – таннин, 8 – тролокс, 9 – гидрат катехина

Изучение зависимости изменения аналитического сигнала от времени контакта фаз проводили на примере аскорбиновой кислоты в виду ее

экономической доступности и распространённости в реальных образцах. Продолжительность контакта полиметакрилатной матрицы определяет интервал линейности зависимости изменения аналитического сигнала от концентрации аскорбиновой кислоты в растворе и значение коэффициента аппроксимации. На рисунке 16 показаны зависимости изменения аналитического сигнала от концентрации АК, уравнения полученных зависимостей представлены в таблице 6. Как видно, увеличение времени контакта аскорбиновой кислоты с изучаемой системой, иммобилизованной в ПММ, приводит к повышению чувствительности определения АК с сохранением диапазона линейности получаемых градуировочных зависимостей. В качестве оптимального времени контакта ПММ-Cu(II)-Ns с АО выбрали 20 мин, ввиду экспрессности и наибольшего значения коэффициента аппроксимации.

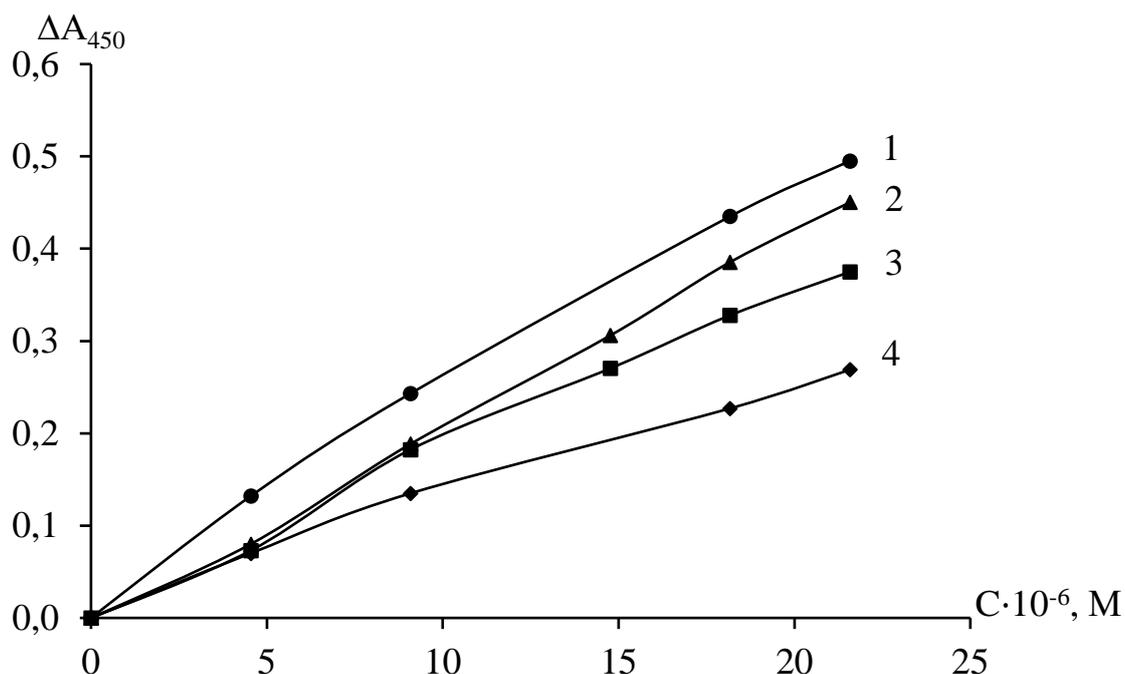


Рисунок 16 – Зависимость изменения аналитического сигнала от концентрации аскорбиновой кислоты в растворе при времени контакта фаз в мин.: 30 (1), 20 (2), 15 (3) и 10 (4)

Таблица 6 – Параметры зависимостей изменения аналитического сигнала от концентрации аскорбиновой кислоты в системе при различном времени контакта

Время контакта, мин	Уравнение градуировочной зависимости	R ²	Диапазон линейности градуировочной зависимости, 10 ⁻⁶ моль/л
10	$\Delta A_{450} = 1,3 \cdot 10^4 C_{AK}$	0,990	4,5 – 22,0
15	$\Delta A_{450} = 1,8 \cdot 10^4 C_{AK}$	0,994	
20	$\Delta A_{450} = 2,1 \cdot 10^4 C_{AK}$	0,998	
30	$\Delta A_{450} = 2,4 \cdot 10^4 C_{AK}$	0,990	

Построение градуировочных зависимостей для определения АО с использованием ПММ-Cu(II)-Nc проводили при времени контакта Cu(II)-Nc-ПММ с растворами АО 20 минут и pH = 3,5.

На рисунке 17 показаны градуировочные зависимости, уравнения градуировочных зависимостей представлены в таблице 7 для определения различных АО методом твердофазной спектрофотометрии.

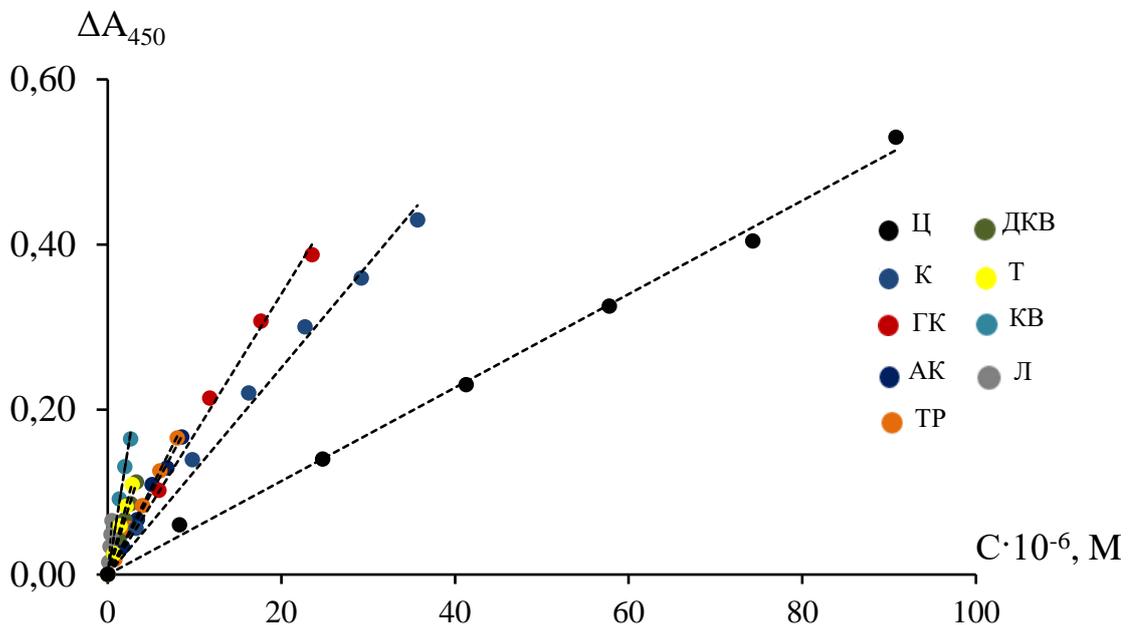


Рисунок 17 – Градуировочные зависимости для определения Σ АО с использованием ПММ-Cu(II)-Nc

Таблица 7 – Параметры градуировочных зависимостей антиоксидантов

Антиоксиданты	Уравнения градуировочной зависимости	R ²	Диапазон определяемых содержаний, 10 ⁻⁶ моль/л
Галловая кислота	$\Delta A_{450} = 1,7 \cdot 10^4 C_{ГК}$	0,996	6,0 – 24,0
Аскорбиновая кислота	$\Delta A_{450} = 2,0 \cdot 10^4 C_{АК}$	0,995	1,7 – 9,0
Танин	$\Delta A_{450} = 14 \cdot 10^4 C_{Т}$	0,999	0,1 – 0,5
Тролокс	$\Delta A_{450} = 2,1 \cdot 10^4 C_{ТР}$	0,998	0,8 – 8,0
Дигидрокверцетин	$\Delta A_{450} = 3,4 \cdot 10^4 C_{ДКВ}$	0,998	0,7 – 3,3
Кверцетин	$\Delta A_{450} = 6,5 \cdot 10^4 C_{КВ}$	0,990	0,7 – 3,3
Лютеолин	$\Delta A_{450} = 3,9 \cdot 10^4 C_{Л}$	0,997	0,7 – 2,8
Цистеин	$\Delta A_{450} = 0,57 \cdot 10^4 C_{Ц}$	0,997	8,0 – 91,0
Гидрат катехина	$\Delta A_{450} = 1,2 \cdot 10^4 C_{К}$	0,991	3,0 – 36,0

Полученные градуировочные зависимости определения АО методом твердофазной спектрофотометрии имеют линейный характер при времени контакта 20 мин и цитратном буфере с pH 3,5.

3.3 Результаты исследования влияния выбора вещества-стандарта на определение суммарного содержания антиоксидантов с использованием системы Cu(II)-Nc, иммобилизованной в ПММ

Одним из условий применения твердофазных сенсоров для определения суммарного содержания АО в реальных образцах является аддитивность аналитического сигнала модельных смесей антиоксидантов. Это связано с тем, что в реальных образцах сосуществует смесь АО с различными концентрациями, которые в разной степени вносят вклад в общий измеряемый сигнал. Аддитивность аналитических сигналов модельных смесей проверяли по 3S – критерию, сравнивая $|\Delta A|$ с утроенным значением его среднего квадратического отклонения, где $|\Delta A|$ является разностью между аналитическими сигналами смеси и отдельных восстановителей при $\lambda = 450$ нм. Для всех смесей $|\Delta A| < 3S$, что говорит о статистически незначимом отклонении от аддитивности. В качестве примера на рисунке 18 представлены спектры поглощения исследуемой системы после контакта матрицы с раствором модельной смеси, с растворами индивидуальных восстановителей, входящих в эту смесь, и раствором, не

содержащим АО (контрольный опыт). Для смеси №4 $|\Delta A|$ при $\lambda = 450$ нм меньше утроенного значения его среднего квадратического отклонения ($0,013 < 0,023$), что подтверждает аддитивности аналитических сигналов.

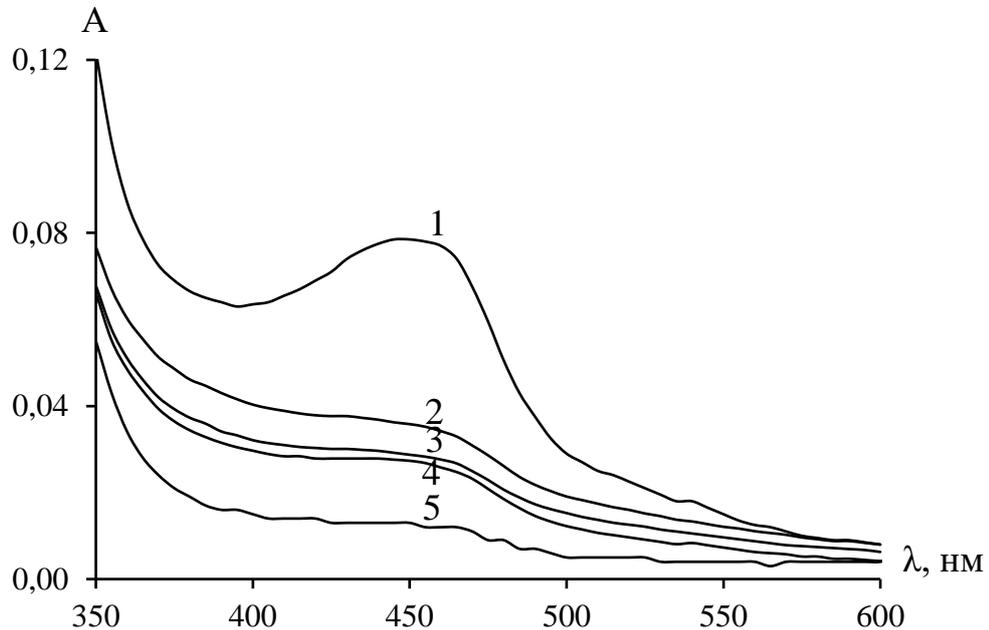


Рисунок 18 – Спектры поглощения индикаторной системы Cu(II)-Nc, иммобилизованной в ПММ, после контакта матрицы с раствором модельной смеси № 4 (1); с растворами восстановителей, входящих в эту смесь с концентрациями, $C_{АО} \cdot 10^{-6}$ моль-экв/л: $C_{АК} = 2,3$ (2), $C_{ГК} = 3,5$ (3), $C_{ТР} = 1,6$ (4); и раствором, не содержащим АО (контрольный опыт) (5)

Одним из способов выражение суммарного содержания антиоксидантов является представление в виде количества вещества-стандарта, производящего антиоксидантный эффект. Чаще всего в зарубежных исследованиях в качестве вещества-стандарта используют тролокс, а в отечественных источниках – аскорбиновую и галловую кислоты. В связи с этим нами было проведено исследование влияния выбора $X_{ст}$ на определение $\Sigma АО$ с использованием ПММ-Cu(II)-Nc, путем сравнения теоретических и экспериментальных значений $\Sigma АО$ модельных смесей. В качестве $X_{ст}$ были выбраны: ТР, КВ, ГК и АК. Для формирования модельных смесей были выведены уравнения количественного соответствия, которые получены приравниванием уравнений градуировочной зависимости $X_{ст}$ – ГК, АК, ТР и КВ и изучаемого АО:

$$k_{ст} \cdot c_{ст} = k_x \cdot c_x \quad (42)$$

$$c_{\text{ст}} = \frac{k_x \cdot c_x}{k_{\text{ст}}}, \quad (43)$$

где X – антиоксидант.

Таким образом, теоретическая величина суммарного содержания антиоксидантов представляет собой:

$$\Sigma \text{АО}_{\text{теор}} = \frac{k_1 \cdot c_1}{k_{\text{ст}}} + \frac{k_2 \cdot c_2}{k_{\text{ст}}} + \frac{k_3 \cdot c_3}{k_{\text{ст}}} + \dots + \frac{k_n \cdot c_n}{k_{\text{ст}}}, \quad (44)$$

где 1, 2, ..., n – индивидуальные восстановители модельной смеси

Концентрации модельных смесей не выходили за область линейной зависимости, при этом наблюдалась аддитивность поглощения компонентов согласно закону Бугера-Ламберта-Бэра. Экспериментальные значения $\Sigma \text{АО}$ определяли по величине изменения аналитического сигнала модельной смеси, рассчитанной по усредненному уравнению регрессии зависимости изменения аналитического сигнала от количества $X_{\text{ст}}$.

Теоретически рассчитанные и экспериментально полученные значения суммарного содержания антиоксидантов приведены в таблицы 8, $C_{\text{АО}} \cdot 10^{-6}$ моль/л: 1 – $C_{\text{КВ}} = 0,26$; $C_{\text{ГК}} = 1,2$; $C_{\text{АК}} = 0,57$; $C_{\text{ТР}} = 0,48$; 2 – $C_{\text{ГК}} = 0,71$; $C_{\text{АК}} = 1,1$; $C_{\text{ТР}} = 0,32$; 3 – $C_{\text{КВ}} = 0,33$; $C_{\text{АК}} = 0,57$; $C_{\text{ТР}} = 0,59$; 4 – $C_{\text{ГК}} = 1,2$; $C_{\text{АК}} = 1,1$; $C_{\text{ТР}} = 0,8$. Для сопоставления теоретических и экспериментальных значений $\Sigma \text{АО}$ проводили расчет отклонения экспериментально полученного значения суммарного содержания АО к теоретически рассчитанному (δC , %). δC , % = $\frac{(\Sigma \text{АО}_{\text{эксп}} - \Sigma \text{АО}_{\text{теор}})}{\Sigma \text{АО}_{\text{теор}}} \cdot 100$, где $\Sigma \text{АО}_{\text{теор}}$ и $\Sigma \text{АО}_{\text{эксп}}$ – теоретически рассчитанное и экспериментально полученные значения $\Sigma \text{АО}$ соответственно. Из данных таблицы 8 видно, что $\Sigma \text{АО}_{\text{эксп}}$ и $\Sigma \text{АО}_{\text{теор}}$ в пересчете на АК, ГК и ТР удовлетворительно согласуются, значения δC не превышает 10 %. Наибольшее несоответствие теоретической и экспериментальной величины суммарного содержания антиоксидантов в модельных смесях выявлено при пересчете на КВ. Проанализировав результаты, решили исключить кверцетин как вещество-стандарт. Таким образом, в качестве веществ-стандартов были выбраны: галловая кислота, аскорбиновая кислота и тролокс.

Таблица 8 – Значения $\Sigma\text{АО}$ в модельных смесях в пересчете на разные вещества-стандарты

Номер смеси	Значение $\Sigma\text{АО}$ в пересчете на вещество-стандарт, 10^{-6} моль/л											
	Аскорбиновая кислота			Кверцетин			Тролокс			Галловая кислота		
	$\Sigma\text{АО}_{\text{теор}}$	$\Sigma\text{АО}_{\text{эксп}}$	$\delta\text{C},\%$	$\Sigma\text{АО}_{\text{теор}}$	$\Sigma\text{АО}_{\text{эксп}}$	$\delta\text{C},\%$	$\Sigma\text{АО}_{\text{теор}}$	$\Sigma\text{АО}_{\text{эксп}}$	$\delta\text{C}^*,\%$	$\Sigma\text{АО}_{\text{теор}}$	$\Sigma\text{АО}_{\text{эксп}}$	$\delta\text{C},\%$
1	2,9	3,0±0,2	2,2	0,9	1,10±0,07	20	2,8	3,1±0,2	10	3,5	3,8±0,3	9,5
2	2,1	2,0±0,4	-2,9	0,64	0,78±0,13	22	2,0	2,1±0,4	9,4	2,4	2,7±0,5	7,5
3	2,1	2,0±0,3	-5,7	0,66	0,78±0,08	19	2,0	2,1±0,3	6,2	2,5	2,7±0,3	4,3
4	3,0	2,7±1,1	-9,2	0,97	0,90±0,11	6,1	2,8	2,7±0,5	-3,0	3,5	3,4±0,4	-4,3

По предлагаемому способу были проанализированы лекарственные настойки, чай и соки. В таблице 9 представлены результаты определения $\Sigma\text{АО}$ в пересчете на выбранные $X_{\text{ст}}$.

Таблица 9 – Результаты определения $\Sigma\text{АО}$ в реальных образцах в пересчете на выбранные $X_{\text{ст}}$ ($n=3$, $P=0,95$)

Объект исследования	$\Sigma\text{АО}$ в пересчете на разные $X_{\text{ст}}$, 10^{-4} моль/л		
	АК	ГК	ТР
<i>Лекарственные настойки</i>			
Экстракт родиолы	177±8	195±9	147±7
Экстракт левзеи	80±22	90±23	71±19
Настойка семян лимонника	26±12	29±14	22±9
Экстракт элеутерококка	28±6	31±6	22±5
Эхинацея	27±6	31±7	24±6
Женьшень	3,38±0,14	3,81±0,15	2,96±0,12
<i>Соковая продукция</i>			
Сок яблоко-вишня (1)	2,53±0,16	3,09±0,19	2,37±0,15
Сок яблоко-смородина	1,91±0,06	2,33±0,08	1,79±0,06
Морс ягодный	3,82±0,13	4,65±0,16	3,58±0,13
Сок вишня-яблоко (2)	1,93±0,10	2,36±0,12	1,81±0,10
$\Sigma\text{АО}$ в пересчете на разные $X_{\text{ст}}$, 10^{-4} моль на 100 г листьев			
<i>Зеленый чай</i>			
Зеленый (1)	510±30	620±40	459±29
Ганпаундер	590±30	720±40	530±30
Молочный зеленый	750±40	910±50	680±40
Зеленый (2)	790±50	960±70	730±50
<i>Черный чай</i>			
Пуэр	190±40	230±50	160±40
Черный (1)	98±28	120±30	81±26
Черный (2)	310±50	380±60	270±40

3.4 Оценка показателей качества твердофазного спектрофотометрического способа определения Σ АО с использованием системы Cu(II)-Nc, иммобилизованной в ПММ

3.4.1 Сопоставительный анализ суммарного содержания антиоксидантов с аналогичными показателями пищевых продуктов

Для косвенного доказательства правильности предлагаемой методики использовали сопоставительный анализ полученных значений Σ АО с аналогичными показателями пищевых продуктов, который проводили с помощью пакета корреляционного анализа Excel. Для выявления связи между суммарным содержанием антиоксидантов и другими аналогичными показателями в анализируемой пищевой продукции провели расчет коэффициентов корреляции (r). Для определения показателей пищевых продуктов использовали: метод Фолина-Чокальтеу для определения фенольных соединений, спектрофотометрический метод определения содержания флавоноидов и танинов с использованием $AlCl_3$, метод определения антоцианов, основанный на применении рН-дифференциальной спектрофотометрии.

Лекарственные настойки

Наибольшую ценность имеют те виды растений, которые обладают более широким спектром действующих веществ. Существенный вклад в Σ АО в лекарственных травах вносят флавоноиды, танины, оксиароматические кислоты, природные полифенолы и витамины [134].

