



для цукрової та крохмалепатокової промисловості. Базові показники якості». За стандартом напрацювання на відмову, наприклад, дифузійних апаратів колонного і похилого типу відповідно повинна бути не менше 720 і 960 годин. Для багатьох видів устаткування, у тому числі для дифузійних апаратів, ошпарю-

вачів, випарних станцій і вакуумних апаратів, самі вимоги стандарту з напрацювання на відмову нижче рівня, який міг би задовольнити безперервне цукробурякове виробництво. Є підстави вважати, що для обладнання цукрових заводів напрацювання на відмову основного обладнання повинно бути не менше 2500-3000 годин, тобто повинно відповідати або перевищувати тривалість виробничого сезону.

Література

1. **Кіндрачук М.В., Лабунець В.Ф., Пашечко М.І., Корбут Є.В.** Трибологія. – К.: Вид-во Нац. авіац. ун-ту «НАУ-друк», 2009. – 392с.
2. **Сухенко Ю.Г., Литвиненко О.А., Сухенко В.Ю.** Надійність і довговічність устаткування харчових і переробних виробництв. – К.: НУХТ, 2010. – 547с.
3. **Прейс Г.А., Сологуб Н.А., Некоз А.И.** Повышение износостойкости оборудования пищевой промышленности. – М.: Машиностроение, 1979. – 208с.
4. **Сухенко Ю.Г., Некоз О.І., Стечишин М.С.** Технологічні методи забезпечення довговічності обладнання харчової промисловості. – Київ: Елерон, 1993. – 108с.

УДК: 678.078+664.68

Хроматографія і ЕПР спектроскопія для оцінки антиоксидантної активності природних сполук

М. ПОЛУМБРИК, канд. техн. наук

Х. ОМЕЛЬЧЕНКО, ст. викладач

О. ПОЛУМБРИК, докт. хім. наук

Національний університет харчових технологій

Л. БАЛЬ-ПРИЛИПКО, докт. техн. наук

**Національний університет біоресурсів
та природокористування**

Анотація. В огляді наведено аналіз публікацій та власних досліджень щодо сучасних методів визначення антиоксидантної активності природних сполук, харчових продуктів, напоїв, екстрактів ягід, овочів і фруктів, лікарських трав, харчових волокон, ефірних масел пряних рослин тощо, а саме хроматографічних, мас-спектрометричних і ЕПР. За їх допомогою в багатьох випадках можливо ідентифікувати вільні радикали, що викликають окиснення, а також індивідуальні антиоксиданти, визначити їх концентрацію. Отримані дані дають змогу встановити детальний механізм реакції окиснення харчових продуктів, біологічних об'єктів і запропонувати шляхи подолання цього негативного процесу.

Ключові слова: природні антиоксиданти, вільні радикали, механізм дії, спінові пастки, ЕПР.

Методи дослідження антиоксидантної активності природних сполук, розглянуті раніше [1], допомагають визначити їх сумарну дію без ідентифікації невідомих антиоксидантів, що входять до їх складу.

Метою роботи є аналіз сучасних методів дослідження антиоксидантної активності природних сполук – хроматографічних, мас- і ЕПР спектроскопії.

Ці методи дослідження допомагають у багатьох випадках ідентифікувати антиоксиданти природних сполук і харчових продуктів, визначити їх концентрацію і активність, а також прояснити природу вільних радикалів, що спричиняють процес окиснення.

У даний час для визначення ЗАЕ (загальна антиоксидантна ємність) (*total antioxidant capacity*) широко застосовують методи високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Цей метод є одним із найбільш ефективних для поділу складних сумішей речовин і ґрунтується на різній здатності до сорбції їх компонентів. При цьому відбувається багаторазове повторення актів сорбції-десорбції, що є характерною особливістю хроматографічного процесу і зумовлює ефективність хроматографічного розділення. Оскільки ідентифікувати можна лише відомі сполуки, метод передбачає роботу із стандартами.

Одними з перших методів поділу та ідентифікації фенольних сполук були методи тонкошарової та флеш-хроматографії, що відрізняються простотою і дешевизною.

Для реєстрації використовують різні типи детекторів: діод-матричний, спектрофотометричний, ультрафіолетовий, оборотнофазовий, електрохімічний.

