



УДК 57.014

**Н. Ю. Чупахина, Т. Тынутаре, У. Моор****СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ АНАЛИЗА  
СУММАРНОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ**

Исследованы пять сортов яблок Прибалтийского региона двумя разными аналитическими методами. Показано, что значения показателей суммарной антиоксидантной активности, полученные с использованием спектрофотометрического и амперометрического методов, сравнимы между собой. Установлена зависимость общего содержания антиоксидантов в яблоках, яблочной мезге и соке от сорта. Одновременно определено содержание аскорбиновой кислоты и фенольных соединений в следующих сортах яблок: Куликовское, Ветеран, Антоновка, Малиновое и Talvenauding.

*Five varieties of apples from the Baltic region were studied by means of two different analytical methods. The results of experiment demonstrate that the values of total antioxidant activity obtained through spectrophotometric and amperometric methods are comparable. The authors determined the relation between the total content of ascorbic acid and phenolic compounds in apples, pulp, and juice of the variety.*

**Ключевые слова:** яблоки, антиоксидантная активность, аскорбиновая кислота, фенольные соединения, методы анализа.

**Key words:** apples, antioxidant activity, ascorbic acid, phenolic compounds, amperometric method, DPPH method.

**Введение**

Практически во всех живых организмах в процесс жизнедеятельности включаются окислительно-восстановительные реакции. При этом образуются активированные производные молекулярного кислорода или активные формы кислорода, которые участвуют в реакциях свободнорадикального окисления, в том числе и перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Избыточное накопление активных форм кислорода вызывает нарушение нормального функционирования систем антиоксидантной защиты, что способствует усиленному окислительному повреждению и химической модификации биомолекул и приводит к развитию дисфункции клеток и тканей организма.

Известно, что увеличение активности процессов свободнорадикального окисления в живом организме служит причиной нарушения структуры и свойств липидных мембран. Вследствие этого возникает прямая связь между избыточным содержанием свободных радикалов в организме и возникновением опасных заболеваний [1].

Антиоксиданты относятся к классу биологически активных веществ, которые связывают излишние свободные радикалы, препятствуют ускоренному окислению липидов и образованию нежелательных продуктов



окисления. К высокомолекулярным антиоксидантам относят мембраносвязанные и цитозольные ферменты (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионзависимые пероксидазы и трансферазы). Низкомолекулярные антиоксиданты разделяют на жирорастворимые (токоферолы, каротиноиды, убихинон) и водорастворимые (аскорбиновая кислота, глутатион, тиоредоксин, билирубин и др.). Отдельной группой следует считать фенольные соединения, в основу классификации которых положен биогенетический принцип [2]. Согласно современным представлениям, простейшими среди них являются оксибензойные кислоты и их производные, состоящие из ароматического (фенольного) ядра и одноуглеродной боковой цепи. При усложнении биосинтетической последовательности образуются фенольные соединения, включающие ароматическое ядро и трехуглеродную боковую цепь, а обширную группу соединений, в которые входят два ароматических ядра, соединенных между собой трехуглеродным фрагментом, составляют флавоноиды. В зависимости от степени окисления трехуглеродного фрагмента их подразделяют на десять основных подгрупп: катехины, антоцианы, лейкоантоцианы, флавоны, флавононы, флавонолы, флавононолы, ауруны, халконы и дигидрохалконы. Несмотря на сходство строения, группы флавоноидов значительно различаются друг от друга по химическим свойствам и биологической активности, а следовательно, и по выполняемым ими функциям в растении. Важное свойство растительных полифенолов — это их антиоксидантное действие. Его объясняют связыванием ионов тяжелых металлов, служащих катализаторами окислительных процессов, и взаимодействием с высокоактивными свободными радикалами, которые возникают при аутооксидации. Благодаря этому фенольные соединения способны гасить цепные свободнорадикальные процессы [2].