Результаты полученных суммарных показателей лекарственных настоек приведены в таблице 10. Из рисунков 19-22 и таблицы 11 видно, что между суммарным содержанием АО и остальными характеристиками наблюдается взаимосвязь с коэффициентами корреляции от 0,92 до 0,99 вне зависимости от $X_{ст}$, кроме содержания флавоноидов, для которых $r = 0,81$. Это может быть связано с ограничением определения флавоноидов по методике с $AlCl_3$, так как с помощью данной методики возможно определение только флавонов, имеющих в

молекуле гидроксильные группы в положении 3 и/или 5 [135, 136]. Следовательно, исходя из данных, представленных на рисунках 19-22 и в таблице 11 можно утверждать, что наибольший вклад в суммарное содержание антиоксидантов в лекарственных настойках вносят танины и фенольные соединения. При этом результаты, полученные методом Фолина-Чокальтеу, выше суммарного содержания АО в исследуемых образцах лекарственных настоек ввиду не селективности реагента для определения фенольных соединений, а также уменьшения содержания АО в процессе хранения спиртовых экстрактов лекарственных настоек [50, 67, 137]

Таблица 10 – Результаты определения суммарных показателей лекарственных настоек

Объект исследования	Фенольные соединения в пересчете на ГК, 10^{-4} моль/л	Флавоноиды в пересчете на Р, 10^{-4} моль/л	Танины в пересчете на Т, 10^{-4} моль/л	Σ флавоноидов и танинов, 10^{-4} моль/л
Экстракт родиолы	773 \pm 5	87 \pm 10	67,4 \pm 0,4	154,4
Экстракт Левзеи	355 \pm 50	38 \pm 3	52,5 \pm 0,4	90,5
Настойка семян лимонника	81 \pm 4	61,1 \pm 1,6	20,83 \pm 0,23	81,9
Экстракт элеутерококка	86 \pm 14	9,5 \pm 0,7	14,6 \pm 0,5	24,1
Эхинацея	120,6 \pm 1,4	15,04 \pm 0,16	25,3 \pm 0,4	40,3
Женьшень	6,5 \pm 1,2	3,9 \pm 0,3	2,34 \pm 0,23	6,2

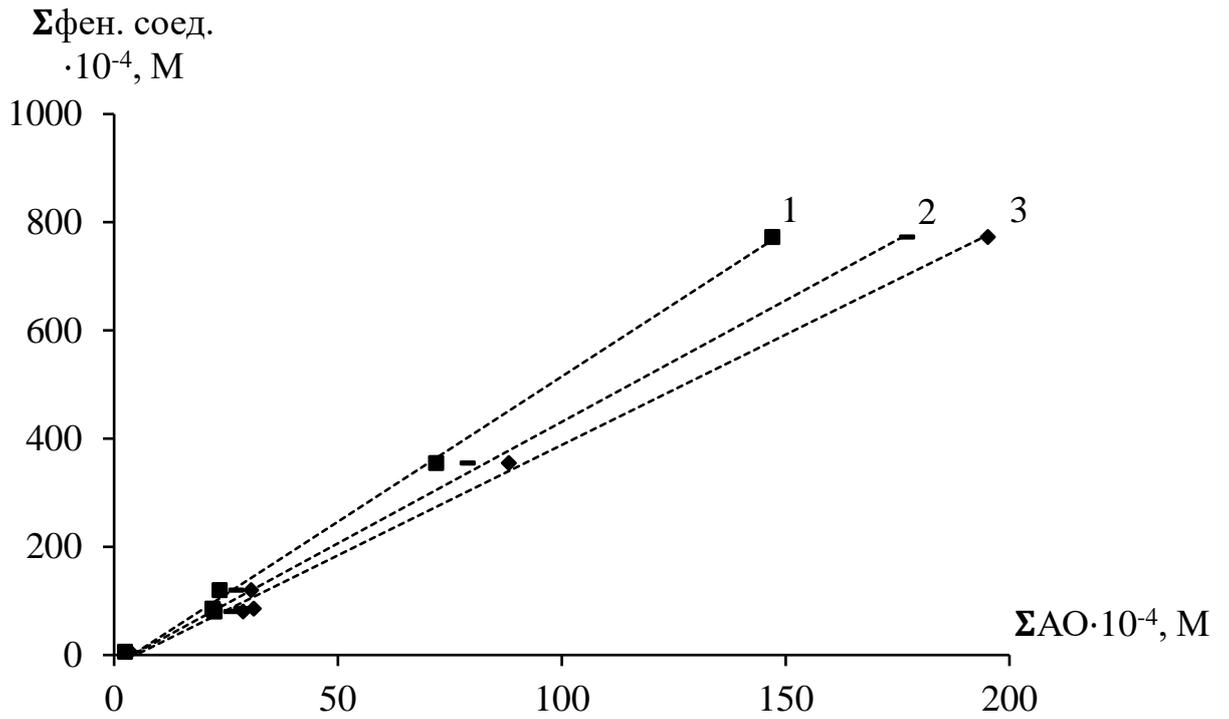


Рисунок 19 – Взаимосвязь между Σ АО и суммарным содержанием фенольных соединений в лекарственных настойках, в качестве вещества стандарта: 1 – TP; 2 – АК; 3 – ГК

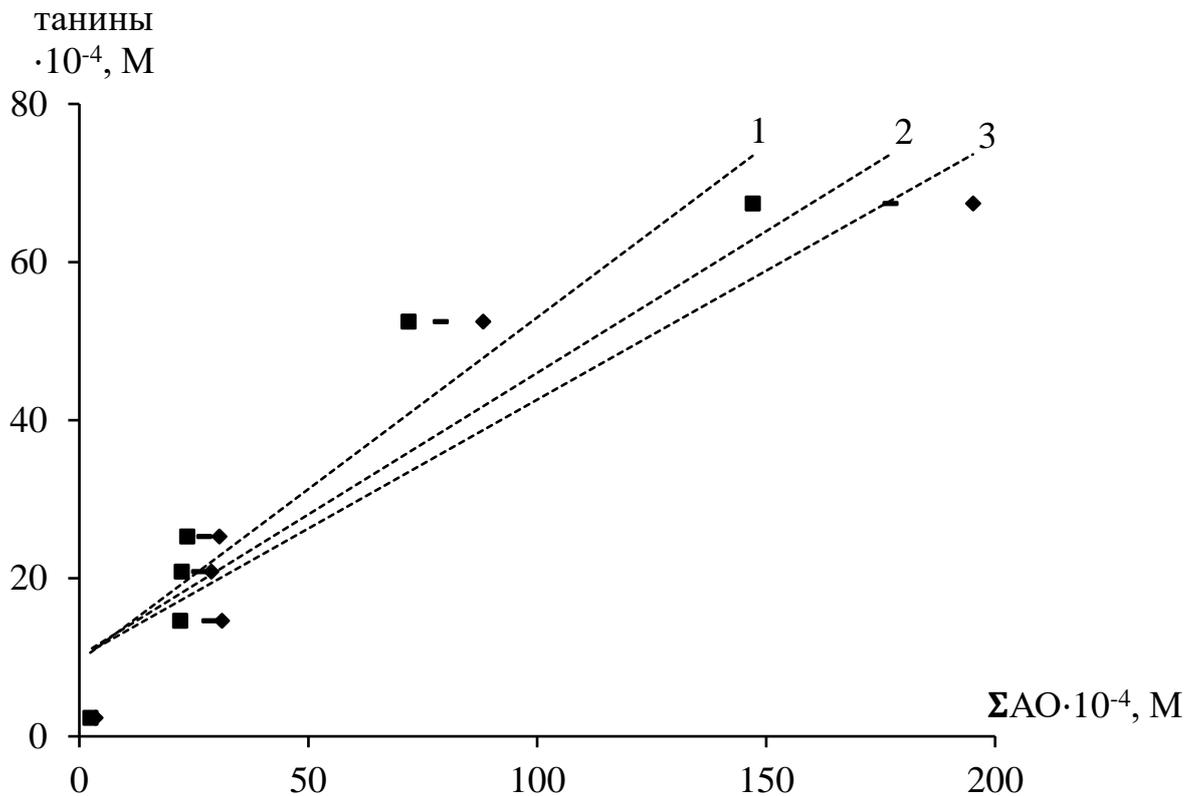


Рисунок 20 – Взаимосвязь между Σ АО и содержанием танинов в лекарственных настойках, в качестве вещества стандарта: 1 – TP; 2 – АК; 3 – ГК

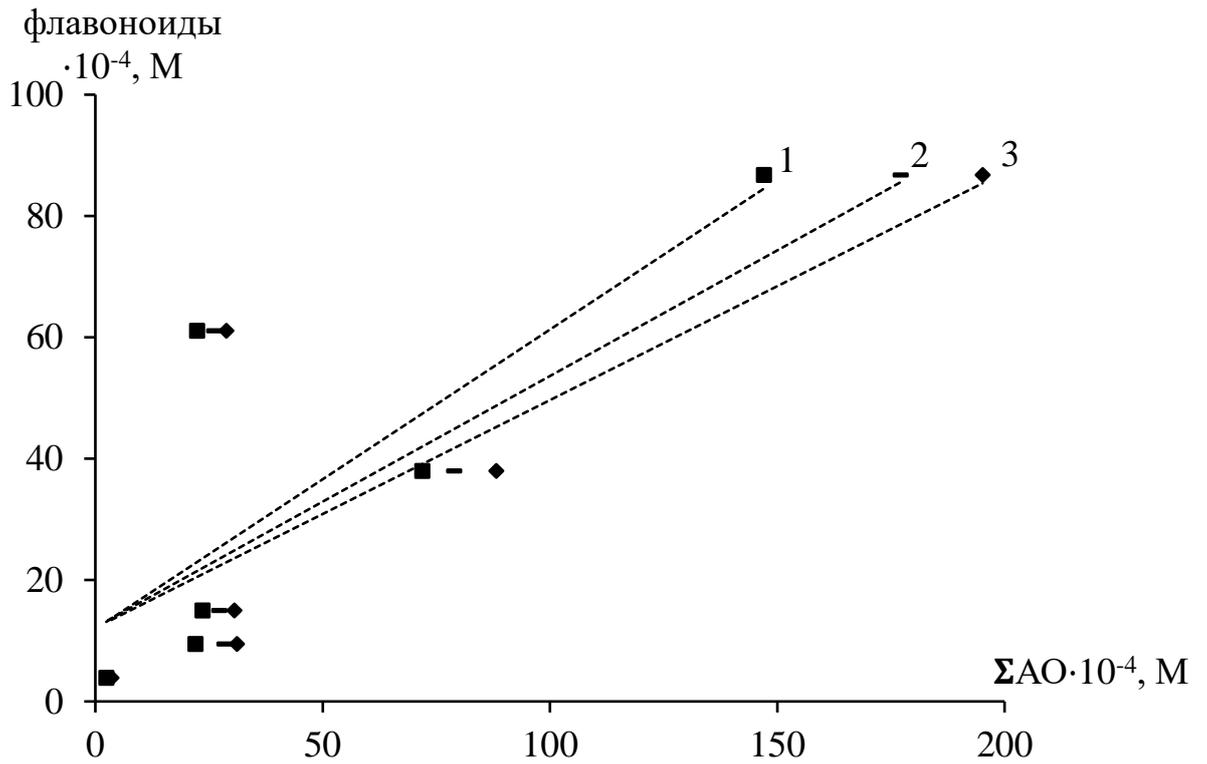


Рисунок 21 – Взаимосвязь между Σ АО и содержанием флавоноидов в лекарственных настойках, в качестве вещества стандарта: 1 – ТР; 2 – АК; 3 – ГК

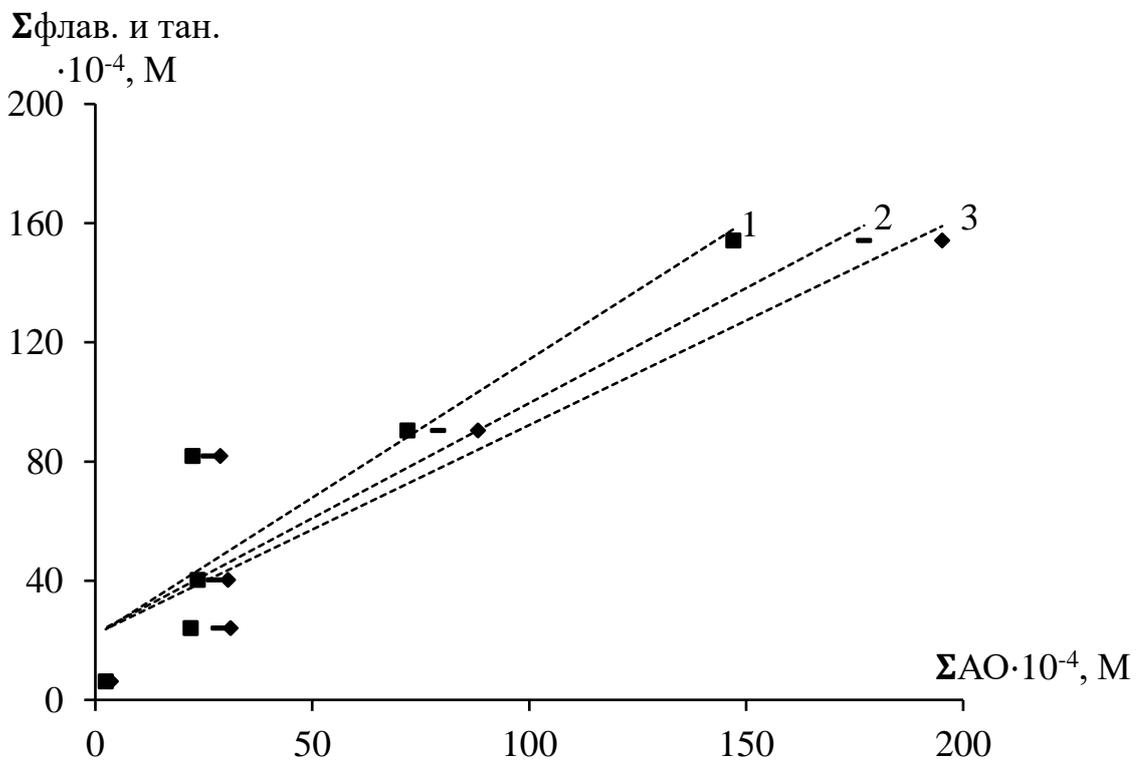


Рисунок 22 – Взаимосвязь между Σ АО и Σ флавоноидов и танинов в лекарственных настойках, в качестве вещества стандарта: 1 – ТР; 2 – АК; 3 – ГК

Таблица 11 – Коэффициенты корреляции полученных зависимостей суммарного содержания АО и суммарных показателей в лекарственных настойках

Вещества-стандарты	Содержание фенольных соединений	Содержание танинов	Содержание флавоноидов	Σ флавоноидов и танинов
АК	0,99	0,94	0,81	0,92
ГК	0,99	0,94	0,81	0,92
ТР	0,99	0,95	0,81	0,92

Соковая продукция

Результаты полученных суммарных показателей соковой продукции приведены в таблице 12. Из представленных в таблице 12 данных видно, что наибольшее содержания фенольных соединений выявлено в соке яблоко-вишня (1) $16,80 \cdot 10^{-4}$ моль/л в пересчете на ГК, наименьшее – $11,92 \cdot 10^{-4}$ моль/л в пересчете на ГК в соке яблоко-смородина. Также в соковой продукции проводилось определение антоцианов, обладающих антиоксидантной активностью. Это пигментные вещества, которые содержатся в растениях и определяют окраску листьев и плодов. Поэтому для определения их содержания подходили соки, имеющие красную, фиолетовую, синюю, оранжевую, коричневую и пурпурную окраски. Из исследуемых соков наибольшее содержание антоцианов имеет морс ягодный $0,89 \cdot 10^{-4}$ моль/л, наименьшее $0,33 \cdot 10^{-4}$ сок яблоко-смородина. Взаимосвязь между Σ АО и содержанием фенольных соединений, и Σ АО и содержанием антоцианов представлена на рисунках 23 и 24 соответственно.

Таблица 12 – Результаты определения суммарных показателей соковой продукции

Объект исследования	Фенольные соединения в пересчете на ГК, 10^{-4} моль/л	Антоцианы, 10^{-4} моль/л
Сок яблоко-вишня (1)	$16,80 \pm 0,22$	$0,38 \pm 0,04$
Сок яблоко-смородина	$11,92 \pm 0,10$	$0,33 \pm 0,04$
Морс ягодный	$15,3 \pm 0,3$	$0,89 \pm 0,13$
Сок вишня-яблоко (2)	$12,7 \pm 0,3$	$0,36 \pm 0,04$

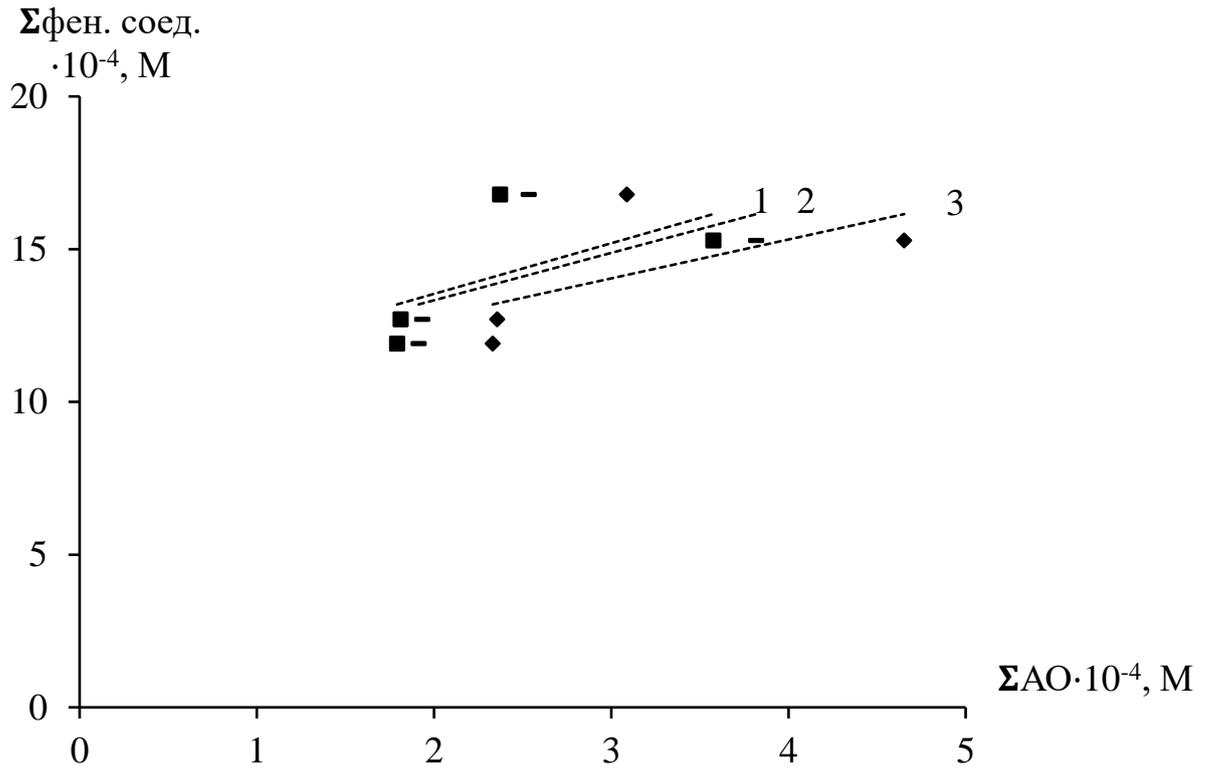


Рисунок 23 – Взаимосвязь между $\Sigma \text{АО}$ и суммарным содержанием фенольных соединений в соковой продукции, в качестве вещества стандарта: 1 – ТР; 2 – АК; 3 – ГК

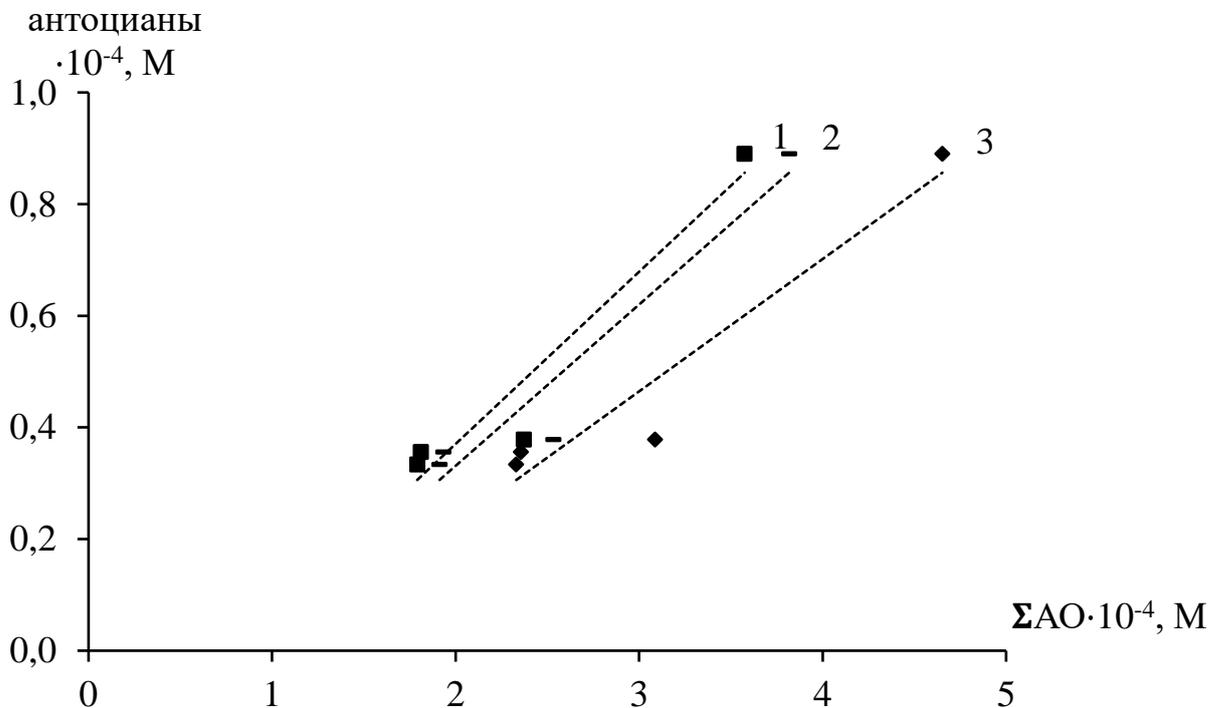


Рисунок 24 – Взаимосвязь между $\Sigma \text{АО}$ и содержанием антоцианов в соковой продукции, в качестве вещества стандарта: 1 – ТР; 2 – АК; 3 – ГК

Из рисунков (рис. 23-24) и таблицы 13 видно, что между изучаемыми признаками наблюдается взаимосвязь, а наибольший вклад в суммарное

содержание антиоксидантов в соковой продукции вносят антоцианы. Численное несоответствие суммарного содержания АО и содержания фенольных соединений обусловлено наличием сахаров в соках, что приводит к завышенным значениям определения содержания фенольных соединений методом Фолина-Чокальтеу, что согласуется с результатами, полученными в других работах [50, 67, 138].

Таблица 13 – Коэффициенты корреляции полученных зависимостей суммарного содержания АО и суммарных показателей в соковой продукции

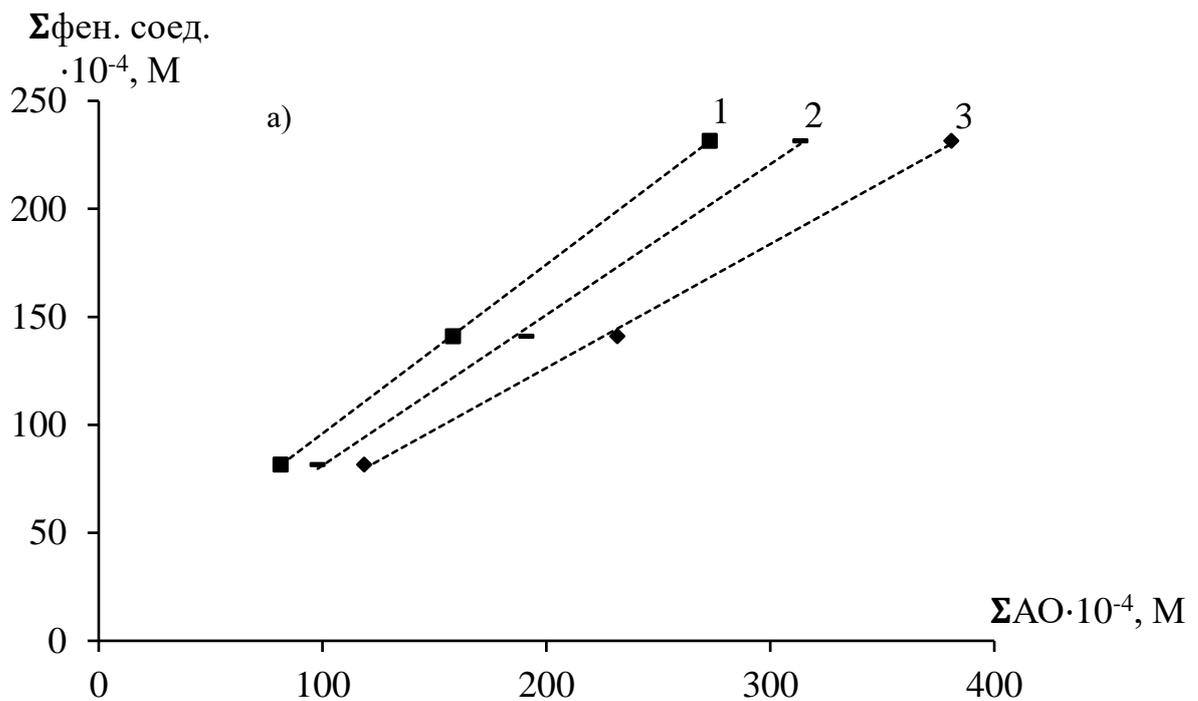
Вещества-стандарты	Содержание фенольных соединений	Содержание антоцианов
АК	0,61	0,96
ГК	0,61	0,96
ТР	0,61	0,96

Зеленый и черный чай

Суммарное содержание АО в чае обусловлено преимущественно наличием полифенольных соединений (фенолкарбоновые кислоты, низкомолекулярный катехин, танин, флавоноиды). Результаты полученных суммарных показателей чая представлены в таблице 14. Из представленных результатов видно, что наибольшее содержание этих компонентов определено в черном чае (2) и в молочном зеленом чае. Содержание фенольных соединений, флавоноидов и таннинов в зеленом чае выше, чем в черном, что обусловлено процессом обработки чайного листа при получении черного и зеленого чая. На рисунках 25-28 показаны зависимости суммарного содержания АО от суммарного содержания фенольных соединений, таннинов, флавоноидов и общего содержания флавоноидов и таннинов.