Великого поширення для встановлення та ідентифікації фенольних сполук в харчових продуктах і рослинній сировині отримав метод ВЕРХ з мас-спектрометричним детектуванням, що допомагає визначати вміст фенолів в дуже малих кількостях.

Мас-спектроскопія є аналітичним методом дослідження сполук, заснованим на визначенні відношення маси до заряду іонів, що утворюються при іонізації певних компонентів проби. Один з найпотужніших способів якісної ідентифікації речовин, що допускає також і кількісне визначення. Зараз широко застосовується хроматомас-спектроскопія, що передбачає поділ суміші у хроматографі, а детектування компонентів — за допомогою мас-спектрометра. Це дозволяє збільшити точність хроматографічного визначення на кілька порядків.

Метод ВЕРХ успішно застосовують для визначення антоціанів, беталаїну, каротиноїдів і хлорофілу, куркуміну, гемоглобіну і міоглобіну, які є широко розповсюдженими природними пігментами, що забезпечують колір їжі. Вони можуть бути використані як у якості безпечних замінників синтетичних барвників, так і біологічно активних сполук для профілактики різних хронічних захворювань [2].

Хроматографічні методи відрізняються високою селективністю сорбентів, чутливістю застосовуваних детекторів у температурних умовах, що не спричиняють розклад аналізованих сполук.

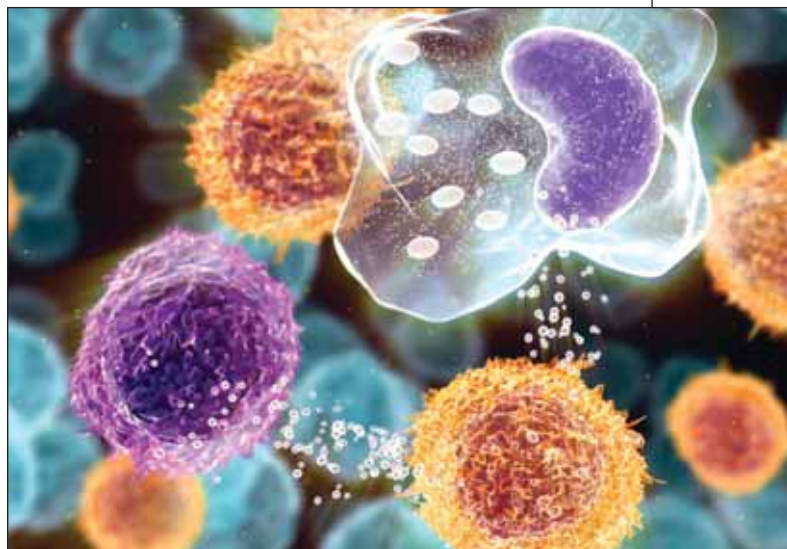
Ідентифікація компонентів заснована на застосуванні стандартних зразків з вже відомою концентрацією. Водночас, зважаючи на величезну кількість різних форм природних сполук, виникають складнощі через відсутність необхідних стандартів.

Індивідуальне визначення компонентів певного класу поліфенолів у пиві, проведене за допомогою високоефективної рідинної хроматографії з використанням діодної матриці, або електрохімічного детектування, що більш ефективне, ніж газова хроматографія, люмінесцентний аналіз, електрофорез і біосенсиори [3].

Визначення фенольних сполук в листі гуави різних сортів (*pomifera* і *pyrifera*) здійснювалося з використанням ВЕРХ, а антиоксидантну активність спиртових екстрактів визначали методами TEAC (*trolox equivalent antioxidant capacity*) і FRAP (*ferric reducing antioxidant power*) [4]. Показано, що найбільша кількість фенольних сполук в екстракті знайдено в суміші C_2H_5OH / H_2O у співвідношенні 10:20 (об'ємних.). У гуави сорту *pyrifera* виявилася більш висока концентрація фенольних сполук і антиоксидантна здатність. [5].