Важность выполняемых функций антиоксидантами привлекает внимание исследователей к анализу их количественного содержания. С целью определения суммарной антиоксидантной активности (АА) используются, например, амперометрические [3] и спектрофотометрические [4] методы. Насколько сравнимые результаты они дают, проверялось нами на примере изучения АА пяти сортов яблок урожая 2010 г., выращенных в Эстонии: Куликовского, Ветерана, Антоновки, Малинового и Talvenauding. Анализ проводился одновременно в лаборатории природных антиоксидантов Балтийского федерального университета им. И. Канта в Калининграде (Россия) и лаборатории факультета почвоведения и агрохимии Эстонского университета естественных наук в Тарту (Эстония) в ноябре 2010 г. Эксперимент по оценке антиоксидантной активности яблочной мякоти и сока был поставлен только в Калининграде, а по определению содержания аскорбиновой кислоты (АК) и суммарного содержания фенольных соединений — только в Эстонии. Пробные образцы яблок отбирались среднего размера из килограмма, для анализа вырезали сегмент, равный 1/8 от плода. Образец гомогенизировали, и из гомогената брали необходимую навеску для анализа суммарной АА яблок и содержания аскорбиновой кислоты. Для оценки АА мякоти и сока гомогенат центрифугировали, а навеску брали отдельно из осадка и надосадочной жидкости.



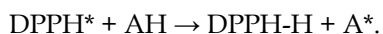
Содержание водорастворимых антиоксидантов в Калининграде определяли амперометрически по авторской методике Я.И. Яшина на приборе «Цвет Яуза-01-АА», предназначенном для прямого количественного измерения содержания антиоксидантов в биологических объектах ТУ МЕКВ. 414538.001. Прибор разработан и запатентован в НПО «Химвавтоматика» (Москва, Россия). Способ включает подготовку проб анализируемого и стандартного веществ, их электрохимическое окисление путем непосредственной поочередной подачи подготовленных доз в термостатируемую электрохимическую ячейку амперометрического детектора с получением сигналов в виде соответствующих импульсов электрического тока, усиление сигналов, регистрацию в виде выходных кривых и расчет площадей полученных пиков анализируемого (S) и стандартного (S<sub>ст</sub>) веществ, при этом расчет показателя антиоксидантной активности осуществляют по формуле

$$AA = \frac{S_a m_c P n}{S_c V_c}$$

где S<sub>a</sub> – площадь пика анализируемого препарата; S<sub>c</sub> – площадь пика стандарта; m<sub>c</sub> – навеска стандарта; V<sub>c</sub> – объем раствора стандарта, мл; P – чистота используемого стандарта, %; n – разбавление анализируемого препарата.

Анализируемые пробы подготавливают путем смешения соответствующих веществ с растворителем, не обладающим антиоксидантной способностью. Способ предусматривает в качестве стандартного вещества кверцетин с редокс-потенциалом кверцетина = 0,3 В. Редокс-потенциал дигидрокверцетина = 0,5 В. Редокс-потенциал рутина = 0,6 В. Используя стандартное вещество, можно достаточно точно определить редокс-потенциал любых многокомпонентных препаратов, имеющих еще большее различие в антиокислительной активности. Предложенный способ применим к исследуемым объектам в жидком состоянии. Твердые вещества перед анализом переводят в жидкие формы. Методика обеспечивает выполнение измерений содержания антиоксидантов исследуемого образца с погрешностью, не превышающей 5 % во всем диапазоне измеряемых величин при доверительной вероятности 0,95 [3].

В Эстонии антиоксидантный потенциал определяли по методу DPPH. Аббревиатура названия метода повторяет название радикала дифенилпикрилгидразила – **diphenylpicrylhydrazyl** – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>, M = 394,33), растворенного в метаноле, который реагирует с образцом антиоксиданта (АН) по схеме



В результате восстановления DPPH антиоксидантом снижается пурпурно-синяя окраска DPPH в метаноле, а реакция контролируется по изменению оптической плотности при 514 нм обычными методами спектрофотометрии. Значение результатов выражено через значения параметров EC<sub>50</sub> – концентрации анализируемых экстрактов, при которой происходит 50%-ное ингибирование свободного радикала DPPH.