Таблица 14 – Результаты определения суммарных показателей черного и зеленого чая

Объект исследования	Фенольные соединения в пересчете на ГК, 10^{-4} моль на 100 г листьев	Флавоноиды в пересчете на Р, 10^{-4} моль на 100 г листьев	Танины в пересчете на Т, 10^{-4} моль на 100 г листьев	Σ флавоноидов и танинов, 10^{-4} моль на 100 г листьев
<i>Зеленый чай</i>				
Зеленый (1)	267±12	10,16±0,16	17,0±1,2	27,2
Ганпаундер	352±6	13,4±0,5	17,0±1,2	30,4
Молочный зеленый	459±29	12,1±0,5	23,17±0,29	35,3
Зеленый (2)	511±29	14,3±0,3	31,6±0,6	45,9
<i>Черный чай</i>				
Пуэр	141±9	14,7±1,6	8,8±0,6	23,5
Черный (1)	82±7	7,0±1,0	2,16±0,18	9,2
Черный (2)	232±13	11,0±0,5	68±5	79



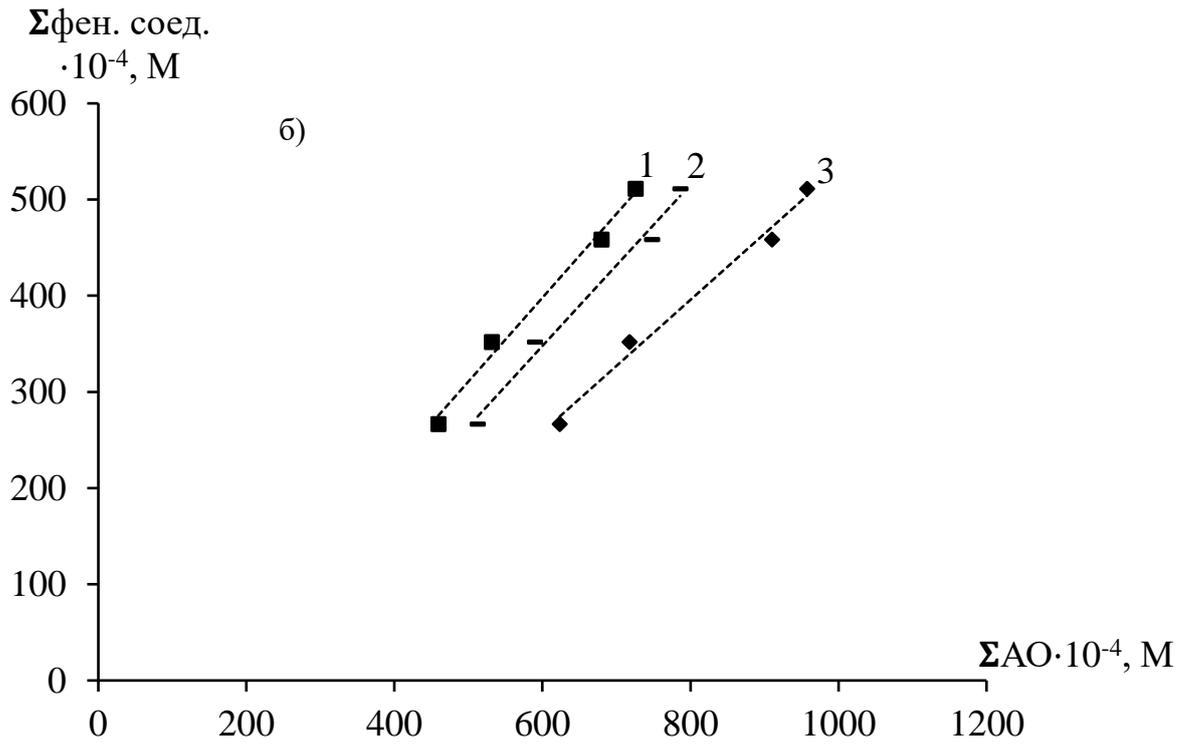
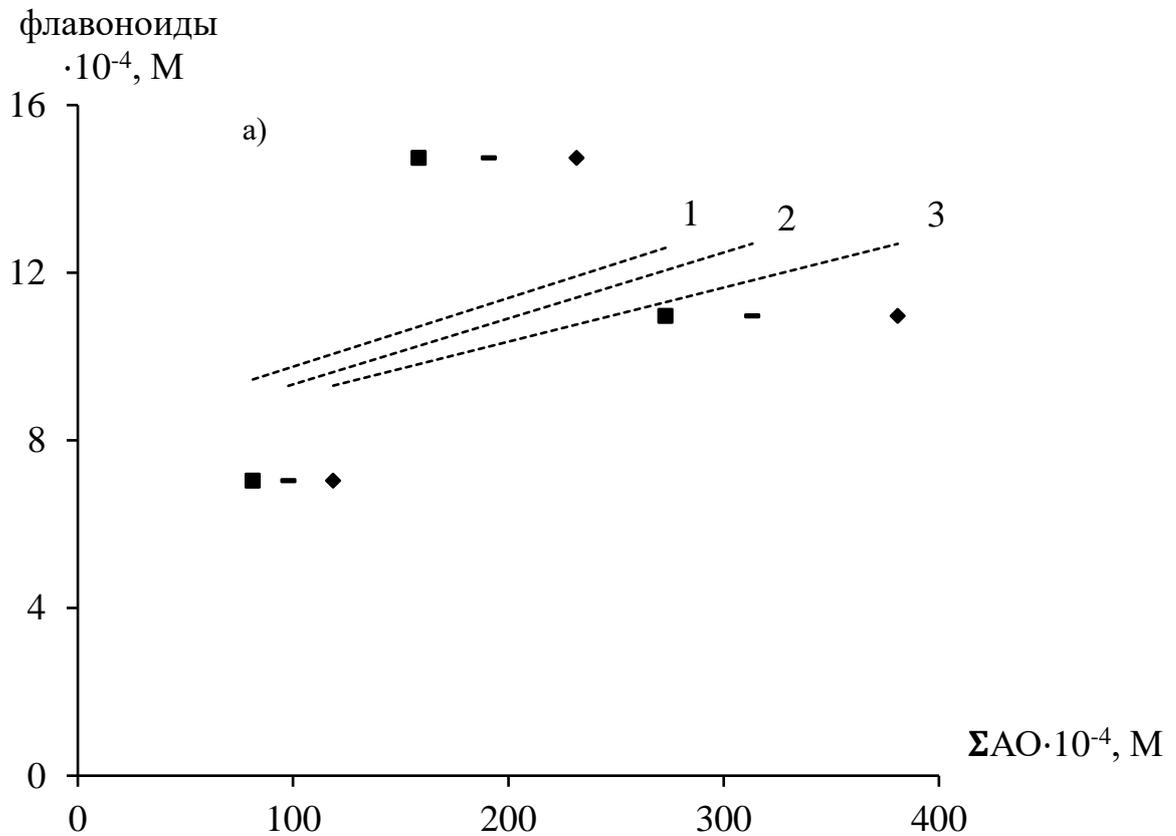


Рисунок 25 – Взаимосвязь между $\Sigma_{\text{АО}}$ и суммарным содержанием фенольных соединений в а) черном чае и б) зеленой чае, в качестве вещества стандарта: 1 – TP; 2 – АК; 3 – ГК



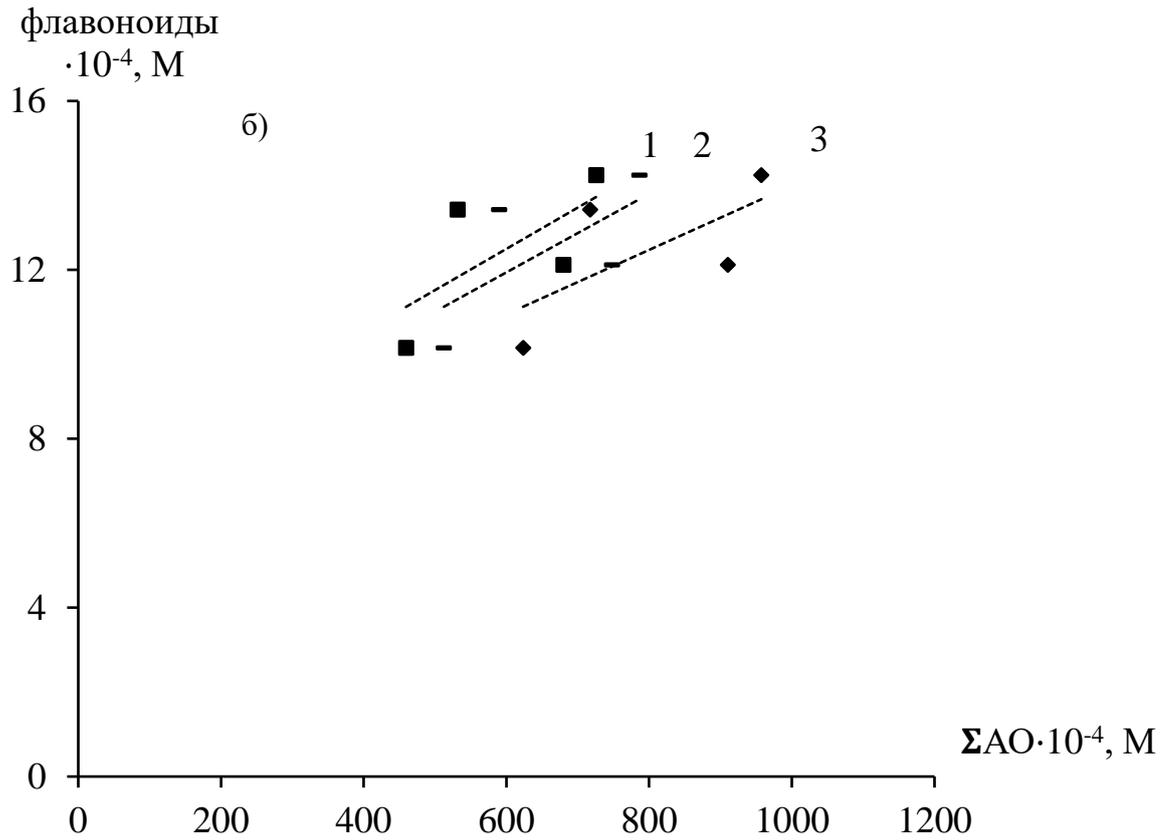
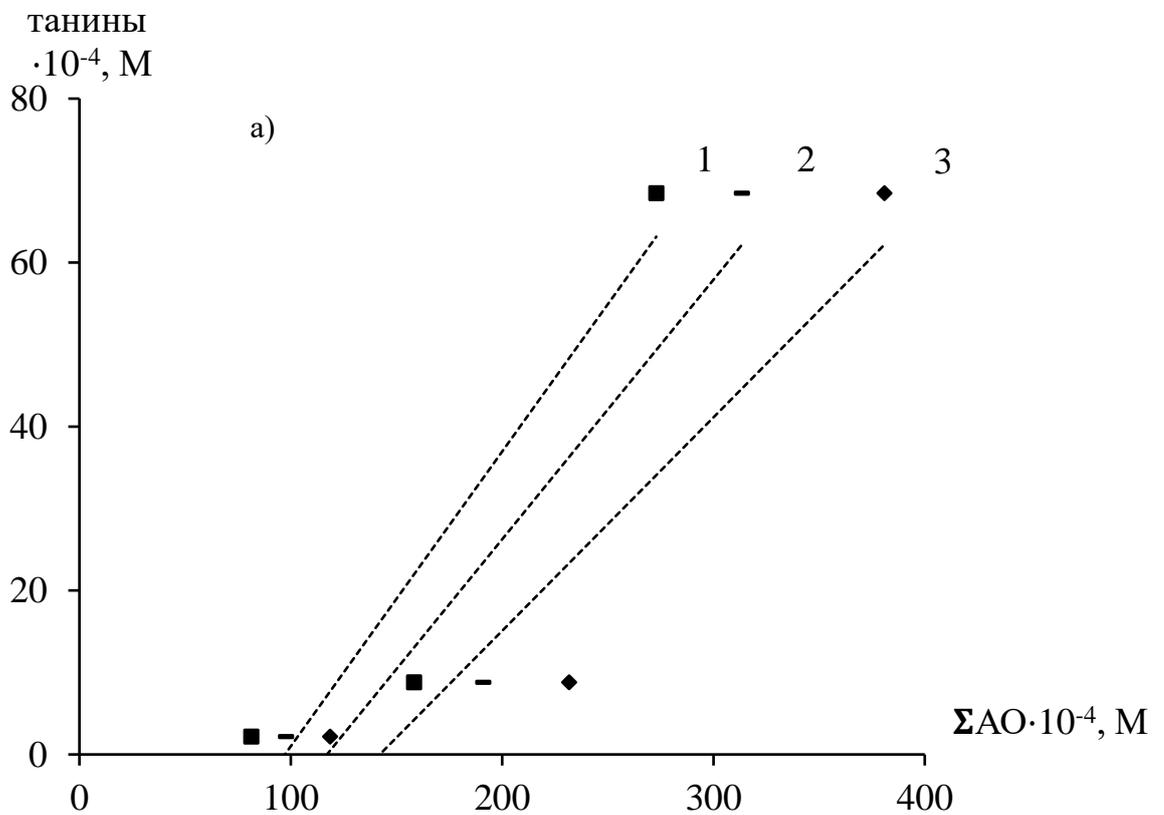


Рисунок 26 – Взаимосвязь между ΣАО и содержанием флавоноидов в а) черном чае и б) зеленой чае, в качестве вещества стандарта: 1 – ТР; 2 – АК; 3 – ГК



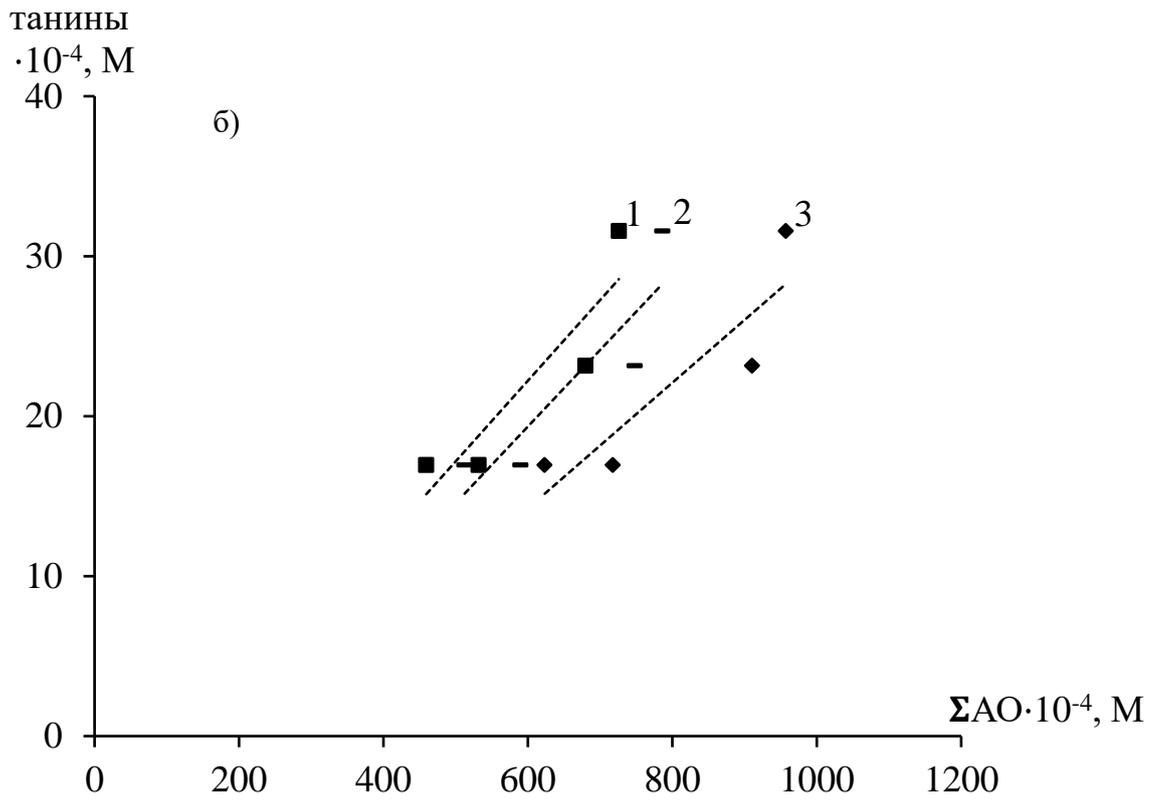
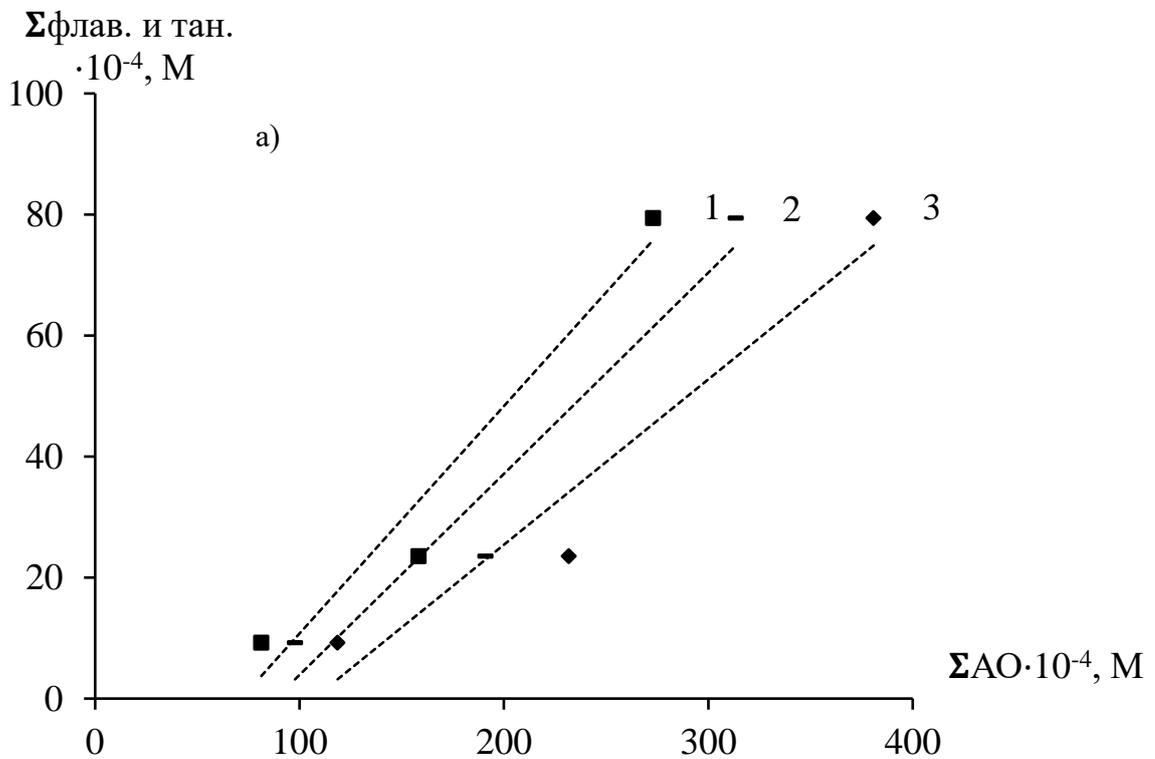


Рисунок 27 – Взаимосвязь между Σ АО и содержанием таннинов в а) черном чае и б) зеленой чае, в качестве вещества стандарта: 1 – ТР; 2 – АК; 3 – ГК



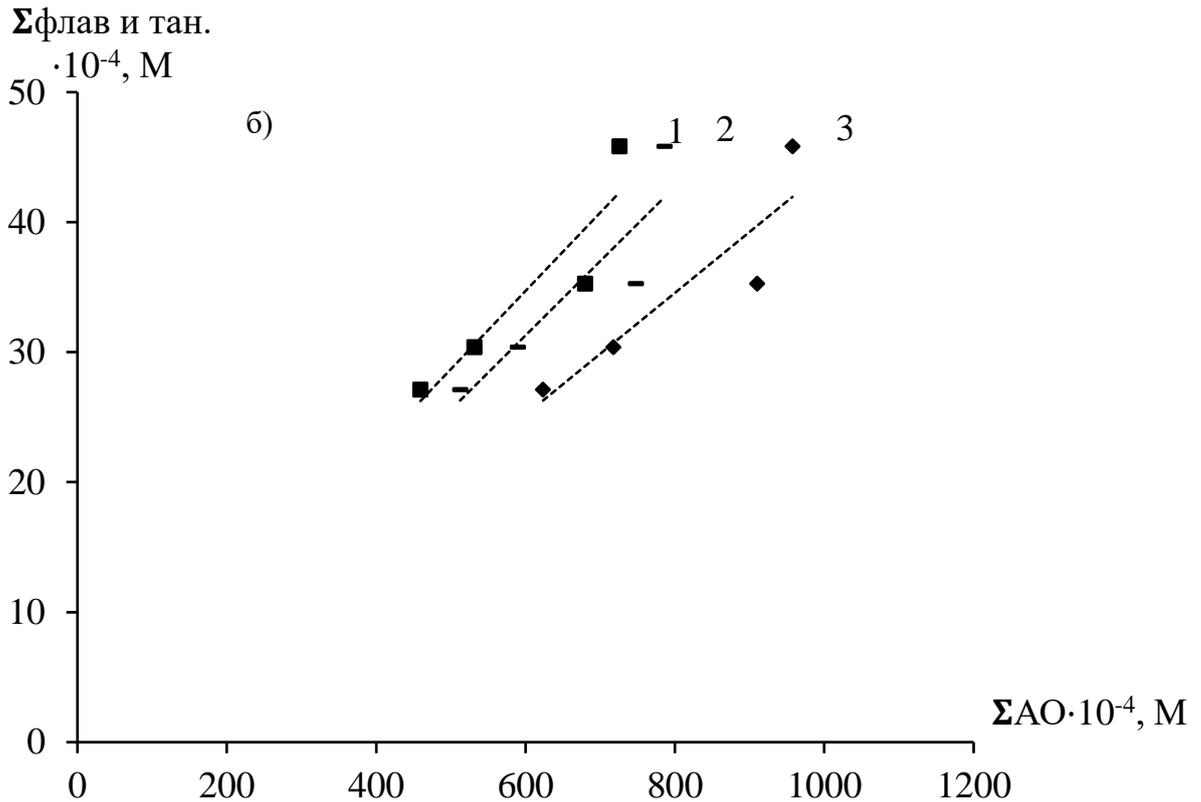


Рисунок 28 – Взаимосвязь между Σ АО и суммарным содержанием флавоноидов и танинов в а) черном чае и б) зеленой чае, в качестве вещества стандарта: 1 – ТР; 2 – АК; 3 – ГК

В таблице 15 представлены линейные коэффициенты корреляции между суммарным содержанием АО и суммарными показателями, определенными в черном и зеленом чае. Из рисунков и таблицы видно, что между изучаемыми характеристиками наблюдается взаимосвязь с (r) от 0,90 до 0,99, кроме содержания флавоноидов в черном чае, что, может быть, обусловлено процессом обработки чайных листьев. Черный чай подвергается процессу окисления, то есть ферментации, при котором флавоноиды чайного листа преобразуются в более сложные комбинации: теафлавины и теарубигины, придавая экстракту чая характерный окрас.

Таблица 15 – Коэффициенты корреляции полученных зависимостей суммарного содержания АО и суммарных показателей в зеленом и черном чае

Вещества-стандарты	Содержание фенольных соединений	Содержание танинов	Содержание флавоноидов	Σ флавоноидов и танинов
<i>Зеленый чай</i>				
АК	0,99	0,90	0,67	0,91
ГК	0,99	0,90	0,67	0,91
ТР	0,99	0,91	0,68	0,92
<i>Черный чай</i>				
АК	0,99	0,94	0,44	0,97
ГК	0,99	0,94	0,44	0,97
ТР	0,99	0,95	0,41	0,98

3.4.2 Определение основных характеристик погрешности измерения суммарного содержания антиоксидантов с использованием ПММ-Cu(II)-Nc

В таблицах 16, 17 и 18 приведены результаты определения суммарного содержания АО в лекарственных настойках, соковой продукции и чае соответственно в пересчете на разные вещества-стандарты (АК, ГК, ТР) методом варьирования навески (объема пробы) и значения $t_{\text{экс}}$ в сравнении с $t_{\text{табл}}$. Как видно из представленных результатов $t_{\text{экс}} < t_{\text{табл}}$, следовательно, смещение между результатами анализа пробы и пробы с измененной навеской (объемом) незначимо по t-критерию для всех образцов.

В таблицах 19, 20 и 21 приведены результаты оценки прецизионности в условиях повторяемости, правильности и точности предлагаемого способа определения Σ АО в исследуемых образцах. Из представленных результатов видно, что предлагаемый твердофазно-спектрофотометрический способ определения суммарного содержания антиоксидантов с ПММ-Cu(II)-Nc в реальных образцах характеризуются удовлетворительной повторяемостью, правильностью и точностью. Повторяемость (σ_r), правильность (σ_c) и точность (σ) определения с Cu(II)-Nc не превышают 20, 15 и 24 %, соответственно, вне зависимости от используемого вещества-стандарта

Таблица 16 – Результаты определения Σ АО лекарственных настоек в пересчете на разные $X_{ст}$ (АК, ГК, ТР) методом варьирования навески (объема пробы), экспериментальные ($t_{эксп}$) и табличные ($t_{табл}$) значения критерия Стьюдента, полученные при оценке метрологических характеристик ($n=3, f=2, P=0,95$)

Образец	Σ АО в пересчете на разные $X_{ст}$, 10^{-4} моль/л						$t_{эксп}$			
	АК		ГК		ТР		АК	ГК	ТР	$t_{табл}$
	*	**	*	**	*	**				
Экстракт родиолы	177±8	171±16	195±9	191±19	147±7	151±16	1,4	0,88	1,0	4,3
Экстракт левзея	80±22	81±18	90±23	91±21	71±19	74±17	0,18	0,19	0,54	
Настойка семян лимонника	26±12	30±6	29±14	34±6	22±9	28±4	1,5	1,5	1,8	
Экстракт элеутерококка	28±6	23±8	31±6	25±9	22±5	19±7	2,3	2,3	1,3	
Эхинацея	27±6	23±8	31±7	26±9	24±6	20±7	1,9	1,9	1,4	
Женьшень	3,38±0,14	2,93±0,16	3,81±0,15	3,29±0,15	2,96±0,12	2,32±0,15	1,2	1,3	1,9	

* – проба; ** – измененная проба.

Таблица 17 – Результаты определения Σ АО соковой продукции в пересчете на разные $X_{ст}$ (АК, ГК, ТР) методом варьирования навески (объема пробы), экспериментальные ($t_{эксп}$) и табличные ($t_{табл}$) значения критерия Стьюдента, полученные при оценке метрологических характеристик ($n=3$, $f=2$, $P=0,95$)

Образец	Σ АО в пересчете на разные $X_{ст}$, 10^{-4} моль/л						$t_{эксп}$			
	АК		ГК		ТР		АК	ГК	ТР	$t_{табл}$
	*	**	*	**	*	**				
Сок яблоко-вишня (1)	2,53±0,16	2,47±0,20	3,09±0,19	3,00±0,20	2,37±0,15	2,31±0,20	1,8	1,8	1,8	4,3
Сок яблоко-смородина	1,91±0,06	1,89±0,02	2,33±0,08	2,30±0,02	1,79±0,06	1,77±0,02	1,8	1,8	1,8	
Морс ягодный	3,82±0,13	3,75±0,10	4,65±0,16	4,57±0,10	3,58±0,13	3,52±0,10	1,8	1,8	1,8	
Сок вишня-яблоко (2)	1,93±0,10	1,96±0,10	2,36±0,12	2,38±0,10	1,81±0,10	1,83±0,10	1,1	1,1	1,1	

* – проба; ** – измененная проба.

Таблица 18 – Результаты определения $\Sigma\text{АО}$ в черном и зеленом чае в пересчете на разные $X_{\text{ст}}$ (АК, ГК, ТР) методом варьирования навески (объема пробы), экспериментальные ($t_{\text{эксп}}$) и табличные ($t_{\text{табл}}$) значения критерия Стьюдента, полученные при оценке метрологических характеристик ($n=3$, $f=2$, $P=0,95$)

Образец	$\Sigma\text{АО}$ в пересчете на разные $X_{\text{ст}}$, 10^{-4} моль на 100 г листьев						$t_{\text{эксп}}$			
	АК		ГК		ТР		АК	ГК	ТР	$t_{\text{табл}}$
	*	**	*	**	*	**				
<i>Зеленый чай</i>										
Зеленый (1)	510±30	527±24	620±40	641±29	459±29	483±23	1,6	1,6	2,8	4,3
Ганпаундер	590±32	602±25	720±40	730±30	530±30	551±23	1,3	1,4	2,1	
Молочный зеленый	750±40	752±24	910±50	916±29	680±40	694±22	0,41	0,45	1,4	
Зеленый (2)	790±50	806±20	960±70	981±25	730±50	735±19	1,5	1,5	0,68	
<i>Черный чай</i>										
Пуэр	190±40	180±28	230±50	220±30	160±40	159±28	1,1	1,1	0,10	4,3
Черный (1)	98±28	97±19	120±30	118±24	81±26	86±18	0,11	0,10	0,57	
Черный (2)	310±50	314±19	380±60	383±24	270±40	285±18	0,12	0,17	1,1	

* – проба; ** – измененная проба.

Таблица 19 – Основные метрологические характеристики твердофазно-спектрофотометрической методики определения Σ АО в лекарственных настойках (n=3, P=0,95)

Образец	Метрологические характеристики, %								
	АК			ГК			ТР		
	σ_r	σ_c	σ	σ_r	σ_c	σ	σ_r	σ_c	σ
Экстракт родиолы	2,3	1,7	2,9	2,3	1,7	2,9	2,4	1,8	3,0
Экстракт левзея	10	7,9	13	10	7,9	13	11	8,4	14
Настойка семян лимонника	18	11	22	18	11	22	20	13	24
Экстракт элеутерококка	7,9	8,0	11	8,0	8,1	11	9,5	9,6	14
Эхинацея	9,0	8,4	12	9,0	8,5	12	9,8	9,2	14
Женьшень	1,6	11	11	1,6	11	11	1,7	15	15

Таблица 20 – Основные метрологические характеристики твердофазно-спектрофотометрической методики определения Σ АО в соковой продукции (n=3, P=0,95)

Образец	Метрологические характеристики, %								
	АК			ГК			ТР		
	σ_r	σ_c	σ	σ_r	σ_c	σ	σ_r	σ_c	σ
Сок яблоко-вишня (1)	2,5	1,5	2,9	2,5	1,5	2,9	2,5	1,5	2,9
Сок яблоко-смородина	1,3	1,0	1,5	1,3	1,0	1,5	1,3	1,0	1,5
Морс ягодный	1,4	1,0	1,7	1,4	1,0	1,7	1,4	1,0	1,7
Сок яблоко-вишня (2)	2,1	1,2	2,4	2,1	1,2	2,4	2,1	1,2	2,4

Таблица 21 – Основные метрологические характеристики твердофазно-спектрофотометрической методики определения Σ АО в черном и зеленом чае (n=3, P=0,95)

Образец	Метрологические характеристики, %								
	АК			ГК			ТР		
	σ_r	σ_c	σ	σ_r	σ_c	σ	σ_r	σ_c	σ
<i>Зеленый чай</i>									
Зеленый (1)	2,4	1,8	3,0	2,4	1,8	3,0	2,5	1,9	3,1
Ганпаундер	2,2	1,6	2,7	2,2	1,6	2,7	2,3	1,7	2,9
Молочный зеленый	2,1	1,4	2,6	2,1	1,4	2,6	2,2	1,4	2,6
Зеленый (2)	2,8	1,7	3,2	2,8	1,7	3,2	2,8	1,7	3,3
<i>Черный чай</i>									
Пуэр	8,6	5,1	10	8,7	5,1	10	9,7	5,7	11
Черный (1)	12	8,1	14	12	8,2	14	13	9,2	16
Черный (2)	5,9	3,7	7,0	5,9	3,7	7,0	6,3	4,0	7,5

Глава 4 Применение алгоритма интервальной оценки суммарного содержания антиоксидантов методом CUPRAC с использованием ПММ-Cu(II)-Nc

4.1 Интервальные оценки суммарного содержания антиоксидантов для анализа соковой продукции

Реализацию алгоритма интервальной оценки осуществляли через формирование «веера» градуировочных зависимостей для определения АО, содержащихся в фруктовых и ягодных соках (ГК, АК, КВ, Л, ДКВ) [139], а также ТР как часто применяемого стандарта [93, 94].

Интервал суммарного содержания АО с применением алгоритма интервальной оценки методом CUPRAC с использованием системы Cu(II)-Nc-ПММ получали по формуле (45) [107]:

$$\frac{\Delta A_{450}}{K_{\max}} \leq \Sigma AO \leq \frac{\Delta A_{450}}{K_{\min}}, \quad (45)$$

где ΣAO – суммарное содержание антиоксидантов;

ΔA_{450} – обобщенный аналитический сигнал, представляющий собой разность оптических плотностей полиметакрилатных матриц с иммобилизованной Cu(II)-Nc после контакта с раствором, содержащим и не содержащим АО при длине волны 450 нм.

Для нивелирования коэффициентов чувствительности и оптимизации параметра внутригрупповой селективности ($T = \frac{K_{\max}}{K_{\min}}$) выбранной группы аналитов применяли один из наиболее распространенных подходов [107] – учет количества электронов, которые отдает молекула антиоксиданта при взаимодействии с окислителем, т.е. представление суммарного содержания АО в виде молярной концентрации эквивалента. Оценку сходимости повторных измерений оптической плотности одной и той же окрашенной ПММ проводили путем расчета относительного стандартного отклонения ($S_r, \%$) ($S_r = \frac{S \cdot 100}{\Delta \bar{A}_{450}}$, где S – среднее квадратическое отклонение разности поглощений ПММ с

иммобилизованной Cu(II)-Nc после контакта с раствором, содержащим и не содержащим АО при длине волны 450 нм (ΔA_{450}); $\overline{\Delta A}_{450}$ – усредненный аналитический сигнал). В таблице 22 приведены параметры градуировочных зависимостей для определения антиоксидантов, входящих в «веер», до и после учета количества электронов (\bar{e}) [140, 141], а также диапазон определяемых содержаний (ДОС) и предел обнаружения (ПО). Видно, что для всех градуировочных зависимостей АО наблюдается небольшая остаточная сумма отклонений ($S_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\Delta A_i - \widehat{\Delta A}_{450})^2}{m-2}}$, где ΔA_i , $\widehat{\Delta A}_{450}$ – значения аналитического сигнала, полученные экспериментально и теоретически соответственно; $m-2$ – число степеней свободы, m – общее число данных, использованных при построении градуировочных кривых), рассчитанная с использованием пакета регрессионного анализа [142], а S_r не превышает 10 %. «Веер» градуировочных зависимостей для определения суммарного содержания АО с использованием системы Cu(II)-Nc, иммобилизованной в ПММ после нивелирования коэффициентов чувствительности данных аналитов, представлен на рисунке 29. Представление суммарного содержания АО в виде молярной концентрации эквивалента приводит к снижению внутригрупповой селективности – уменьшению параметра T с 4,2 до 2,6 и, как следствие, к более точному определению суммарного содержания искомым аналитов. Результаты нивелирования коэффициентов чувствительности и оптимизации параметра T в твердой фазе аналогичны результатам, полученным в растворе [60].

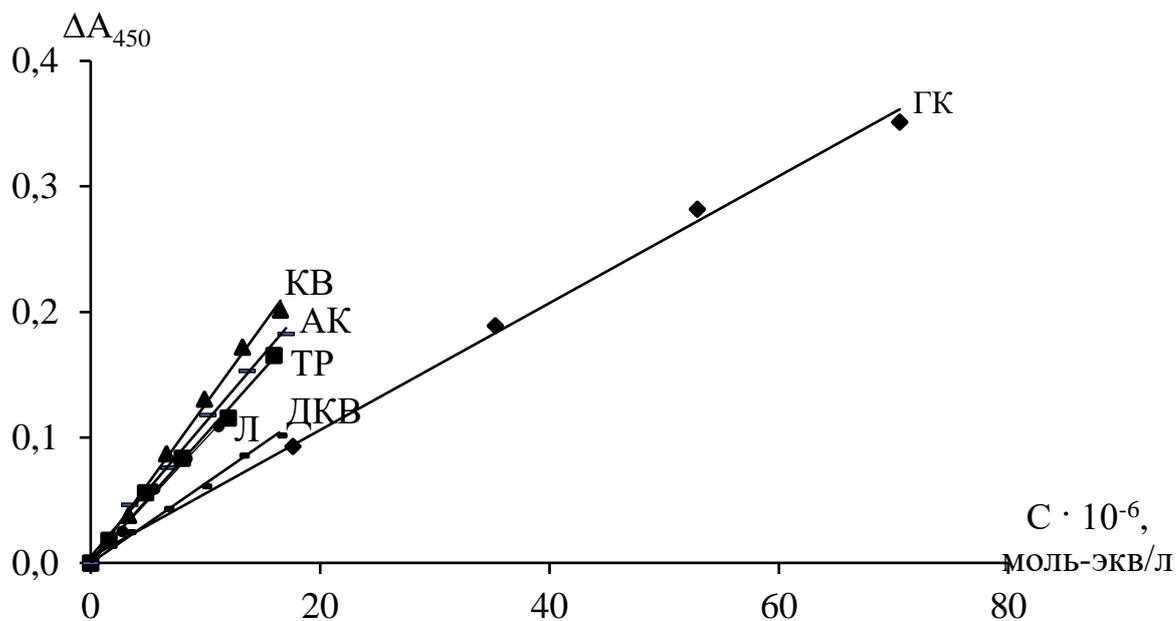


Рисунок 29 – Градуировочные зависимости для определения суммарного содержания АО с использованием индикаторной системы Cu(II)-Nc, иммобилизованной в ПММ

Результаты определения $\Sigma\text{АО}$ в пересчете на вещество-стандарт и методом ИО в смесях АО различного состава представлены в таблице 23. Видно, что при использовании алгоритма интервальных оценок интервал суммарного содержания антиоксидантов практически не зависит от выбора вещества-стандарта, в отличие от традиционного способа выражения $\Sigma\text{АО}$ в виде $X_{\text{ст}}$. При переходе к разным веществам-стандартам интервал действительного суммарного содержания АО, как и его ширина практически не изменяются и находятся в пределах случайных погрешностей. В то же время определение $\Sigma C_{\text{АО}}^{\text{Xст}}$ в пересчете на разные $X_{\text{ст}}$ приводит к статистическим значимым погрешностям (δC) от -74 до +47 %, что ведет к заниженным или завышенным результатам определения $\Sigma\text{АО}$. δC рассчитывали по формуле:

$$\delta C = \frac{|(\Sigma C_{\text{АО}}^{\text{Xст}} - \Sigma C_{\text{смеси}})|}{\Sigma C_{\text{смеси}}} \cdot 100, \quad (46)$$

где $\Sigma C_{\text{смеси}}$ – суммарное содержание АО в модельной смеси;

$\Sigma C_{\text{АО}}^{\text{Xст}}$ – суммарное содержания АО в пересчете на разные вещества-стандарты.

Заключения, полученные при использовании алгоритма ИО для определения суммарного содержания АО в модельных смесях методом CUPRAC (ПММ-Cu(II)-Nc), аналогичны результатам применения алгоритма ИО без

иммобилизации индикаторных систем в твердой фазе [107], что показывает универсальность применения алгоритма интервальных оценок.

Результаты оценки $\Sigma\text{АО}$ в соковой продукции с использованием алгоритма интервальной оценки и в пересчете на $X_{\text{ст}}$ приведены в таблице 24. Выбор оптимальных стандартных веществ для выражения $\Sigma\text{АО}$ в виде $X_{\text{ст}}$ был сделан на основании работы [109]. Коэффициенты чувствительности градуировочных зависимостей для веществ-стандартов должны быть близки к оптимальному коэффициенту чувствительности ($K_{\text{опт}}$), рассчитанному по формуле: $K_{\text{опт}} = \frac{K_{\text{max}} + K_{\text{min}}}{2} = \frac{1,3 \cdot 10^4 + 0,5 \cdot 10^4}{2} = 0,9 \cdot 10^4$. Значение $K_{\text{опт}}$ отражает среднюю чувствительность «веера» градуировочных зависимостей выбранной группы аналитов (табл. 22). Согласно таблице 22, коэффициенты чувствительности АК ($1,1 \cdot 10^4$), ТР ($1,05 \cdot 10^4$) и Л ($1,0 \cdot 10^4$) наиболее приближены к расчетному оптимальному коэффициенту чувствительности «веера» градуировок антиоксидантов ($0,9 \cdot 10^4$), что позволяет использовать данные стандартные вещества для определения $\Sigma\text{АО}$ в соках. Исходя из таблицы 24, можно сделать вывод о том, что результаты определения суммарного содержания АО в соковой продукции в пересчете на АК, ТР и Л различны ввиду неодинаковой чувствительности определения данных аналитов, в отличие от интервала действительного $\Sigma\text{АО}$, рассчитанного с применением алгоритма ИО. Результаты суммарного содержания антиоксидантов в пересчете на вещество-стандарт лютеолин наиболее приближены к середине диапазона интервала алгоритма ИО, что позволяет использовать метод ИО для выбора оптимального вещества-стандарта. В то же время ширина интервалов, полученных с применением алгоритма ИО, на порядок превышает ширину доверительных интервалов в виде случайной составляющей погрешности, что указывает на необходимость использования других подходов для нивелирования коэффициентов чувствительности определения АО, например, оптимизации условий реакции или переход к другому способу измерения аналитического сигнала [107].

Таблица 22 – Параметры градуировочных зависимостей для определения антиоксидантов до и после учета количества электронов, принимающих участие в окислительно-восстановительной реакции (в расчете на 1 молекулу АО)

Антиоксидант	Уравнения градуировочной зависимости	R^2	S_y	ДОС, 10^{-6}	ПО, 10^{-6}	$S_r^{*}, \%$	T	Кол-во \bar{e} [140, 141]
<i>без учета количества \bar{e} (единицы измерения – моль/л)</i>								
Кверцетин	$\Delta A_{450} = 6,3 \cdot 10^4 C_{КВ}$	0,996	0,014	0,7 – 3,3	0,2	4	4,2	-
Лютеолин	$\Delta A_{450} = 4,0 \cdot 10^4 C_{Л}$	0,997	0,004	0,7 – 2,8	0,3	8		
Дигидрокверцетин	$\Delta A_{450} = 3,2 \cdot 10^4 C_{ДКВ}$	0,996	0,017	0,7 – 3,3	0,3	8		
Аскорбиновая кислота	$\Delta A_{450} = 2,2 \cdot 10^4 C_{АК}$	0,997	0,004	1,7 – 8,5	0,9	8		
Тролокс	$\Delta A_{450} = 2,1 \cdot 10^4 C_{ТР}$	0,998	0,006	0,8 – 8,0	0,2	10		
Галловая кислота	$\Delta A_{450} = 1,5 \cdot 10^4 C_{ГК}$	0,996	0,009	5,9 – 23,5	1,3	10		
<i>с учетом количества \bar{e} (единицы измерения – моль-экв/л)</i>								
Кверцетин	$\Delta A_{450} = 1,3 \cdot 10^4 C_{КВ}$	0,996	0,014	3,3 – 16,5	0,8	4	2,6	5
Лютеолин	$\Delta A_{450} = 1,0 \cdot 10^4 C_{Л}$	0,997	0,004	2,8 – 11,2	1,2	8		4
Дигидрокверцетин	$\Delta A_{450} = 0,6 \cdot 10^4 C_{ДКВ}$	0,996	0,017	3,2 – 16,4	1,5	8		5
Аскорбиновая кислота	$\Delta A_{450} = 1,1 \cdot 10^4 C_{АК}$	0,997	0,004	3,4 – 17,0	1,8	8		2
Тролокс	$\Delta A_{450} = 1,05 \cdot 10^4 C_{ТР}$	0,998	0,061	1,6 – 16,0	0,4	10		2
Галловая кислота	$\Delta A_{450} = 0,5 \cdot 10^4 C_{ГК}$	0,996	0,009	17,6 – 70,5	3,8	10		3

*" – расчет относительного среднего квадратического отклонения аналитического сигнала ΔA_{450} проводили для АО с концентрациями,

$C_{АО} \cdot 10^{-6}$ моль-экв/л: $C_{КВ} = 9,9$; $C_{Л} = 8,3$; $C_{ДКВ} = 9,9$; $C_{АК} = 10,0$; $C_{ТР} = 8,0$; $C_{ГК} = 35,0$.