Определение аскорбиновой кислоты и суммарного содержания фенольных соединений проводили по стандартным методикам [4; 5]. Со-



держание фенолов оценивали как эквивалент галловой кислоты ( $C_7H_6O_5$ ) – «Gallic acid equivalents» (GAE) [4].

### Результаты и обсуждение

Антиоксидантная активность яблок, определенная обоими методами, продемонстрировала зависимость оцениваемого параметра от сорта (табл. 1). Куликовское и Малиновое характеризовались максимальной общей антиоксидантной активностью при использовании амперометрического метода и DPPH. Минимальное количество антиоксидантов содержалось в яблоках сортов Антоновка и Talvenauding. При этом разница между максимальными и минимальными значениями составляла около 80 % в обоих случаях, что позволяет говорить о сравнимости экспериментальных данных, полученных при использовании двух разных методов исследования.

Таблица 1

#### Антиоксидантная активность яблок различных сортов, мг/мл

Сорт	Метод анализа АА	
	Амперометрический, АА	DPPH, EC <sub>50</sub>
Куликовское	1,04 ± 0,29	1,88
Малиновое	1,10 ± 0,31	2,57
Ветеран	0,80 ± 0,22	4,14
Антоновка	0,235 ± 0,065	6,25
Talvenauding	0,225 ± 0,06	9,04

Анализируемые сорта яблок распределились в следующем порядке убывания общей антиоксидантной активности: Куликовское, Малиновое, Ветеран, Антоновка и Talvenauding.

Содержание антиоксидантов в соке и мезге также различалось в зависимости от сорта яблок (табл. 2). Большим содержанием антиоксидантов обладала мезга сортов Куликовское, Малиновое и Talvenauding, а меньшим – Антоновка и Ветеран.

Падение антиоксидантной активности сока было отмечено в том же порядке, что и общей АА яблок – Куликовское, Малиновое, Ветеран, Антоновка и Talvenauding. Отдельно следует отметить последний сорт, у которого АА мезги была намного выше общей антиоксидантной активности не только сока, но и яблока в целом.

Таблица 2

#### Антиоксидантная активность яблочных сока и мезги, мг/мл

Сорт яблок	Мезга	Сок
Куликовское	0,69 ± 0,08	0,34 ± 0,09
Малиновое	0,73 ± 0,14	0,36 ± 0,1
Talvenauding	0,61 ± 0,18	0,13 ± 0,04
Ветеран	0,47 ± 0,05	0,355 ± 0,09
Антоновка	0,27 ± 0,07	0,235 ± 0,065



В ходе исследования антиоксидантной активности яблочной мезги и яблочного сока было установлено, что содержание антиоксидантов в мезге превышает содержание антиоксидантов в соке у всех сортов яблок без исключения (табл. 2). Наибольшими перепадами в показателях отличались сорта Куликовское и Talvenauding, у которых содержание АА в мезге было на 49 и 78 % больше, чем в соке.

Таблица 3

**Содержание аскорбиновой кислоты и фенольных соединений  
в яблоках различных сортов**

Сорт	Аскорбиновая кислота, мг/100 г	Фенольные соединения, GAE/100 г
Куликовское	16,6	199
Ветеран	9,1	172,1
Антоновка	8,4	127,9
Talvenauding	6,0	140,7
Малиновое	2,4	184,3

73

Максимальное содержание аскорбиновой кислоты было выявлено в яблоках сорта Куликовское, характеризующихся высокой антиоксидантной активностью (табл. 3), что позволяет предположить ключевую роль аскорбиновой кислоты в формировании антиоксидантной активности этого сорта яблок. Однако такая закономерность не общая, так как яблоки сорта Малиновое содержали минимальное количество аскорбиновой кислоты, характеризуясь при этом высокой общей антиоксидантной активностью. Таким образом, можно сказать, что содержание аскорбиновой кислоты – также сортовой признак, но общего строгого соответствия между содержанием АК и общей АА яблок отмечено не было.