Таблица 23 – Результаты оценки суммарного содержания антиоксидантов в модельных смесях с использованием алгоритма интервальных оценок и в пересчете на вещество-стандарт

№	Состав смеси, 10^{-6} моль-экв/л	Суммарное содержание АО, 10^{-6} моль-экв/л							
		в пересчете на $X_{ст}$							
1	КВ – 1,3 ТР – 0,96 ГК – 3,5 АК – 1,1 $\Sigma C_{смеси}$ – 6,86	$X_{ст}$	ГК	ДКВ	Л	ТР	АК	КВ	
		$\Sigma C_{АО}^{X_{ст}}$	11,4	7,9	7,2	6,1	6,4	4,9	
		$\delta C, \%$	-66	-15	-5	+11	+7	+29	
		алгоритм ИО							
		Интервал $\Sigma C_{АО}^{*1}$	5,2 – 12,6	5,2 – 12,6	4,7 – 12,1	4,9 – 12,6	4,6 – 12,0	4,8 – 11,9	
		Ширина интервала возможных значений $\Sigma C_{АО}$	7,4	7,4	7,4	7,7	7,4	7,1	
2	ТР – 0,64 ГК – 2,1 АК – 2,3 $\Sigma C_{смеси}$ – 5,04	в пересчете на $X_{ст}$							
		$\Sigma C_{АО}^{X_{ст}}$	8,0	6,4	5,4	4,2	4,0	4,1	
		$\delta C, \%$	-59	-27	-7	+17	+21	+19	
		алгоритм ИО							
		Интервал $\Sigma C_{АО}^{*1}$	3,5 – 8,7	3,4 – 8,7	3,1 – 8,1	3,4 – 8,4	3,1 – 8,1	3,1 – 8,0	
		Ширина интервала возможных значений $\Sigma C_{АО}$	5,2	5,3	5,0	5,0	5,0	4,9	
3	КВ – 1,7 ГК – 1,8 АК – 1,1 $\Sigma C_{смеси}$ – 4,6	в пересчете на $X_{ст}$							
		$\Sigma C_{АО}^{X_{ст}}$	8,0	6,1	5,4	4,3	4,04	4,1	
		$\delta C, \%$	-74	-33	-17	+7	+12	+11	
		алгоритм ИО							
		Интервал $\Sigma C_{АО}^{*1}$	3,5 – 8,7	3,5 – 8,7	3,2 – 8,2	3,4 – 8,4	3,1 – 8,1	3,1 – 8,1	
		Ширина интервала возможных значений $\Sigma C_{АО}$	5,2	5,2	5,0	5,0	5,0	5,0	
4	ТР – 1,6 ГК – 3,5 АК – 2,3 $\Sigma C_{смеси}$ – 7,4	в пересчете на $X_{ст}$							
		$\Sigma C_{АО}^{X_{ст}}$	10,2	7,8	8,2	5,4	5,3	3,9	
		$\delta C, \%$	-38	-5	-11	+27	+28	+47	
		алгоритм ИО							
		Интервал $\Sigma C_{АО}^{*1}$	4,6 – 11,0	4,4 – 11,0	4,1 – 10,6	4,4 – 11,0	4,1 – 10,5	4,0 – 10,4	
		Ширина интервала возможных значений $\Sigma C_{АО}$	6,4	6,6	6,5	6,6	6,4	6,4	

*1 – диапазон рассчитан с использованием формулы (45).

Таблица 24 – Результаты определения суммарного содержания антиоксидантов в образцах соковой продукции с использованием алгоритма интервальных оценок и в пересчете на вещество-стандарт (n = 6, P = 0,95)

Объект исследования	Оценка $\Sigma\text{АО}^*$, 10^{-3} моль-экв/л		Определение $\Sigma\text{C}_{\text{АО}}^{\text{Хст}}$, 10^{-3} моль-экв/л		
	форма записи в виде интервала	ширина интервала	АК	ТР	Л
<i>Прямого отжима</i>					
Морс облепиховый	5,8 – 14,6	8,8	$6,51 \pm 0,19$	$6,95 \pm 0,21$	$7,38 \pm 0,22$
Морс чернично-голубичный	4,7 – 12,0	7,3	$5,4 \pm 0,3$	$5,7 \pm 0,3$	$6,1 \pm 0,3$
Сок гранатовый	4,1 – 10,4	6,3	$4,63 \pm 0,11$	$4,95 \pm 0,12$	$5,25 \pm 0,13$
Морс брусничный	2,4 – 6,1	3,7	$2,71 \pm 0,25$	$2,90 \pm 0,26$	$3,08 \pm 0,28$
Морс клюквенный	2,1 – 5,3	3,2	$2,37 \pm 0,17$	$2,53 \pm 0,18$	$2,68 \pm 0,19$
<i>Восстановленные</i>					
Сок ягодный	1,4 – 3,4	2,0	$1,53 \pm 0,05$	$1,63 \pm 0,04$	$1,73 \pm 0,05$
Сок черничный	1,2 – 2,9	1,7	$1,31 \pm 0,04$	$1,40 \pm 0,04$	$1,49 \pm 0,04$
Нектар ежевичный	0,8 – 2,0	1,2	$0,881 \pm 0,020$	$0,938 \pm 0,022$	$0,999 \pm 0,023$
Ягодно-хвойный коктейль	0,7 – 1,9	1,2	$0,842 \pm 0,022$	$0,900 \pm 0,023$	$0,954 \pm 0,024$
Сок гранатовый	0,12 – 0,30	0,18	$0,136 \pm 0,004$	$0,145 \pm 0,004$	$0,154 \pm 0,005$

*' – диапазон рассчитан с использованием формулы (45).

Косвенную оценку правильности предлагаемой методики определения суммарного содержания АО методом CUPRAC с использованием алгоритма интервальной оценки проводили путем сопоставления середины интервала, полученного с применением алгоритма интервальной оценки при определении суммарного содержания АО в соковой продукции с содержанием фенольных соединений с помощью корреляционного анализа. Из таблицы 25 и рисунка 30 видно, что между сопоставляемыми величинами наблюдается взаимосвязь с коэффициентами корреляции $r = 0,73$ и $r = 0,99$ для соков прямого отжима и восстановленных соответственно.

Таблица 25 – Результаты определения суммарных показателей в соковой продукции ($n=3$, $P=0,95$)

Объект исследования	Фенольные соединения в пересчете на ГК, 10^{-3} моль-экв/л	Оценка ΣAO^* , 10^{-3} моль-экв/л
		середина интервала
<i>Прямого отжима</i>		
Морс облепиховый	31,1±0,5	10
Морс чернично-голубичный	35,4±1,4	8,4
Сок гранатовый	15,7±0,6	7,3
Морс брусничный	18,1±0,9	4,3
Морс клюквенный	17,7±1,7	3,7
<i>Восстановленные</i>		
Сок ягодный	13,2±0,4	2,4
Сок черничный	12,2±1,0	2,1
Нектар ежевичный	7,6±0,6	1,4
Ягодно-хвойный коктейль	7,5±0,8	1,3
Сок гранатовый	3,05±0,25	0,21

*' – диапазон рассчитан с использованием формулы (45).

Проверку правильности определения суммарного содержания АО в реальных образцах сока проводили методом варьирования навески (объема пробы) с применением алгоритма интервальной оценки и в пересчете на стандартное вещество лютеолин. Для этого рассчитывали критерий Стьюдента

($t_{\text{эксп}}$) и среднее квадратическое отклонение для каждого из подходов, используя среднее значение диапазона алгоритма ИО и среднее значение, выраженное на $X_{\text{ст}}$ каждого из образцов. Также осуществляли сопоставление $t_{\text{эксп}}$ и $t_{\text{табл}}$ для каждого из подходов и расчет доверительного интервала в виде случайной составляющей погрешности для суммарного содержания АО в пересчете на лютеолин [143]. Из таблицы 26 видно, что для всех образцов соковой продукции $t_{\text{эксп}} < t_{\text{табл}}$, следовательно, смещение незначимо на фоне случайного разброса, что подтверждает правильность оценки $\Sigma\text{АО}$ в соках с применением алгоритма ИО и в пересчете на вещество-стандарт. Суммарное содержание АО в образцах сока прямого отжима выше, чем в восстановленных, вероятно, это связано с деструкцией антиоксидантов в процессе получения сокового концентрата, который необходим для приготовления восстановленной соковой продукции. Результаты и выводы, полученные при анализе образцов сока прямого отжима и восстановленных, согласуются с результатами определения $\Sigma\text{АО}$ в соковой продукции другими авторами [68, 144].

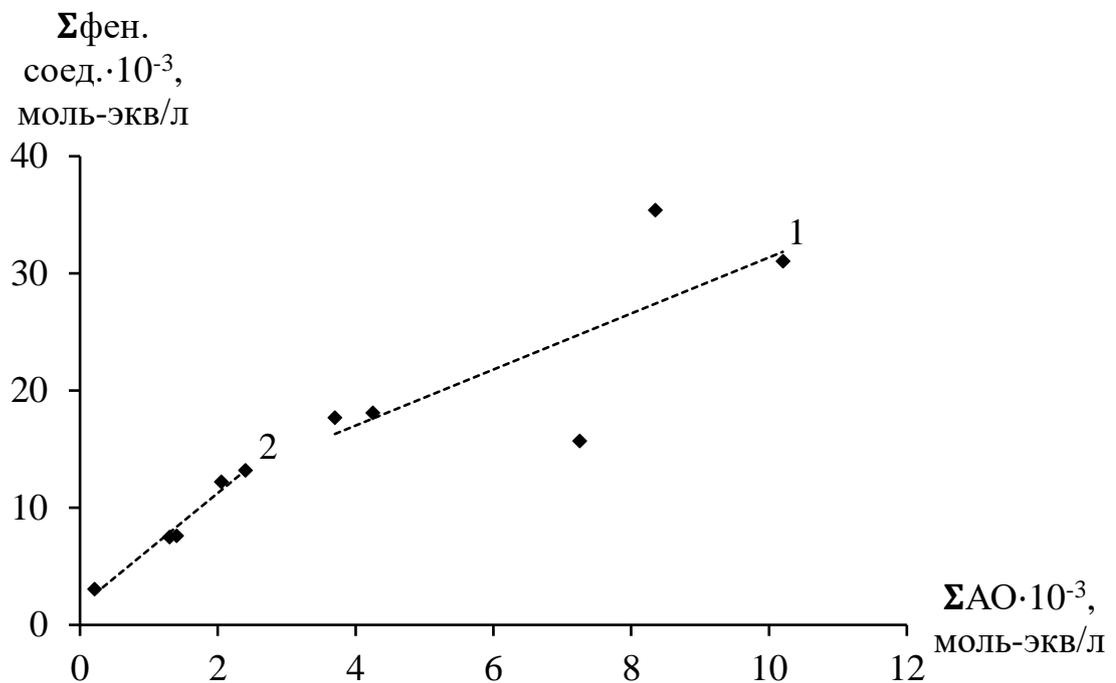


Рисунок 30 – Взаимосвязь между серединой интервала, полученной при определении $\Sigma\text{АО}$ с использованием алгоритма ИО и суммарным содержанием фенольных соединений в соках прямого отжима (1) и восстановленных (2)

Таблица 26 – Результаты оценки суммарного содержания антиоксидантов в образцах соковой продукции с использованием алгоритма интервальных оценок и в пересчете на вещество-стандарт (Л) методом варьирования навески ($n = 3$, $P = 0,95$, $t_{\text{табл}} = 4,3$)

Объект исследования	Оценка $\Sigma\text{АО}^{*}$, 10^{-3} моль-экв/л				Определение $\Sigma\text{C}_{\text{АО}}^{\text{хст}}$, 10^{-3} моль-экв/л				$t_{\text{эксп}}^{***}$
	форма записи в виде интервала				лютеолин				
	*	S	**	S	*	S	**	S	
<i>Прямого отжима</i>									
Морс облепиховый	5,6 – 14,2	0,19	5,9 – 14,9	0,19	$7,2 \pm 0,3$	0,14	$7,6 \pm 0,3$	0,13	3,2
Морс чернично-голубичный	4,5 – 11,4	0,18	5,0 – 12,5	0,4	$5,8 \pm 0,3$	0,13	$6,3 \pm 0,6$	0,25	3,3
Сок гранатовый	4,1 – 10,3	0,12	4,1 – 10,4	0,09	$5,23 \pm 0,22$	0,09	$5,26 \pm 0,18$	0,07	0,5
Морс брусничный	2,4 – 6,0	0,3	2,5 – 6,2	0,14	$3,0 \pm 0,6$	0,22	$3,1 \pm 0,3$	0,10	0,7
Морс клюквенный	2,1 – 5,3	0,23	2,1 – 5,3	0,27	$2,69 \pm 0,05$	0,020	$2,7 \pm 0,4$	0,17	0,1
<i>Восстановленные</i>									
Сок ягодный	1,3 – 3,4	0,04	1,4 – 3,5	0,05	$1,80 \pm 0,10$	0,04	$1,70 \pm 0,10$	0,03	2,2
Сок черничный	1,1 – 2,9	0,05	1,2 – 3,0	0,03	$1,46 \pm 0,05$	0,018	$1,51 \pm 0,08$	0,03	2,3
Нектар ежевичный	0,8 – 2,0	0,018	0,8 – 2,0	0,022	$1,0 \pm 0,3$	0,013	$1,0 \pm 0,4$	0,016	0,2
Ягодно-хвойный коктейль	0,8 – 1,9	0,03	0,7 – 1,9	0,013	$0,964 \pm 0,024$	0,010	$0,94 \pm 0,05$	0,019	1,5
Сок гранатовый	0,12 – 0,30	0,004	0,12 – 0,30	0,004	$0,154 \pm 0,007$	0,0029	$0,154 \pm 0,007$	0,0029	0,0

* – проба; ** – измененная проба;

*' – диапазон рассчитан с использованием формулы (45);

***' – экспериментальное значение критерия Стьюдента, полученное для алгоритма интервальных оценок и в пересчете на вещество-стандарт.

4.2 Исследование возможности нивелирования коэффициентов чувствительности определения антиоксидантов

Для сужения веера градуировочных зависимостей в алгоритме интервальных оценок, рассмотрели способы нивелирования коэффициентов чувствительности определения АО, которые предложены в монографии В. И. Вершинина [107], заключающиеся в оптимизации условий реакции или переходу к другому способу измерения аналитического сигнала.

4.2.1 Влияние времени контакта ПММ-Cu(II)-Nc с раствором АО

В качестве оптимизации условий реакции исследовали влияние времени контакта ПММ-Cu(II)-Nc с раствором АО, полученные зависимости представлены на рисунке 31. Для большинства АО на начальных этапах взаимодействия с ПММ-Cu(II)-Nc наблюдается быстрое изменение аналитического сигнала от времени контакта, которое замедляется по мере приближения к равновесию. Это может указывать на быстрый перенос молекул АО из раствора к индикаторной системе, иммобилизованной в ПММ, и быстро химическое взаимодействие между АО и ПММ-Cu(II)-Nc. Однако для АК необходимо большее время контакта с изучаемой системой для изменения аналитического сигнала, что может быть обусловлено процессом взаимодействия АО с изучаемой индикаторной системой, иммобилизованной в ПММ.

На рисунке 32 показаны градуировочные зависимости для определения суммарного содержания АО с использованием ПММ-Cu(II)-Nc при времени контакта 40 минут, с параметрами, представленными в таблице 27. Из рисунка 32 и таблицы 27 видно, что увеличение времени контакта аналитов фенольной природы с изучаемой системой до 40 минут приводит к снижению внутригрупповой селективности, т.е. уменьшению параметра T с 2,6 до 1,8 (при исключении из веера аскорбиновой кислоты) и, как следствие, к более точному определению суммарного содержания искомым аналитов.

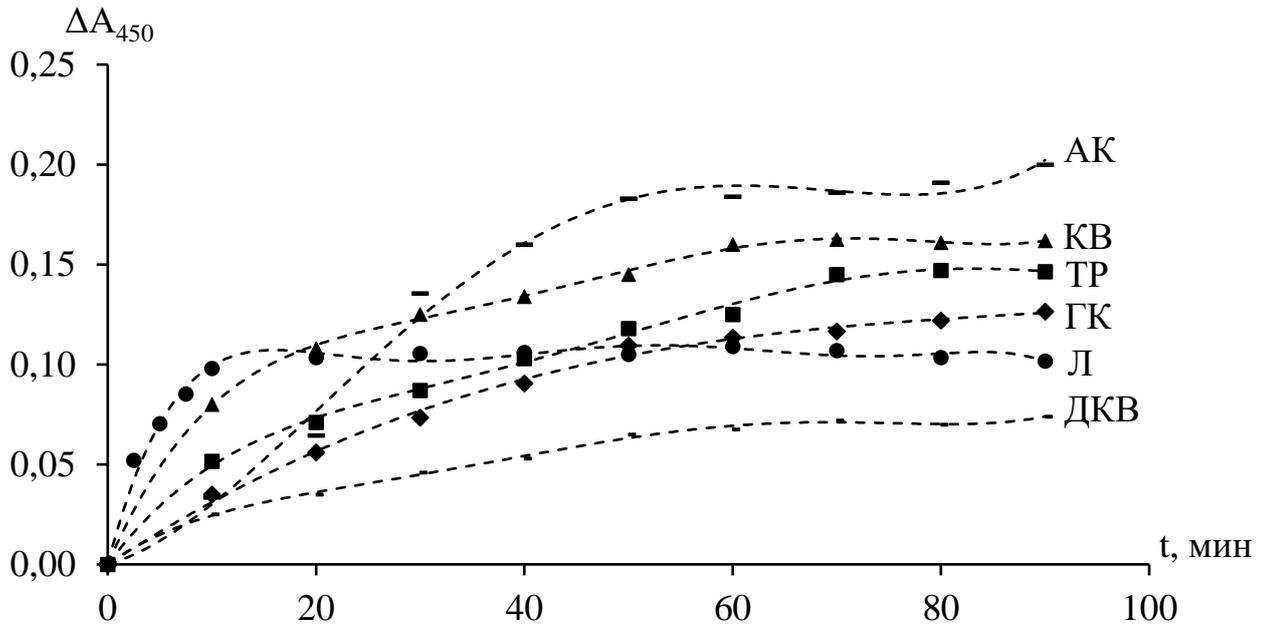


Рисунок 31 – Изменение аналитического сигнала от времени контакта антиоксидантов с индикаторной системой, иммобилизованной в ПММ ($C_{\Sigma AO}$ от $6,5 \cdot 10^{-6}$ до $6,8 \cdot 10^{-6}$ моль-экв/л)

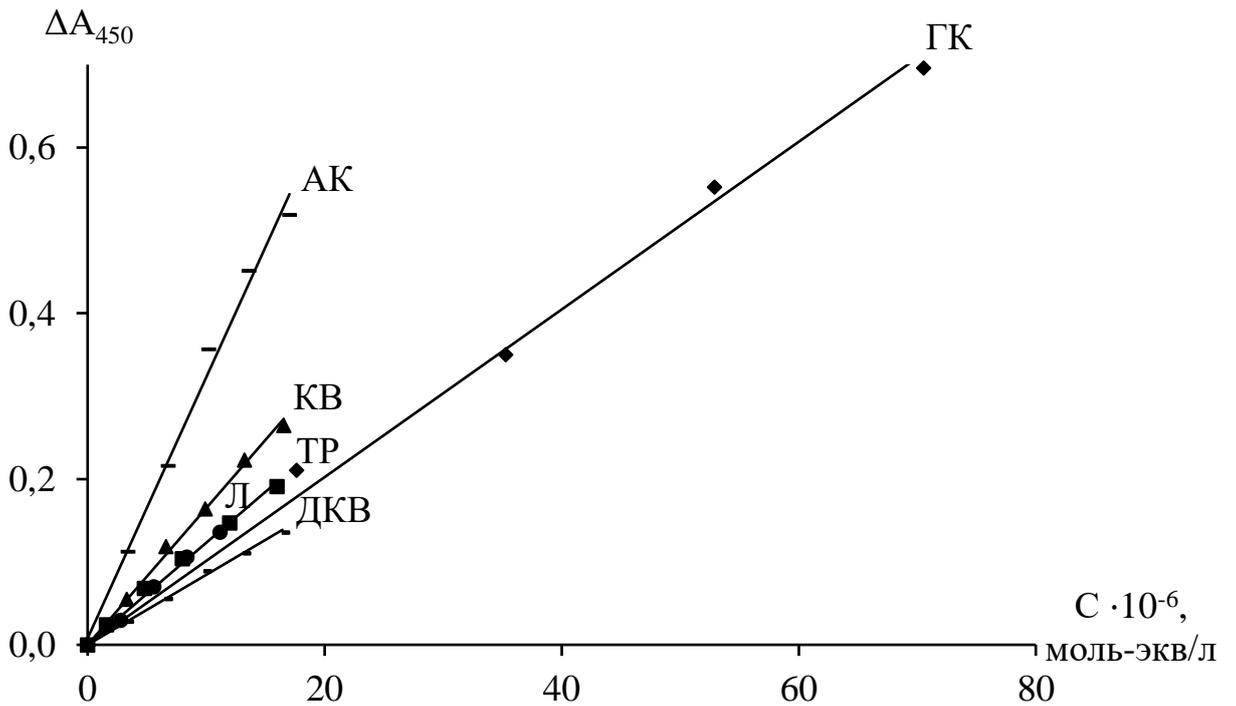


Рисунок 32 – Градуировочные зависимости для определения ΣAO с использованием индикаторной системы ПММ-Cu(II)-Nc при времени контакта 40 минут

Таблица 27 – Параметры градуировочных зависимостей для определения антиоксидантов при времени контакта АО с индикаторной системой 40 минут

Антиоксидант	Уравнения градуировочной зависимости	R ²	T
Кверцетин	$\Delta A_{450} = 1,6 \cdot 10^4 C_{КВ}$	0,996	3,6 (1,8*)
Лютеолин	$\Delta A_{450} = 1,2 \cdot 10^4 C_{Л}$	0,997	
Дигидрокверцетин	$\Delta A_{450} = 0,9 \cdot 10^4 C_{ДКВ}$	0,998	
Аскорбиновая кислота	$\Delta A_{450} = 3,2 \cdot 10^4 C_{АК}$	0,991	
Тролокс	$\Delta A_{450} = 1,2 \cdot 10^4 C_{ТР}$	0,994	
Галловая кислота	$\Delta A_{450} = 1,0 \cdot 10^4 C_{ГК}$	0,994	

* – численное значение параметра внутригрупповой селективности веера градуировочных зависимостей без учета АК

4.2.2 Влияние отношения объема анализируемого раствора к массе твердой фазы

Также на чувствительность определения веществ методом твердофазной спектрофотометрии существенное влияние оказывает масса твердой фазы и объем раствора образца, взятого на анализ. Фактическое поглощение ПММ-Cu(I)-Nc ($A_{\overline{Cu(I)-Nc}}$) после ее контакта с раствором АО определяется [145, 146] как:

$$A_{\overline{Cu(I)-Nc}} = \varepsilon_{Cu(I)-Nc} \cdot l_s \cdot C_{\overline{Cu(I)-Nc}}, \quad (46)$$

где $\varepsilon_{Cu(I)-Nc}$ – кажущийся молярный коэффициент поглощения комплекса меди (I) с неocupроином в полиметакрилатной матрице, кг/(моль·см³);

l_s – толщина поглощающего слоя (толщина полиметакрилатной матрицы), см;
 $C_{\overline{Cu(I)-Nc}}$ – концентрация комплекса меди (I) с неocupроином в полиметакрилатной матрице, моль/кг.

Концентрация комплекса меди(I) с неocupроином в полиметакрилатной матрице пропорционально связана с концентрацией АО в растворе и ее можно выразить формулой (47):

$$C_{\overline{Cu(I)-Nc}} = \frac{C_0 \cdot V \cdot 1000}{(m + V/D)}, \quad (47)$$

где C_0 – концентрация АО в растворе, моль/дм³;

V – объем раствора АО, дм³;

m – масса полиметакрилатной матрицы, г;

D – коэффициент распределения АО, дм³/кг.

$A_{Cu(I)-Nc}$ можно выразить формулой исходя из предположения, что $V \ll D$:

$$A_{Cu(I)-Nc} = \frac{\varepsilon_I \cdot l_S \cdot C_0 \cdot V \cdot 1000}{m}, \quad (48)$$

В связи с тем, что чувствительность твердофазного метода увеличивается с увеличением соотношения V/m , были проведены исследования по влиянию на чувствительность определения АО уменьшения образца твердой фазы с (6×8) мм на (4×4) мм. На рисунках 33 и 34 показаны градуировочные зависимости для определения Σ АО с использованием системы ПММ-Cu(II)-Nc размером (4×4) мм при времени контакта 20 и 40 минут соответственно, уравнения градуировочных зависимостей с учетом количества электронов, которые отдает молекула АО при взаимодействии с окислителем, представлены в таблице 28.

В таблице 29 приведены чувствительность определения АО (коэффициент b в уравнении градуировочной зависимости) и рассчитанные отношения чувствительностей в зависимости от размера ПММ-Cu(I)-Nc. Из данных, представленных в таблице 28-29 и рисунках 33-34 видно, что наблюдается повышение чувствительности определения АО от 1,6 до 4,0 и от 1,2 до 5,2 раз при времени контакта 20 и 40 мин, соответственно. Наименьшее повышение коэффициента чувствительности наблюдается для ГК, что может быть обусловлено ее низким коэффициентом распределения между раствором и твердой фазой ПММ-Cu(II)-Nc [145]. При уменьшении размера пластинок ПММ наблюдается нивелирование коэффициентов чувствительности определения АО, т.е. уменьшение параметра T до 1,3 и 2,3 (при исключении из веера галловой кислоты) для времени контакта 20 и 40 мин, соответственно, что позволяет дополнительно уменьшить ширину интервалов при определении Σ АО с использованием алгоритма ИО.

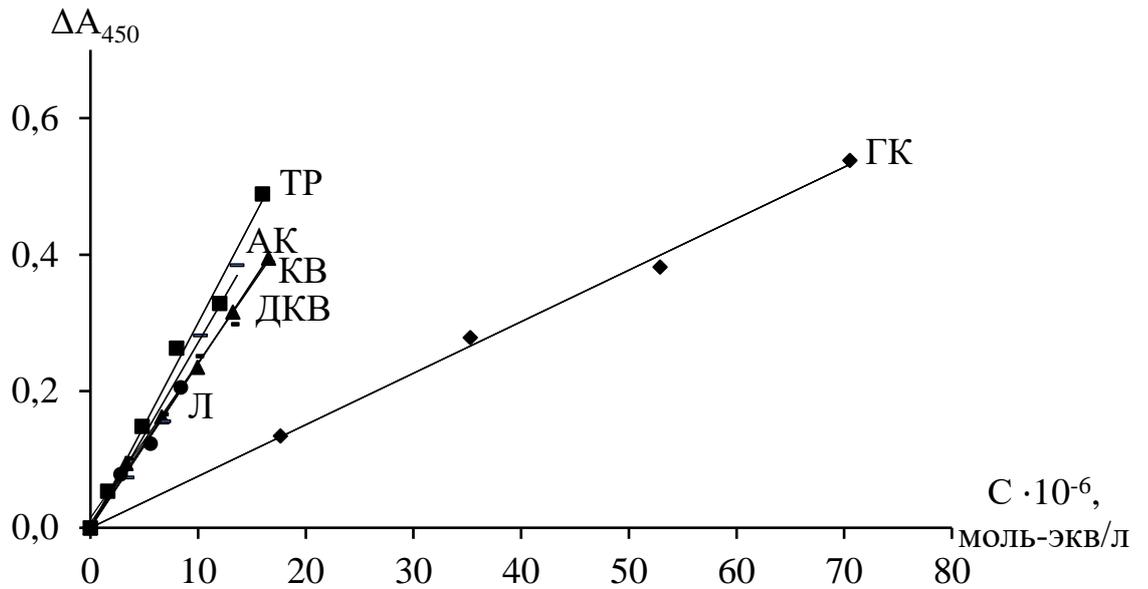


Рисунок 33 – Градуировочные зависимости для определения Σ АО с использованием индикаторной системы ПММ-Cu(II)-Nc размером (4×4) мм при времени контакта с растворами АО 20 минут

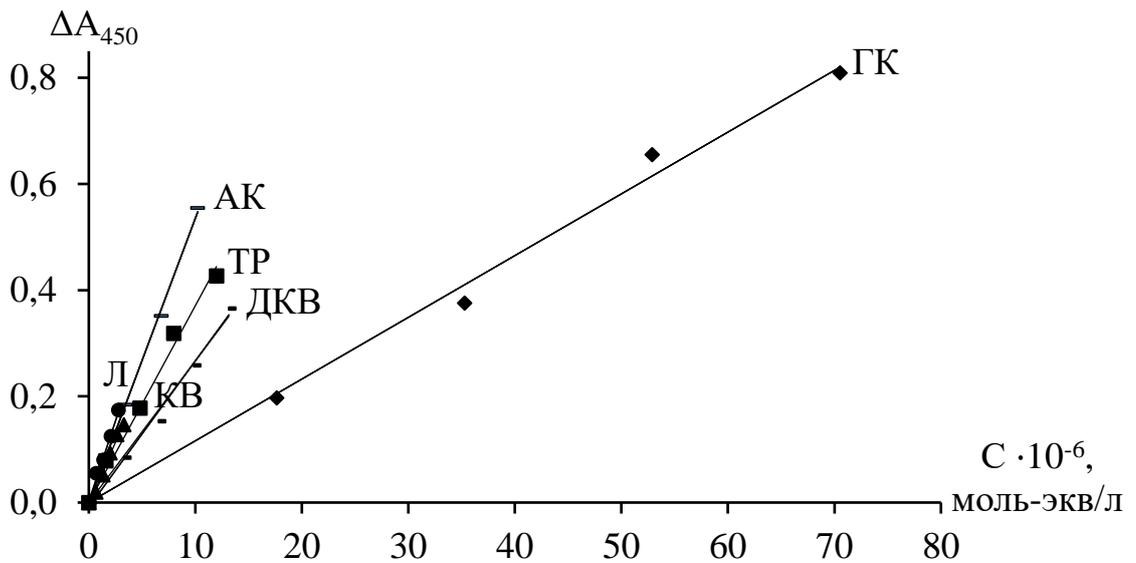


Рисунок 34 – Градуировочные зависимости для определения Σ АО с использованием индикаторной системы ПММ-Cu(II)-Nc размером (4×4) мм при времени контакта с растворами АО 40 минут

Таким образом, изменение соотношения объема анализируемого раствора к массе твердой фазы приводит не только к повышению чувствительности определения АО, но и к снижению внутригрупповой селективности, и, как следствие, к более точному твердофазно-спектрофотометрическому определению суммарного содержания АО с использованием алгоритма ИО.

Таблица 28 – Параметры градуировочных зависимостей для определения антиоксидантов с использованием индикаторной системы ПММ-Cu(II)-Nc размером (4×4) мм

Антиоксидант	Уравнения градуировочной зависимости	R ²	ДОС, 10 ⁻⁶ , моль-экв/л	T
Время контакта 20 минут				
Кверцетин	$\Delta A_{450} = 2,4 \cdot 10^4 C_{КВ}$	0,998	3,3 – 16,5	3,8/(1,3*)
Лютеолин	$\Delta A_{450} = 2,4 \cdot 10^4 C_{Л}$	0,990	2,8 – 8,4	
Дигидрокверцетин	$\Delta A_{450} = 2,4 \cdot 10^4 C_{ДКВ}$	0,990	3,2 – 16,4	
Аскорбиновая кислота	$\Delta A_{450} = 2,7 \cdot 10^4 C_{АК}$	0,990	3,4 – 14,0	
Тролокс	$\Delta A_{450} = 3,0 \cdot 10^4 C_{ТР}$	0,990	1,6 – 16,0	
Галловая кислота	$\Delta A_{450} = 0,8 \cdot 10^4 C_{ГК}$	0,997	17,6 – 70,5	
Время контакта 40 минут				
Кверцетин	$\Delta A_{450} = 4,5 \cdot 10^4 C_{КВ}$	0,990	0,7 – 3,3	5,2/(2,3*)
Лютеолин	$\Delta A_{450} = 6,2 \cdot 10^4 C_{Л}$	0,990	0,7 – 2,8	
Дигидрокверцетин	$\Delta A_{450} = 2,7 \cdot 10^4 C_{ДКВ}$	0,991	3,2 – 13,1	
Аскорбиновая кислота	$\Delta A_{450} = 5,4 \cdot 10^4 C_{АК}$	0,999	3,4 – 10,2	
Тролокс	$\Delta A_{450} = 3,7 \cdot 10^4 C_{ТР}$	0,990	1,6 – 12,0	
Галловая кислота	$\Delta A_{450} = 1,2 \cdot 10^4 C_{ГК}$	0,993	17,6 – 70,5	

* – численное значение параметра внутригрупповой селективности веера градуировочных зависимостей без учета ГК

Таблица 29 – Чувствительность определения АО ($b \cdot 10^4$) и рассчитанные отношения чувствительностей в зависимости от размера образца

Антиоксидант	Время контакта 20 мин		$\frac{b \cdot 10^4_{(4 \times 4)}}{b \cdot 10^4_{(6 \times 8)}}$	Время контакта 40 мин		$\frac{b \cdot 10^4_{(4 \times 4)}}{b \cdot 10^4_{(6 \times 8)}}$
	Размер образца ($V=5,0 \text{ см}^3$)			Размер образца ($V=5,0 \text{ см}^3$)		
	6×8 мм m=0,04 г	4×4 мм m=0,01 г	6×8 мм m=0,04 г	4×4 мм m=0,01 г		
Кверцетин	1,3	2,4	1,8	1,6	4,5	2,8
Лютеолин	1,0	2,4	2,4	1,2	6,2	5,2
Дигидрокверцетин	0,6	2,4	4,0	0,9	2,7	3,0
Аскорбиновая кислота	1,1	2,7	2,5	3,2	5,4	1,7
Тролокс	1,05	3,0	2,9	1,2	3,7	3,1
Галловая кислота	0,5	0,8	1,6	1,0	1,2	1,2

4.2.3 Колориметрия цифрового изображения Cu(I)-Nc-ПММ после контакта с растворами антиоксидантов

Колориметрия цифрового изображения с детектированием аналитического сигнала с помощью смартфона в последнее время набирает всё большую популярность. Данный подход позволяет сразу обмениваться получаемыми аналитическими данными, проводить анализы быстрее и дешевле.

Для оценки измерения аналитического сигнала с помощью смартфона были получены цифровые сканированные изображения при построении градуировочных зависимостей в п. 4.2.2 (таблица 30).

Таблица 30 – Сканированные изображения ПММ-Cu(I)-Nc после контакта с растворами АО

Антиоксидант	Время контакта 20 минут	Время контакта 40 минут
Кверцетин	 0 3,3 6,6 9,9 13,2 16,5 $\times 10^{-6}$ МОЛЬ-ЭКВ/Л	 0 0,7 1,3 2,0 2,6 3,3 $\times 10^{-6}$ МОЛЬ-ЭКВ/Л
Лютеолин	 0 2,8 5,6 8,4 11,2 $\times 10^{-6}$ МОЛЬ-ЭКВ/Л	 0 0,7 1,4 2,1 2,8 $\times 10^{-6}$ МОЛЬ-ЭКВ/Л
Дигидрокверцетин	 0 3,3 6,6 9,9 13,3 16,4 $\times 10^{-6}$ МОЛЬ-ЭКВ/Л	 0 3,3 6,6 9,9 13,3 16,4 $\times 10^{-6}$ МОЛЬ-ЭКВ/Л
Аскорбиновая кислота	 0 3,4 6,8 10,2 13,6 17,0 $\times 10^{-6}$ МОЛЬ-ЭКВ/Л	 0 3,4 6,8 10,2 13,6 17,0 $\times 10^{-6}$ МОЛЬ-ЭКВ/Л
Тролокс	 0 1,6 4,8 8,0 12,0 16,0 $\times 10^{-6}$ МОЛЬ-ЭКВ/Л	 0 1,6 4,8 8,0 12,0 16,0 $\times 10^{-6}$ МОЛЬ-ЭКВ/Л
Галловая кислота	 0 17,6 35,3 52,9 70,5 $\times 10^{-6}$ МОЛЬ-ЭКВ/Л	 0 17,6 35,3 52,9 70,5 $\times 10^{-6}$ МОЛЬ-ЭКВ/Л

В качестве примера показаны градуировочные зависимости ПММ-Cu(I)-Nc после контакта с раствором ТР, полученные методом твердофазной спектрофотометрии (рис. 35 а)) и с использованием колориметрии цифрового изображения (рис. 35 б)), при времени контакта изучаемой системы с раствором ТР 20 и 40 минут, их параметры и ДОС ТР представлены в таблице 31. Как видно, при переходе к колориметрии цифрового изображения в качестве аналитических сигналов можно использовать green канал (G), величину цветового различия (ΔE), а также желтизну (G), так как ПММ-Cu(II)-Nc после контакта с растворами АО имеют желтое окрашивание и интенсивность этой окраски увеличивается при увеличении концентрации АО.

Однако из рисунка 35 и таблицы 31 видно, что использование величины цветового различия (ΔE) и green канала (G) в качестве аналитических параметров при интерпретации колориметрических данных приводит к сужению диапазона определения содержания АО, получению градуировочных зависимостей с низкими коэффициентами аппроксимации, и как следствие невозможности использования данных цветометрических характеристик для построения градуировочных зависимостей при определении Σ АО с использованием ПММ-Cu(II)-Nc. Аналогичные зависимости наблюдаются и для других АО.

При этом, использование желтизны (G) для оценки цифровых сканированных изображений ПММ-Cu(I)-Nc после контакта с раствором ТР не приводит к сужению диапазона определения содержания ТР, по сравнению с диапазоном определения содержания ТР в твердофазном спектрофотометрическом методе, с коэффициентами аппроксимации градуировочных зависимостей 0,993 и 0,991 при времени контакта 20 и 40 минут соответственно.

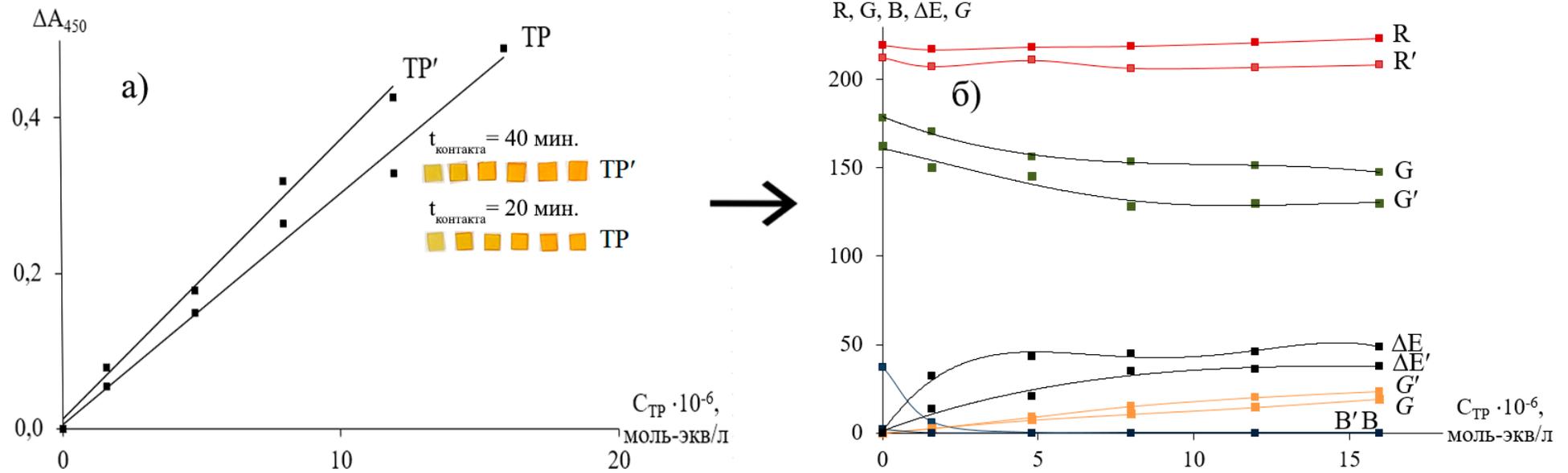


Рисунок 35 – Градуировочные зависимости для определения ТР, где аналитический сигнал: а) ΔA_{450} б) интенсивности цвета цветочных каналов R, G, B, цветового различия (ΔE) и желтизны (G) при времени контакта с раствором ТР 20 (без штриха) и 40 (со штрихом) минут

Таблица 31 – Параметры градуировочных зависимостей G , ΔE , желтизны (G) от концентрации тролокса

Аналитический сигнал	Уравнение градуировочной зависимости	R^2	ДОС, 10^{-6} , моль-экв/л		
			Колориметрия цифрового изображения	Твердофазная спектрофотометрия	
Время контакта 20 минут					
Желтизна (G)	$G = 0,82 + 1,2 \cdot 10^6 C_{TP}$	0,993	1,6 – 16,0	1,6 – 16,0	
ΔE	–	–	1,6 – 4,8		
G	$G = 172,3 - 1,8 \cdot 10^6 C_{TP}$	0,827			
Время контакта 40 минут					
Желтизна (G')	$G = 0,25 + 1,7 \cdot 10^6 C_{TP}$	0,993	1,6 – 12,0		
$\Delta E'$	$\Delta E = 2,8 + 4,0 \cdot 10^6 C_{TP}$	0,957	1,6 – 8,0		
G'	$G = 155,2 - 2,0 \cdot 10^6 C_{TP}$	0,768			

Зависимости желтизны (G) от концентрации остальных АО при времени контакта изучаемой системы с растворами АО 20 и 40 минут показаны на рисунках 36-37 соответственно, с параметрами градуировочных зависимостей, представленными в таблице 32.

Использование колориметрии как независимого способа регистрации сигнала повышает надежность определения Σ АО с использованием системы ПММ-Cu(II)-Nc и позволяет получить диапазон определения содержания АО и градуировочные зависимости с коэффициентами аппроксимации, которые сопоставимы с диапазоном определения содержания АО и коэффициентами аппроксимации, полученными с использованием метода твердофазной спектрофотометрии (табл. 32). Следовательно, оба метода могут применяться при определении суммарного содержания АО с использованием системы ПММ-Cu(II)-Nc.

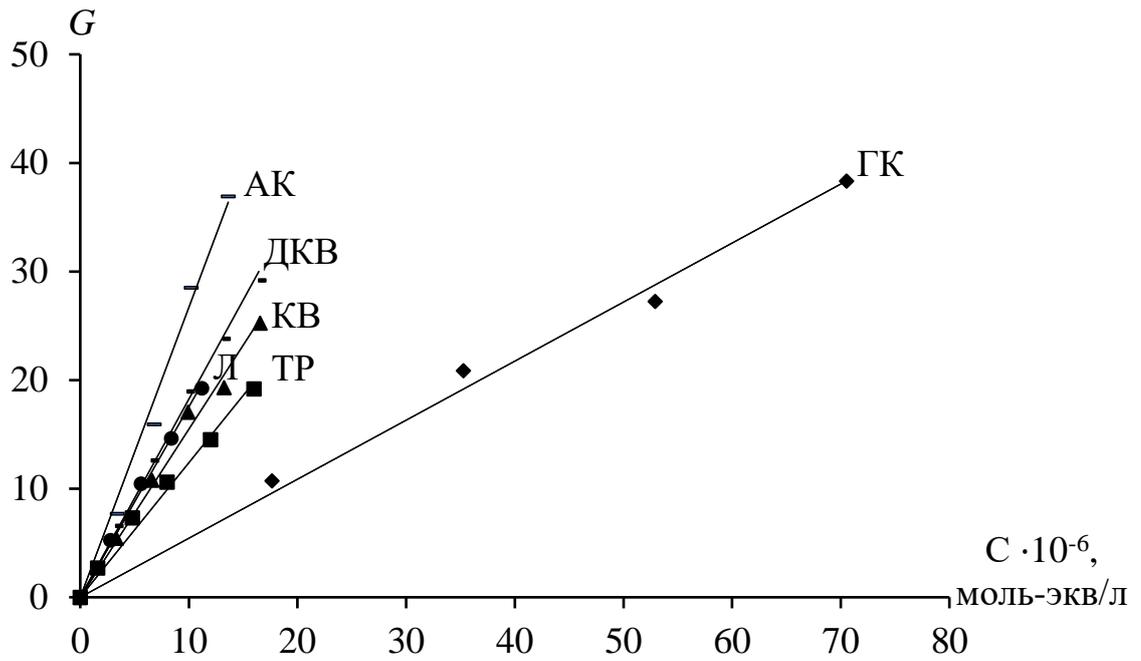


Рисунок 36 – Зависимости желтизны (G) от концентрации АО для определения Σ АО с использованием индикаторной системы ПММ-Cu(II)-Nc размером (4×4) мм при времени контакта с растворами АО 20 минут

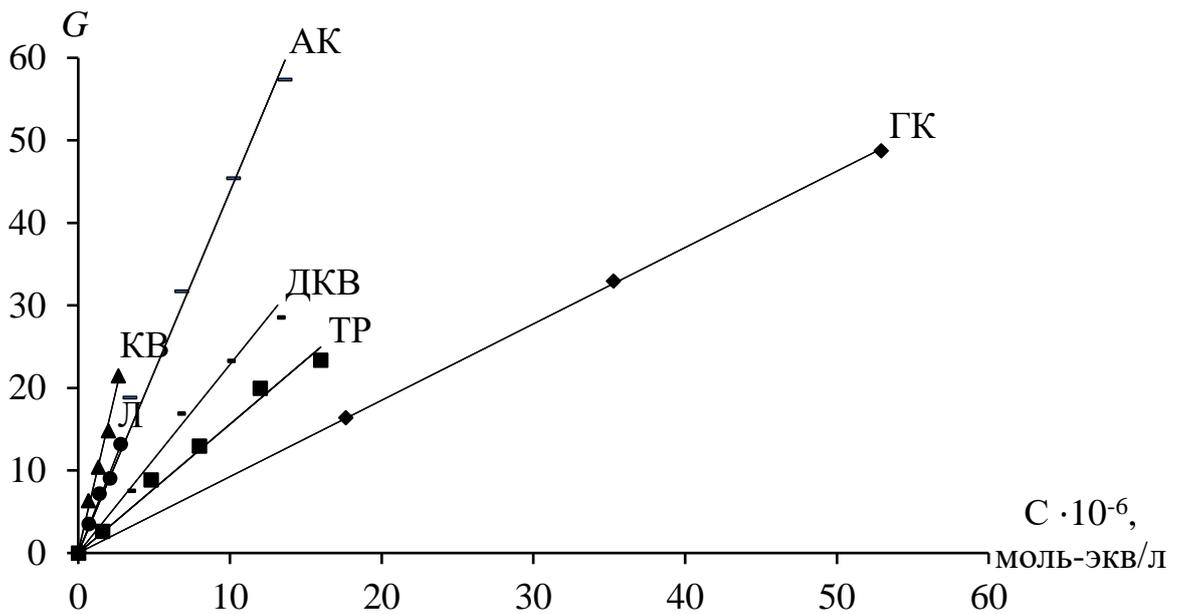


Рисунок 37 – Зависимости желтизны (G) от концентрации АО для определения Σ АО с использованием индикаторной системы ПММ-Cu(II)-Nc размером (4×4) мм при времени контакта с растворами АО 40 минут

Таблица 32 – Параметры градуировочных зависимостей желтизны (G) от концентрации АО

Антиоксидант	Уравнения градуировочной зависимости	R^2	ДОС, 10^{-6} , моль-экв/л	
			Колориметрия цифрового изображения	Твердофазная спектрофотометрия
Время контакта 20 минут				
Кверцетин	$G = 1,5 \cdot 10^6 C_{КВ}$	0,990	3,3 – 16,5	3,3 – 16,5
Лютеолин	$G = 1,8 \cdot 10^6 C_{Л}$	0,997	2,8 – 11,2	2,8 – 8,4
Дигидрокверцетин	$G = 1,8 \cdot 10^6 C_{ДКВ}$	0,996	3,2 – 16,4	3,2 – 16,4
Аскорбиновая кислота	$G = 2,7 \cdot 10^6 C_{АК}$	0,990	3,4 – 14,0	3,4 – 14,0
Тролокс	$G = 1,2 \cdot 10^6 C_{ТР}$	0,990	1,6 – 16,0	1,6 – 16,0
Галловая кислота	$G = 0,54 \cdot 10^6 C_{ГК}$	0,993	17,6 – 70,5	17,6 – 70,5
Время контакта 40 минут				
Кверцетин	$G = 7,9 \cdot 10^6 C_{КВ}$	0,991	0,7 – 2,6	0,7 – 3,3
Лютеолин	$G = 4,7 \cdot 10^6 C_{Л}$	0,990	0,7 – 2,8	0,7 – 2,8
Дигидрокверцетин	$G = 2,3 \cdot 10^6 C_{ДКВ}$	0,990	3,2 – 13,1	3,2 – 13,1
Аскорбиновая кислота	$G = 4,4 \cdot 10^6 C_{АК}$	0,990	3,4 – 14,0	3,4 – 10,2
Тролокс	$G = 1,6 \cdot 10^6 C_{ТР}$	0,990	1,6 – 12,0	1,6 – 12,0
Галловая кислота	$G = 0,93 \cdot 10^6 C_{ГК}$	0,999	17,6 – 53,0	17,6 – 70,5

Однако применение колориметрической обработки цифрового изображения не приводит к нивелированию коэффициентов чувствительности ввара градуировочных зависимостей, параметр T равен 5,0 и 8,5 при времени контакта ПММ-Cu(II)-Nc с растворами АО 20 и 40 мин соответственно.