*Фенольные соединения* – один из наиболее распространенных и многочисленных классов природных соединений, обладающих биологической активностью. В нашем исследовании определялась суммарная активность фенольных соединений, анализ которой позволяет говорить о достоверной сортовой разнице в содержании фенолов среди анализируемых образцов (табл. 3). Максимальным содержанием фенольных соединений характеризовались сорта Куликовское и Малиновое, а минимальным – Антоновка, что свидетельствует о ключевой роли фенолов в формировании общей антиоксидантной активности яблок сорта Малиновое.

Таким образом, проведенные исследования позволяют сделать следующие выводы:

1) использование амперометрического метода исследования антиоксидантов по авторской методике Я. И. Яшина на приборе «Цвет Яуза-01-АА» и метода определения антиоксидантов DPPH позволяет получать результаты, сравнимые между собой;

2) содержание антиоксидантов в яблоках, мезге, соке и количество аскорбиновой кислоты в яблоках зависит от их сорта;

3) анализ АА в пяти анализируемых сортах яблок Прибалтийского региона демонстрирует ее падение в следующем порядке: Куликовское, Малиновое, Ветеран, Антоновка, Talvenauding;



- 4) содержание антиоксидантов в яблочной мезге превышает содержание антиоксидантов в яблочном соке;
- 5) количество аскорбиновой кислоты не является определяющим при оценке общей антиоксидантной активности яблок;
- 6) суммарное содержание фенольных соединений имело решающее значение при оценке общей антиоксидантной активности яблок анализируемых сортов.

### Список литературы

1. Зюзина А.В., Макарова Н.В. Восстановительный потенциал яблок // Качество продукции, технологий и образования : матер. V Всерос. науч.-практ. конф. Магнитогорск, 2010.
2. Саламатов А.А. Разработка комплексной технологии биологически активных веществ из шрота яблок и лекарственных форм на их основе : дис. ... канд. фармацевт. наук. Курск, 2009.
3. Яшин Я.И., Рыжнев В.Ю., Яшин А.Я., Черноусова Н.И. Природные антиоксиданты. Содержание в пищевых продуктах и их влияние на здоровье и старение человека. М., 2009.
4. Tõnutare T., Moor U., Mölder K., Põldma P. Fruit composition of organically and conventionally cultivated strawberry 'Polka' // Agronomy research. 2009. № 7. P. 755–760.
5. Банташ В.Г. Формирование пектинового и фенольного комплексов яблок в условиях интенсивной культуры и обработки кальцием в связи с качеством плодов : дис. ... канд. биол. наук. Кишинёв, 1984.

### Об авторах

- Наталья Юрьевна Чухакина – канд. биол. наук, доц., Балтийский федеральный университет им. И. Канта.  
E-mail: Natalie-tch@yandex.ru
- Ульви Моор – канд. биол. наук, доц., Эстонский университет естественных наук.  
E-mail: ulvi.moor@emu.ee.
- Тыну Тынутааре – канд. хим. наук, Эстонский университет естественных наук.  
E-mail: tonu.tonutare@gmail.com

### About authors

- Dr Nataliya Chupakhina, Associate Professor, I. Kant Baltic Federal University.  
E-mail: Natalie-tch@yandex.ru
- Dr Ulvi Moor, Associate Professor, Estonian University of Life Sciences.  
E-mail: ulvi.moor@emu.ee
- Dr Tõnu Tõnutare, Estonian University of Life Sciences.  
E-mail: tonu.tonutare@gmail.com