Таким образом, колориметрическая обработка цифрового изображения позволяет экспрессно провести оценку суммарного содержания АО, однако не приводит к снижению внутригрупповой селективности определения АО в вварах градуировочных зависимостей для определения суммарного содержания АО с использованием алгоритма ИО.

Заключение

Давая общую характеристику предлагаемой аналитической системы ПММ-Cu(II)-Nc для определения суммарного содержания АО, можно отметить следующее.

При оценке влияния ПММ на реакционную способность комплекса по сравнению с проведением метода CUPRAC в растворе были определены коэффициенты эквивалентной антиоксидантной способности тролокса (по отношению к веществу стандарту-тролоксу) (trolox equivalent antioxidant capacity) (TEAC)) метода CUPRAC в твердой фазе и в растворе, рассчитанные путем деления коэффициентов чувствительности (коэффициенты b в уравнении градуировочной зависимости) определения АО на коэффициент чувствительности ТР (табл. 33). Исследование влияния ПММ на значение TEAC коэффициентов методом однофакторного дисперсионного анализа с использованием пакета Excel показало, что экспериментальное значение критерия Фишера $F_{\text{эксп}} = 0,10$ меньше $F_{\text{табл}} = 4,5$ при $P = 0,95$, что свидетельствует об отсутствии значимого влияния ПММ на протекание окислительно-восстановительных реакций АО с Cu(II)-Nc. Однако, отсутствие точного соответствия между значениями TEAC коэффициентов в ПММ и в растворе обусловлено необходимостью диффузии АО к поверхности ПММ-Cu(II)-Nc и наличием объемных заместителей у полифенольных АО, что вызывает уменьшение скорости реакции по сравнению с раствором, при этом локальное концентрирование окисляющего реагента для молекул АО, диффундирующих к поверхности, будет являться фактором повышения скорости реакции по сравнению с раствором. Аналогичные результаты представлены в работах [93, 94, 96] при сопоставлении TEAC коэффициентов в растворе и при использовании в качестве твердой фазы каррагинана и нафионовой мембраны. При этом, TEAC коэффициенты, полученные при использовании ПММ в качестве аналитической среды для иммобилизации Cu(II)-Nc, сопоставимы с TEAC коэффициентами, полученными при использовании каррагинана и нафионовой мембраны.

Таблица 33 – Коэффициенты эквивалентной антиоксидантной способности тролокса (ТЕАС) метода CUPRAC в твердой фазе и в растворе

АО	ТЕАС в растворе	ТЕАС в твердой фазе			
		ПММ размер образца 6,0×8,0 мм $t_{\text{контакта}} = 20$ мин	Каррагинан размер образца 35,0×5,0 мм $t_{\text{контакта}} = 90$ мин [96]	Нафионовая мембрана размер образца 45,0×5,0 или 20,0×10,0 мм $t_{\text{контакта}} = 30$ мин	
				[93]	[94]
ГК	2,62 [94]	0,81	2,4	2,10	1,76
АК	0,96 [94]	0,95	1,3	0,71	0,42
ТР		1,0			
КВ	4,38 [94]	3,10	6,8	4,11	3,79
Ц	0,39 [94]	0,27	0,7	-	0,40
К	3,09 [94]	0,57	4,2	1,92	1,16
ДКВ	1,46	1,62		-	
Л	1,20	1,86		-	
Т	3,86	6,67		-	

Сравнение коэффициентов чувствительности градуировочных зависимостей определения АО методом CUPRAC с использованием твердофазных систем показало, что аналитическая система ПММ-Cu(II)-Nc позволяет проводить определение с более высокой чувствительностью по сравнению с каррагинаном и нафионовой мембраной (табл. 34).

Таблица 34 – Коэффициенты чувствительности градуировочных зависимостей определения суммарного содержания АО методом CUPRAC с использованием твердофазных систем

АО	Коэффициенты чувствительности, 10^4 (без учета электронов)						
	Нафионовая мембрана		Каррагинан	ПММ			
	$t_{\text{контакта}} 30$ мин		$t_{\text{контакта}} 90$ мин	$t_{\text{контакта}} 20$ мин		$t_{\text{контакта}} 40$ мин	
	45,0 × 5,0 мм	20,0 × 10,0 мм	35,0 × 5,0 мм	6,0 × 8,0 мм	4,0 × 4,0 мм	6,0 × 8,0 мм	4,0 × 4,0 мм
ГК	5,06	0,39	2,4	1,7	2,5	3,0	3,5
АК	1,71	0,14	1,3	2,0	9,0	6,4	10,7
ТР	2,40	0,34	1,0	2,1	6,0	2,5	7,4
КВ	9,88	1,29	6,8	6,5	12,0	8,2	23,0
Ц	-	0,14	0,7	0,57	-	-	-
К	4,61	0,39	4,2	1,2	-	-	-

Использование ПММ в качестве аналитической среды для определения суммарного содержания АО методом CUPRAC имеет преимущества как во времени контакта с анализируемым образцом и в размере сенсора, так и по C_{\min} по стандарту ТР в сравнении с другими твердыми фазами, такими как нафионовая мембрана и каррагинан (табл. 35).

Таблица 35 – Характеристики некоторых CUPRAC сенсоров

Фаза	$t_{\text{контакта}}$, мин.	Размер сенсора, мм	C_{\min} по стандарту ТР
Каррагинан [96]	90	35,0 × 5,0	$4,7 \cdot 10^{-6}$ М
Нафионовая мембрана [93, 94]	30	45,0 × 5,0 или 20,0 × 10,0	$1,5 \cdot 10^{-5}$ М
ПММ	20-40	6,0 × 8,0 или 4,0 × 4,0	$0,8 \cdot 10^{-6}$ М

Таким образом, предложенный способ определения суммарного содержания антиоксидантов методом CUPRAC на основе полиметилметакрилатной матрицы может быть полезен специалистам в области аналитической химии для простого, быстрого, чувствительного, надежного и воспроизводимого способа оценки содержания антиоксидантов без предварительного этапа пробоподготовки, а также предоставляет хорошие перспективы создания универсального сенсора определения антиоксидантов в пищевой и фармацевтической промышленности.

Выводы

1. Создана твердофазная аналитическая система для определения суммарного содержания АО методом CUPRAC путем иммобилизации реагентов Cu(II) и неокупроина в полиметакрилатную матрицу.

2. Влиянии pH растворов индивидуальных АО на взаимодействие с ПММ-Cu(II)-Nc зависит от природы АО; АК, ГК, ТР взаимодействуют с системой ПММ-Cu(II)-Nc в узкой области pH 2 – 4, в отличие от полифенольных Л, ДКВ, КВ, Т, К, характеризующихся широким диапазоном pH 3,5 – 10. Установлено, что все исследованные АО могут быть определены системой ПММ-Cu(II)-Nc в общем диапазоне pH от 3,5 до 4.

3. Установлено, что аналитический сигнал носит аддитивный характер. При использовании в качестве вещества-стандарта АК, ГК и ТР для выражения суммарного содержания АО отклонение экспериментально полученного суммарного содержания АО от теоретически рассчитанного не превышало 10 %.

4. Предложен способ твердофазной спектрофотометрического определения суммарного содержания АО методом CUPRAC с использованием ПММ-Cu(II)-Nc. Разработанная аналитическая система ПММ-Cu(II)-Nc позволяет провести определение суммарного содержания антиоксидантов в лекарственных настойках, соковой продукции и чаях с показателями повторяемости, правильности и точности, не превышающими 20, 15 и 24 % соответственно. Установлена корреляция между суммарным содержанием АО и содержанием фенольных соединений, флавоноидов, танинов, антоцианов с коэффициентами корреляции до 0,99.

5. Применение алгоритма интервальных оценок для определения суммарного содержания АО методом CUPRAC с использованием ПММ-Cu(II)-Nc показало, что ширина интервалов, полученных с применением алгоритма ИО, на порядок превышает ширину доверительных интервалов в виде случайной составляющей погрешности с использованием вещества-стандарта, что указывает на необходимость нивелирования коэффициентов чувствительности определения АО. Увеличение времени контакта АО фенольной природы с ПММ-Cu(II)-Nc с 20

до 40 мин приводит к сужению веера градуировочных зависимостей с уменьшением коэффициента чувствительности T с 2,6 до 1,8. Изменение соотношения объема анализируемого раствора к массе твердой фазы уменьшает параметр T до 1,3 и 2,3 при времени контакта 20 и 40 мин соответственно.

6. Установлено, что при определении суммарного содержания АО методом колориметрии цифрового изображения ПММ-Cu(II)-Nc после контакта с раствором АО с использованием в качестве аналитического сигнала параметра желтизны позволяет проводить определение АО в диапазоне $(0,7 - 53,0) \cdot 10^{-6}$, моль-экв/л, что сопоставимо с результатами метода твердофазной спектрофотометрии.

Список используемой литературы

1. Gülçın İ. Antioxidant activity of food constituents: an overview // Archives of Toxicology. – 2011. – Vol. 86, № 3. – P. 345 – 391. DOI: 10.1007/s00204-011-0774-2
2. Yunzhong F. Free radicals, antioxidants, and nutrition / F. Yunzhong, S. Yang, G. Wu // Nutrition. – 2002. – Vol. 18, № 10. – P. 872 – 879. DOI: 10.1016/s0899-9007(02)00916-4
3. Oroian M. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis / M. Oroian, I. Escriche // Food Research International. – 2015, – Vol. 74. – P. 10 – 36. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.04.018
4. Lobo V. Free Radicals, antioxidants and functional Foods: Impact on human health / V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, N. Chandra // Pharmacognosy Reviews. – 2010, – Vol. 4. – P. 118 – 126. DOI: 10.4103/0973-7847.70902
5. Kaur C. Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium's health / C. Kaur, H. C. Kapoor // International journal of food science and technology. – 2001. – Vol. 36, № 7. – P. 703 – 725. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2001.00513.x
6. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: extraction, assessment and resources / D. Xu [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2017. – Vol. 18, № 1. – P. 96 – 128. DOI: 10.3390/ijms18010096
7. Munteanu I. G. Analytical methods used in determining antioxidant activity: a review / I. G. Munteanu, C. Apetrei // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22, № 7. – P. 3380 – 3410. DOI: 10.3390/ijms22073380
8. Gülçın, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview // Archives of Toxicology. – 2020. – Vol. 94, № 3. – P. 651 – 715. DOI: 10.1007/s00204-020-02689-3
9. Niki E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo // Free Radical Biology and Medicine. – 2010. – Vol. 49, №4. – P. 503 – 515. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016
10. Sahu N. Different methods for determining antioxidant activity: a review / N. Sahu, J. Saxena // Indo American Journal of Pharmaceutical Research. – 2013, – Vol. 3. –

P. 7025 – 7028.

11. López-Alarcón C. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays / C. López-Alarcón, A. Denicola // *Analytica Chimica Acta*. – 2013. – Vol. 763. – P. 1 – 10. DOI: 10.1016/j.aca.2012.11.051
12. Shahidi F. Measurement of antioxidant activity / F. Shahidi, Y. Zhong // *Journal of Functional Foods*. – 2015. – Vol. 18. – P. 757 – 787. DOI: 10.1016/j.jff.2015.01.047
13. Karadağ A. Review of methods to determine antioxidant capacities / A. Karadağ, B. Özçelik, S. Saner // *Food Analytical Methods*. – 2009. – Vol. 2, № 1. – P. 41 – 60. DOI: 10.1007/s12161-008-9067-7
14. Apak R. Measurement of antioxidant activity and capacity: recent trends and applications / R. Apak, E. Capanoglu, F. Shahidi. – John Wiley and Sons, 2018. – 341 p. DOI:10.1002/9781119135388
15. Correlation of Total Antioxidant Capacity with Reactive Oxygen Species (ROS) Consumption Measured by Oxidative Conversion / S. D. Çekiç [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2013. – Vol. 61, № 22. – P. 5260 – 5270. DOI: 10.1021/jf3051297
16. Huang D. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays / D. Huang, B. Ou, R. L. Prior // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2005. – Vol. 53, № 6. – P. 1841 – 1856. DOI: 10.1021/jf030723c
17. Cao G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants / G. Cao, H. M. Alessio, R. G. Cutler // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1993. – Vol. 14, № 3. – P. 303 – 311. DOI: 10.1016/0891-5849(93)90027-r
18. Regoli F. Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxynitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals / F. Regoli, G. W. Winston // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 1999. – Vol. 156, № 2. – P. 96 – 105. DOI: 10.1006/taap.1999.8637
19. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies / W. Bors [et al.] // *In Methods in Enzymology*. – 1990. – Vol. 186. – P. 343 – 355. DOI: 10.1016/0076-6879(90)86128-i
20. Prior R. L. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and

- phenolics in foods and dietary supplements / R. L. Prior, X. Wu, K. M. Schaich // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2005. – Vol. 53, № 10. – P. 4290 – 4302. DOI: 10.1021/jf0502698
21. Wright J. S. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants / J. S. Wright, E. R. Johnson, G. A. DiLabio // *Journal of the American Chemical Society*. – 2001. – Vol. 123, № 6. – P. 1173 – 1183. DOI: 10.1021/ja002455u
22. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based assays / R. Apak [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2016. – Vol. 64, № 5. – P. 997 – 1027. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b04739
23. Yen G. Antioxidative properties of methanolic extracts from peanut hulls / G. Yen, P. Duh // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 1993. – Vol. 70, № 4. – P. 383 – 386. DOI: 10.1007/bf02552711
24. Özyurt D. Determination of total antioxidant capacity by a new spectrophotometric method based on Ce(IV) reducing capacity measurement / D. Özyurt, B. Demirata, R. Apak // *Talanta*. – 2007. – Vol. 71, № 3. – P. 1155 – 1165. DOI: 10.1016/j.talanta.2006.06.015
25. Işık E. Development of a new chromium reducing antioxidant capacity (CHROMAC) assay for plants and fruits / E. Işık, S. Şahin, C. Demir // *Talanta*. – 2013. – Vol. 111. – P. 119 – 124. DOI: 10.1016/j.talanta.2013.02.053
26. Direct electrochemical sensing and detection of natural antioxidants and antioxidant capacity in vitro systems / A. J. Blasco [et al.] // *Electroanalysis*. – 2007. – Vol. 19, № 22. – P. 2275 – 2286. DOI: 10.1002/elan.200704004
27. Development and validation of a voltammetric method for determination of total phenolic acids in cotton cultivars / G. Magarelli [et al.] // *Microchemical Journal*. – 2013. – Vol. 109. – P. 23 – 28. DOI: 10.1016/j.microc.2012.05.014
28. Novak I. Electrochemical characterization of epigallocatechin gallate using Square-Wave voltammetry / I. Novak, M. Šeruga, Š. Komorsky-Lovrić // *Electroanalysis*. – 2009. – Vol. 21, № 9. – P. 1019 – 1025. DOI: 10.1002/elan.200804509

29. Simple and rapid silver nanoparticles based antioxidant capacity assays: Reactivity study for phenolic compounds / F. Della Pelle [et al.] // *Food Chemistry*. – 2018. – Vol. 256. – P. 342 – 349. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.02.141
30. Vasilescu A. Nanoparticle-Based technologies for the detection of food antioxidants / A. Vasilescu, E. Sharpe, S. Andreescu // *Current Analytical Chemistry*. – 2012. – Vol. 8, № 4. – P. 495 – 505. DOI: 10.2174/157341112803216780
31. Tolun A. Chemical sensing of food phenolics and antioxidant capacity / A. Tolun, Z. Altıntaş // *In Elsevier eBooks*. – 2023. – P. 593 – 646. DOI: 10.1016/b978-0-323-90222-9.00004-2
32. Antioxidant capacity assessment of plant extracts for green synthesis of nanoparticles / M. Martínez-Cabanas // *Nanomaterials*. – 2021. – Vol. 11, № 7. – P. 1679 – 1693. DOI: 10.3390/nano11071679
33. Antioxidant capacity index based on gold nanoparticles formation. Application to extra virgin olive oil samples / F. Della Pelle // *Food Chemistry*. – 2015. – Vol. 178. – P. 70 – 75. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.01.045
34. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 2. Hydrogen Atom Transfer (HAT)-Based, Mixed-Mode (Electron Transfer (ET)/HAT), and lipid peroxidation assays / R. Apak [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2016. – Vol. 65, № 5. – P. 1028 – 1045. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b04743
35. Changes in phenolic composition and antioxidant activity of virgin olive oil during frying / S. Gómez-Alonso // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2002. – Vol. 51, № 3. – P. 667 – 672. DOI: 10.1021/jf025932w
36. Wolfe K. L. Cellular Antioxidant Activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements / K. L. Wolfe, R. H. Liu // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2007. – Vol. 55, № 22 – P. 8896 – 8907. DOI: 10.1021/jf0715166
37. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 3. Reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) scavenging assays, oxidative stress biomarkers, and Chromatographic/Chemometric assays / R. Apak [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2016. – Vol. 64, № 5. – P. 1046 – 1070. DOI:

10.1021/acs.jafc.5b04744

38. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems / J. Lü [et al.] // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2010. – Vol. 14, № 4. – P. 840 – 860. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x
39. Dapkevičius A. Evaluation and comparison of two improved techniques for the on-line detection of antioxidants in liquid chromatography eluates / A. Dapkevičius, T. Van Beek, H. Niederländer // *Journal of Chromatography A*. – 2001. – Vol. 912, № 1. – P. 73 – 82. DOI: 10.1016/s0021-9673(01)00548-9
40. Koleva I. An On-Line HPLC method for detection of radical scavenging compounds in complex mixtures / I. Koleva, H. Niederländer, T. Van Beek // *Analytical Chemistry*. – 2000. – Vol. 72, № 10. – P. 2323 – 2328. DOI: 10.1021/ac9912451
41. On-line HPLC-ABTS screening and HPLC-DAD-MS/MS identification of free radical scavengers in Gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) fruit extracts / W. He [et al.] // *Food Chemistry*. – 2010. – Vol. 123, № 2. – P. 521 – 528. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.04.030
42. Determination of antioxidants by a novel on-line HPLC-cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay with post-column detection / S. E. Çelik [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. – 2010. – Vol. 674, № 1. – P. 79 – 88. DOI: 10.1016/j.aca.2010.06.013
43. An on-line high-performance liquid chromatography–diode-array detector–electrospray ionization–ion-trap–time-of-flight–mass spectrometry–total antioxidant capacity detection system applying two antioxidant methods for activity evaluation of the edible flowers from *Prunus mume* / X. Zhang [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2015. – Vol. 1414. – P. 88 – 102. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.08.033
44. Singleton V. L. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent / V. L. Singleton, R. Orthofer, R. M. Lamuela-Raventos // *Meth. Enzymol.* – 1999. – Vol. 299. – P. 152 – 178. DOI: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1
45. Folin O. On phosphotungstic-phosphomolibdic compound of a color reagents / O.

- Folin, W. Denis // *Journal of Biological Chemistry*. – 1912. – Vol. 12. – P. 239 – 243. DOI: 10.1016/s0021-9258(18)88697-5
46. Folin O. On tyrosine and tryptophane determination in proteins / O. Folin, V. Ciocalteu // *Journal of Biological Chemistry*. – 1927. – Vol. 73. – P. 627 – 650. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)84277-6
47. Reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts / N. Cicco [et al.] // *Microchemical Journal*. – 2009. – Vol. 91. – P. 107 – 110. DOI: 10.1016/j.microc.2008.08.011
48. Total phenolic acids and flavonoid contents determination in Yemeni honey of various floral sources: Folin-Ciocalteu and spectrophotometric approach / S.M. Wabaidur [et al.] // *Food Science and Technology*. – 2020. – Vol. 40. – P. 647 – 652. DOI: 10.1590/fst.33119
49. Денисенко Т. А. Спектрофотометрическое определение суммы фенольных соединений в растительных объектах с использованием хлорида алюминия, 18-молибдодифосфата и реактива Фолина-Чокальтеу / Т. А. Денисенко, А. Б. Вишник, Л. П. Цыганок // *Аналитика и контроль*. – 2015. – Т. 19, № 4. – С. 373 – 380. DOI: 10.15826/analitika.2015.19.4.012
50. Özyürek M. The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement / M. Özyürek, K. Güçlü, R. Apak // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2011. – Vol. 30, № 4. – P. 652 – 664. DOI: 10.1016/j.trac.2010.11.016
51. Nanoparticle-Based Assays of Antioxidant Activity / M. Scampicchio [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 2006. – Vol. 78, № 6. – P. 2060 – 2063. DOI: 10.1021/ac052007a
52. Optical detection of phenolic compounds based on the surface plasmon resonance band of Au nanoparticles / M Reza Hormozi Nezhad [et al.] // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2008. – Vol. 71, № 1. – P. 199 – 203. DOI: 10.1016/j.saa.2007.12.003
53. Szydłowska-Czerniak A. A silver nanoparticle-based method for determination of antioxidant capacity of rapeseed and its products / A. Szydłowska-Czerniak, A. Tułodziecka, E. Szłyk // *Analyst*. – 2012. – Vol. 137. – P. 3750 – 3759. DOI:

10.1039/an9911600089

54. Evaluation of antioxidant activity of chrysanthemum extracts and tea beverages by gold nanoparticles-based assay / Q. Liu [et al.] // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2012. – Vol. 92, № 1. – P. 348 – 352. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.12.007
55. Development of a Silver Nanoparticle-Based Method for the Antioxidant Capacity Measurement of Polyphenols / M. Özyürek [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 2012. – Vol. 84, № 18. – P. 8052 – 8059. DOI: 10.1021/ac301925b
56. Detection of flavonoids and assay for their antioxidant activity based on enlargement of gold nanoparticles / J. Wang [et al.] // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2007. – Vol. 388, № 5-6. – P. 1199 – 1205. DOI: 10.1007/s00216-007-1295-y
57. Use of Nanotechnological Methods for the Analysis and Stability of Food Antioxidants / G. Ozkan [et al.] // *Impact of Nanoscience in the Food Industry*. – 2018. – P. 311 – 350. DOI: 10.1016/B978-0-12-811441-4.00011-X
58. Antioxidant capacity of cornelian cherry (*Cornus mas* L.). Comparison between permanganate reducing antioxidant capacity and other antioxidant methods / B. M. Popović [et al.] // *Food Chemistry*. – 2012, № 2. – Vol. 134. – P. 734 – 741. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.02.170
59. Benzie I. F. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «Antioxidant power»: the FRAP assay / I. F. Benzie, S. Strain // *Analytical Biochemistry*. – 1996. – Vol. 239, № 1. – P. 70 – 76. DOI: 10.1006/abio.1996.0292
60. Определение суммарного содержания антиоксидантов методом FRAP / Т. Г. Цюпко [и др.] // *Аналитика и контроль*. – 2011. – Т. 15, вып. 3. – С. 287 – 298.
61. Cömert E.D. Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century / E. D. Cömert, V. Gökmen // *Food Research International*. – 2018. – Vol. 105. – P. 76 – 93. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.10.056
62. Определение суммарного содержания фенольных антиоксидантов в чае с применением разных вариантов метода FRAP / Т. Г. Цюпко [и др.] // *Аналитика и контроль*. – 2019. – Т. 23, вып. 1. – С. 143 – 151. DOI: 10.15826/analitika.2019.23.1.011

63. Benzie I.F.F. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration / I.F.F. Benzie, J. J. Strain // *Methods in enzymology. Oxidants and Antioxidants. Part A.* – 1999. – Vol. 299. – P. 15 – 27. DOI: 10.1016/s0076-6879(99)99005-5
64. Benzie I.F.F. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay / I.F.F. Benzie, Y.T Szeto // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* – 1999. – Vol. 47, № 2. – P. 633 – 636. DOI: 10.1021/jf9807768
65. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin / V. Katalinić [et al.] // *Food Chemistry.* – 2004. – Vol. 86, № 4. – P. 593 – 600. DOI: 10.1016/j.foodchem.2003.10.007
66. Methods for testing antioxidant activity / M. Antolovich [et al.] // *Analyst.* – 2001. – Vol. 127, № 1. – P. 183 – 198. DOI: 10.1039/b009171p
67. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay / R. Apak [et al.] // *Molecules.* – 2007. – Vol. 12, № 7. – P. 1496 – 1547. DOI: 10.3390/12071496
68. Определение антиоксидантной активности пищевых продуктов с использованием индикаторной системы Fe(III)/Fe(II) – органический реагент / З. А. Темердашев [и др.] // *Заводская лаборатория. Диагностика материалов.* – 2006. – Т. 72, вып. 11. – С. 15 – 19.
69. Определение антиоксидантной активности сухих красных вин для оценки их качества / Т.Г. Цюпко и [др.] // *Зав. лаборатория. Диагностика материалов.* – 2008. – Т. 74, № 6. – С. 14 – 20.
70. Вершинин, В.И. Выявление отклонений от аддитивности в спектрофотометрическом анализе неразделенных смесей / В.И. Вершинин, И.В. Власова, Т.Г. Цюпко // *Методы и объекты химического анализа.* – 2010. – Т. 5, № 4. – С. 226 – 233.
71. Оценка антиоксидантной активности пищевых продуктов с использованием индикаторной системы на основе фенантролиновых комплексов железа / Т. Г. Цюпко [и др.] // *Известия вузов. Пищевая технология.* – 2011. – вып. 5–6. – С.

84–87.

72. Arya S. P. A new method for the ascorbic acid assay using iron(II) - pyridine-2,6-dicarboxylic acid complex / S.P. Arya, P. Jain, M. Mahajan // *Annali di chimica*. – 2002. – Vol. 92, № 11–12. – P. 1159–1164.
73. A novel antioxidant assay of ferric reducing capacity measurement using ferrozine as the colour forming complexation reagent / K.I. Berker [et. al.] // *Food Analytical Methods*. – 2010. – Vol. 2, № 11. – P. 1770–1778. DOI: 10.1039/C0AY00245C
74. Novel Total Antioxidant Capacity Index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their Cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method / R. Apak [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2004. – Vol. 52, № 26. – P. 7970 – 7981. DOI: 10.1021/jf048741x
75. Tütem E. Spectrophotometric determination of trace amounts of copper(I) and reducing agents with neocuproine in the presence of copper(II) / E. Tütem, R. Apak, F. Baykut // *Analyst*. – 1991. – Vol. 116, № 1. – P. 89 – 94. DOI: 10.1039/an9911600089
76. Evaluation of the copper(II) reduction assay using bathocuproinedisulfonic acid disodium salt for the total antioxidant capacity assessment: The CUPRAC–BCS assay / C. Campos [et al.] // *Analytical Biochemistry*. – 2009. – Vol. 392, № 1. – P. 37 – 44. DOI: 10.1016/j.ab.2009.05.024
77. Measurement of protein using bicinchoninic acid / P. F. Smith [et al.] // *Analytical Biochemistry*. – 1985. – Vol. 150, № 1. – P. 76 – 85. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90442-7
78. A new test method for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products / O. A. Zaporozhets [et al.] // *Agricultural and food chemistry*. – 2004. – № 52. – P. 21 – 25. DOI: 10.1021/jf0343480
79. Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)-neocuproine as chromogenic oxidant: The CUPRAC method / R. Apak [et al.] // *Free Radical Research*. – 2005. – Vol. 39, № 9. – P. 949 – 961. DOI: 10.1080/10715760500210145
80. Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper(II)–neocuproine

- reagent in beverages and pharmaceuticals / K. Güçlü [et al.]// *Talanta*. – 2005. – Vol. 65, № 5. – P. 1226 – 1232. DOI: 10.1016/j.talanta.2004.08.048
81. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay / R. Apak [et al.] // *Mikrochimica Acta*. – 2007. – Vol. 160, № 4. – P. 413 – 419. DOI: 10.1007/s00604-007-0777-0
82. Nakamura T. Modified CUPRAC spectrophotometric quantification of total polyphenol content in beer samples using Cu(II)/neocuproine complexes / T. Nakamura, N. Coichev, H. D. Moya // *Journal of food composition and analysis*. – 2012. – Vol. 28, № 2. – P. 126 – 134. DOI: 10.1016/j.jfca.2012.07.012
83. The reduction of Cu(II)/neocuproine complexes by some polyphenols: Total polyphenols determination in wine samples / G. Lee [et al.] // *Food Chemistry*. – 2011. – Vol. 126, № 2. – P. 679 – 686. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.11.020
84. Novel hydroxyl radical scavenging antioxidant activity assay for water-soluble antioxidants using a modified CUPRAC method / B. Bektaşoğlu [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2006. – Vol. 345, № 3. – P. 1194 – 1200. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.05.038
85. Hydroxyl radical scavenging assay of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method using catalase for hydrogen peroxide degradation / M. Özyürek [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. – 2008. – Vol. 616, № 2. – P. 196 – 206. DOI: 10.1016/j.aca.2008.04.033
86. Novel spectroscopic sensor for the hydroxyl radical scavenging activity measurement of biological samples / B. Bekdeşer [et al.] // *Talanta*. – 2012. – Vol. 99. – P. 689 – 696. DOI: 10.1016/j.talanta.2012.07.004
87. Gutteridge J. M. Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free-radical damage to amino acids and carbohydrates / J. M. Gutteridge // *FEBS Letters*. – 1981. – Vol. 128, № 2. – P. 343 – 346. DOI: 10.1016/0014-5793(81)80113-5
88. Cheng Z. Kinetic deoxyribose degradation assay and its application in assessing the antioxidant activities of phenolic compounds in a Fenton-type reaction system / Z. Cheng, Y. Li, WChang // *Analytica Chimica Acta*. – 2003. – Vol. 478, № 1. – P. 129 – 137. DOI: 10.1016/s0003-2670(02)01435-6

89. Measurement of xanthine oxidase inhibition activity of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method / M. Özyürek [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. – 2009. – Vol. 636, № 1. – P. 42 – 50. DOI: 10.1016/j.aca.2009.01.037
90. A novel hydrogen peroxide scavenging assay of phenolics and flavonoids using cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) methodology / M. Özyürek [et al.] // *Journal of Food Composition and Analysis*. – 2010. – Vol. 23, № 7. – P. 689 – 698. DOI: 10.1016/j.jfca.2010.02.013
91. tert-Butylhydroquinone as a spectroscopic probe for the superoxide radical scavenging activity assay of biological samples / B. Bekdeşer [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 2011. – Vol. 83, № 14. – P. 5652 – 5660. DOI: 10.1021/ac200788m
92. Simultaneous total antioxidant capacity assay of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the same acetone–water solution containing 2% methyl- β -cyclodextrin using the cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method / M. Özyürek [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. – 2008. – Vol. 630, № 1. – P. 28 – 39. DOI: 10.1016/j.trac.2010.11.016
93. Development of a low-cost optical sensor for cupric reducing antioxidant capacity measurement of food extracts / M. Bener [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 2010. – Vol. 82, № 10. – P. 4252 – 4258. DOI: 10.1021/ac100646k
94. Novel optical fiber reflectometric CUPRAC sensor for total antioxidant capacity measurement of food extracts and biological samples / M. Bener [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2013. – Vol. 61, № 35. – P. 8381 – 8388. DOI: 10.1021/jf402327x
95. Paper-based assay of antioxidant activity using analyte-mediated on-paper nucleation of gold nanoparticles as colorimetric probes / T. G. Choleva [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. – 2015. – Vol. 860. – P. 61 – 69. DOI: 10.1016/j.aca.2014.12.025
96. Carrageenan-based colorimetric sensor for total antioxidant capacity measurement / M. Bener [et al.] // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2018. – Vol. 273. – P. 439 – 447. DOI: 10.1016/j.snb.2018.06.061

97. Bener M. Ferric-o-phenanthroline adsorbed on a Nafion membrane: A novel optical sensor for antioxidant capacity measurement of food extracts / M. Bener, R. Apak // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2017. – Vol. 247. – P. 155 – 162. DOI: 10.1016/j.snb.2017.03.017
98. Akar Z. A new colorimetric method for CUPRAC assay with using of TLC plate / Z. Akar, N. A. Burnaz // *LWT*. – 2019. – Vol. 112. – P. 108212. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.05.110
99. Sensitivity enhancement of CUPRAC and iron(III)-phenanthroline antioxidant assays by preconcentration of colored reaction products on a weakly acidic cation exchanger / M. Özyürek [et al.] // *Reactive and Functional Polymers*. – 2007. – Vol. 67, № 12. – P. 1478 – 1486. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2007.07.030
100. The CUPRAC methods of antioxidant measurement for beverages / R. Apak [et al.] // *In Elsevier eBooks*. – 2016. – P. 235 – 244. DOI: 10.1016/b978-0-12-404738-9.00024-6
101. Solid-phase reagent for analgin and ascorbic acid on the basis of a copper(II) complex with tetrabenzotetraazacyclohexadecine immobilized by adsorption on silica gel / O. A. Zaporozhets [et al.] // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2001. – Vol. 56, № 6. – P. 524 – 529. DOI:10.1023/A:1016672425484
102. Липовская Н. А. Определение редокс-потенциала соединения, иммобилизованного на сорбенте / Н. А. Липковская, А. Г. Кольчинский, А. А. Чуйко // *Журнал физической химии*. – 1991. – Т. 65, № 11. – С. 3005 – 3010.
103. Direct measurement of total antioxidant capacity of cereals: QUENCHER-CUPRAC method / A. N. Tufan [et al.] // *Talanta*. – 2013. – Vol. 108. – P. 136 – 142. DOI: 10.1016/j.talanta.2013.02.061
104. The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas / R. Apak [et al.] // *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. – 2006. – Vol. 57, № 5–6. – P. 292 – 304. DOI: 10.1080/09637480600798132
105. Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS / persulphate and FRAP methods / S. E. Çelik [et al.] // *Talanta*. – 2010. – Vol. 81, № 4–5. – P. 1300 – 1309. DOI:

- 10.1016/j.talanta.2010.02.025
106. Spectrophotometric determination of ascorbic acid by the modified CUPRAC method with extractive separation of flavonoids–La(III) complexes / M. Özyürek [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. – 2007. – Vol. 588, № 1. – P. 88 – 95. DOI: 10.1016/j.aca.2007.01.078
107. Вершинин В. И. Определение суммарного содержания однотипных веществ (теория интегральных показателей) / В. И. Вершинин. – Омск: Изд-во Ом. гос. ун-та, 2016. – 288 с.
108. Вершинин В. И. Формирование групп и выбор стандартных веществ при определении суммарных содержаний однотипных соединений в виде интегральных показателей // *Журн. аналит. химии*. – 2017. – Т. 72, № 9. – С. 816 – 826. DOI: 10.7868/S0044450217090031
109. Вершинин В. И. Методологические аспекты группового анализа органических веществ // *Журн. аналит. химии*. – 2023. – Т. 78, № 2. – С. 129 – 143. DOI: 10.31857/S0044450223020147
110. Vershinin V. I. Total indices as a tool to estimate sum content of similar analytes. Review // *Talanta*. – 2015. – V. 131. – P. 292 – 300. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.07.102
111. Вершинин В. И. Методология анализа неразделенных смесей. Интервальные оценки суммарного содержания однотипных аналитов / В. И. Вершинин, Н. А. Исаченко, Н. С. Бриленок // *Журн. аналит. химии*. – 2016. – Т. 71, № 4. – С. 369 – 376. DOI: 10.7868/S0044450216040083
112. Вершинин В.И. Методология спектрофотометрического анализа смесей органических соединений. Погрешность оценки суммарного содержания аналитов с учетом их коэффициентов чувствительности / В. И. Вершинин, Н. С. Бриленок, Т. Г. Цюпко // *Журн. аналит. химии*. – 2012. – Т. 67, № 7. – С. 715 – 720.
113. Пат. 2282851 Российская Федерация, МПК G01N 33/02. Способ определения суммарной антиоксидантной активности / Цюпко Т. Г.; заявитель и патентообладатель Государственное образовательное учреждение высшего

профессионального образования Кубанский гос. ун-т. – опубл. 27.08.2006, Бюл. № 24. – 9 с.

114. Потенциометрический метод определения антиоксидантной активности: оценка основных метрологических характеристик / Е. Н. Шарафутдинова [и др.] // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2008. – Т. 74, вып. 6. – С. 9 – 14.
115. ГОСТ Р ИСО 5725–2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. введ. 2002-11-01. – М. : ИПК Издательство стандартов, 2002. – 63 с.
116. РМГ 61–2010 Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. введ. 2012-09-01. – М.: Стандартиформ, 2012. – 59 с.
117. Gavrilenko N. A. An optical sensor for the determination of ascorbic acid / N. A. Gavrilenko, G. M Mokrousov, O. V. Dzhiganskaya, // Journal of analytical chemistry. – 2004. – Vol. 59, № 9. – P. 871 – 874. DOI: 10.1023/b:janc.0000040703.73042.61
118. Gavrilenko N. A. Colorimetric sensor based on silver nanoparticle – embedded polymethacrylate matrix / N. A. Gavrilenko, N. V. Saranchina, M. A. Gavrilenko // Advanced materials research. – 2014. – Vol. 1040. – P. 923 – 927. DOI: 10.4028/www.scientific.net/amr.1040.923
119. ГОСТ 4212–2016. Реактивы. Методы приготовления растворов для колориметрического и нефелометрического анализа. – Взамен ГОСТ 4212–76; введ. 2018-01-01. – М. : Стандартиформ, 2019. – 25 с.
120. ГОСТ 32709-2014 Продукция соковая. Методы определения антоцианинов. введ. 2016-01-01. – М. : Стандартиформ, 2014. – 17 с.
121. Пат. 2272284 Российская Федерация, МПК G01N31/22. Индикаторный чувствительный материал для определения микроколичеств веществ / Гавриленко Н. А., Мокроусов Г. М.; заявитель и патентообладатель

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Томский гос. ун-т. – опубл. 20.03.2006, Бюл. № 8. – 8 с.

122. ГОСТ 19885–74 Чай. Методы определения содержания танина и кофеина. введ. 1975-07-01. – М. : Стандартиформ, 2009. – 4 с.
123. Валуйко Г. Г. Биохимия и технология красных вин / Г.Г. Валуйко. – М.: Пищ. Промышленность, 1973. – 292 с.
124. Марьин А. А. Разработка методик стандартизации сердечно-сосудистого сбора «Кардизид» / А. А. Марьин, Г. И. Калинин // Химия растительного сырья. – 2005. – № 1. – С. 37 – 40.
125. Иванов В. М. Химическая цветометрия: возможности метода, области применения и перспективы / В. М. Иванов, О. В. Кузнецова // Успехи химии. – 2001. – Т. 70, вып. 5. – С. 411 – 428.
126. Steenken S. One-electron redox potentials of phenols. Hydroxy- and aminophenols and related compounds of biological interest / 126. S. Steenken, P. Neta // Physical Chemistry. – 1982. – Vol. 86, № 18. – P. 3661 – 3667.
127. Jaiswal P. V. Effect of surfactants on the dissociation constants of ascorbic and maleic acids / P. V. Jaiswal, V. S. Ijeri, A. K. Srivastava // Colloids Surf B Biointerfaces. – 2005. – Vol. 46, №1. – P. 45 – 51. DOI: 10.1007/s12161-014-9814-x
128. Fernandes F. H. A. Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification / F. H. A. Fernandes, H. R. N. Salgado // Critical Reviews in Analytical Chemistry – 2016. – Vol. 46, № 3. – P. 257 – 265. DOI: 10.1080/10408347.2015.1095064
129. Hem J. D. Complexes of Ferrous Iron With Tannic Acid / J. D. Hem. – Washington: united states government printing office, 1960. – 94 с.
130. Slabbert N. P. Ionisation of some flavanols and dihydroflavonols // Tetrahedron. – 1977. – Vol. 33. – P. 821 – 824.
131. Acid–base chemistry of luteolin and its methyl-ether derivatives: A DFT and ab initio investigation / A. Amat [et al.] // Chemical Physics Letters. – 2008. – Vol. 462. – P. 313 – 317. DOI: 10.1016/j.cplett.2008.07.098

132. Determination of dissociation constants of flavonoids by capillary electrophoresis / J. M. Herrero-Martínez [et al.] // *Electrophoresis*. – 2005. – Vol. 26. – P. 1886 – 1895. DOI: 10.1002/elps.200410258
133. Yung-Chang Chin F. The peroxide-coupling kinetics and dissociation constants of aqueous cysteine and glutathione: experimental and model results, and implications / F. Yung-Chang Chin, P. K. Lim // *Chemical Engineering Science*. – 1989. – Vol. 44, № 4. – P. 883 – 893. DOI: 10.1016/0009-2509(89)85261-3
134. Масленников П. В. Содержание фенольных соединений в лекарственных растениях ботанического сада / П. В. Масленников, Г. Н. Чупахина, Л. Н. Скрыпник // *Известия РАН*. – 2013. – № 5. – С. 551 – 557. DOI: 10.7868/S000233291305010X
135. Jurd L. Aluminium complexes of phenolic flavones. Spectral and structural correlation // *Phytochemistry*. – 1969. – Vol. 8. – P. 445 – 462.
136. Pełkal A. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay / A. Pełkal, K. Pyrzynska // *Food Anal. Methods*. – 2014. – Vol. 7, №9. – P. 1776 – 1782. DOI: 10.1007/s12161-014-9814-x
137. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds/ M. P. Kähkönen [et al.] // *Agricultural and Food Chemistry*. – 1999. – Vol. 47, № 10. – P. 3954 – 3962. DOI: 10.1021/jf990146l
138. Changes in phenolics and antioxidant capacity during fermentation and simulated in vitro digestion of mango puree fermented with different lactic acid bacteria / F. M. Mashitoa [et al.] // *Food Processing and Preservation*. – 2021. – Vol. 45, № 11. – P. 1 – 13. DOI: 10.1111/jfpp.15937
139. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits / F. Li [et al.] // *Food Chemistry*. – 2011. – Vol. 129, № 2. – P. 345 – 350. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.04.079
140. Зиятдинова Г.К. Гальваностатическая кулонометрия в анализе природных полифенолов и ее применение в фармации / Г.К. Зиятдинова, А.М. Низамова, Г.К. Будников // *Журн. аналит. химии*. – 2010. – Т. 65, № 11. – С. 1202 – 1206.

141. Шарафутдинова Е.Н. Потенциометрия в исследовании антиоксидантной активности объектов растительного происхождения: автореф. дис. ... канд. хим. наук / Е.Н. Шарафутдинова. – Екатеринбург, 2007. – 24 с.
142. Представление результатов химического анализа. (Рекомендации IUPAC 1994 г.) // Журн. аналит. химии. – 1998. – Т. 53, № 9. – С. 999 – 1008.
143. ГОСТ Р 8.736–2011. Государственная система обеспечения единства измерений. Измерения прямые многократные. Методы обработки результатов измерений. Основные положения. введ. 2013-01-01. – М. : Стандартинформ, 2013. – 18 с.
144. Bartoszek M. A comparison of antioxidative capacities of fruit juices, drinks and nectars, as determined by EPR and UV–vis spectroscopies / M. Bartoszek, J. Polak // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – Vol. 153. – P. 546 – 549. DOI: 1–2016.0.1016/j.saa.2015.09.022
145. Брыкина Г. Д. Твердофазная спектрофотометрия / Г. Д. Брыкина, Л. С. Крысина, В. М. Иванов // Журн. аналит. химии. – 1988. – Т. 43, № 9. – С. 1547 – 1560.
146. De La Guardia M. *Handbook of Green Analytical Chemistry* / M. De La Guardia, S. Garrigues. – United Kingdom: John Wiley & Sons, 2012. – 519 p.