За допомогою поєднання газової хроматографії і мас-спектрометрії (МС) досліджено активність трьох синтетичних фенольних антиоксидантів: БГА (трет-бутил гідроанізол), БГТ (трет-бутил гідротолуол) і трет-бутил гідрокінон (ТБГ) в різних зразках рослинної олії. Кількісне визначення проводили з використанням у якості внутрішнього стандарту карвакрола, який забезпечує межі визначення антиоксиданту від 0,08 до 0,10 нг/г, залежно від сполуки. Найкращі результати показав БГТ [5].

Методом рідинної хроматографії з діодноматричним детектором і електророзпилюючою іонізацією спільно з мас-спектроскопією було ідентифіковано 37 фенольних сполук і два пуринових алкалоїди у зразках чорного чаю [6]. Виявлено значні кількості галової кислоти, (–) – епікатехінгалату, кверцетину, 3-О-галактозилрамнозилглікозиду, флавіни та інші сполуки. Зроб-



лено висновок про те, що чорний чай — багате джерело харчових антиоксидантних фенольних сполук і їх вміст зростає при підвищенні часу настоювання чаю [6].

Розроблено три аналітичні методики визначення хімічних форм Se (селенометіоніна, селеноцистину, селеніту і селената): аніонообмінна хроматографія, ексклюзійна хроматографія в поєднанні з МС і зворотньо-фазова хроматографія з МС з електрохімічною іонізацією. Проведено порівняння одержаних даних, рівень визначення Se при оптимальних умовах становить 1,5-2,0; 3,2-28,0 і 50,0-150,2 нг/мл, відповідно.

Встановлено, що перші два методи більш селек-

одного з бразильських видів мірціарії (*Myrciaria dubia*) [10]. Водна фракція кукурудзи багата антоціанінами, а етилацетатна містила фенольні кислоти і флавоноїди. Головним каротиноїдом плодів мірціарії був трансглютеїн, який становив 45-55% від усієї кількості каротиноїдів [10].

Розроблено хроматографічний метод одночасного визначення креатиніну, сечової і аскорбінової кислоти в коров'ячому молоці і апельсиновому соку. Зразки молока піддають попередній обробці шляхом осадження білка, центрифугування і фільтрації з подальшим розділенням ВЕРХ і кількісній оцінці антиоксидантної активності.

Встановлено, що зразки молока містять сечову кислоту і креатинін в діапазоні концентрацій від 24.1-86.0 і 5,07-11,2 мкг/мл відповідно, тоді як апельсиновий сік містив аскорбінової кислоти — 212 мкг/мл [11].

Методи титрування широко застосовують в аналізі компонентів харчових продуктів. Титриметричний метод кількісного аналізу ґрунтується на вимірюванні об'ємів розчинів реагуючих речовин, концентрація однієї з яких точно відома. Проведено оціночний аналіз двох методів вилучення вітаміну С з тропічних фруктів (банану, папайї, манго (на трьох стадіях стиглості) і ананасу) [12].

Для виявлення аскорбінової кислоти ці методи використовують іонно-парну рідинну хроматографію (РХ), але відрізняються приготуванням зразка (екстракція 3% метафосфорною кислотою — 8% оцтовою кислотою, або 0,1% щавлевою кислотою). Результати підтверджені шляхом порівняння з визначенням вмісту аскорбінової кислоти титриметричним офіційним методом стандарту. Виявлено відмінності в ефективності екстракції вітаміну С, пов'язаною з фруктовією матрицею, особливо на стадії стиглості в клімактеричних плодах.

Метод РХ-екстракції з використанням 3% метафосфорної кислоти — 8% оцтової кислоти дає більш високі середні ступені вилучення для всіх матриць, в той час як метод РХ-екстракції з 0,1% щавлевою кислотою виявився неприйнятним у деяких випадках (незрілий, недозрілий банан і спілі манго). Межа виявлення (0,1 мг/л) аскорбінової кислоти для випадку з метафосфорною кислотою і оцтовою кислотою дозволяє використовувати цей метод в якості аналітичного [12].

Антиокислювальна активність спиртових екстрактів з листя м'яти, коренеплодів моркви і листя моринги олійної (*Moringa oleifera*) оцінена вимірюванням кількості малонового альдегіду, утвореного при окисненні ліноленої кислоти, ініційованого сульфатом заліза (II), а також мірою окиснення соняшникової олії на основі визначення кількості похідних ТБК (тіобарбітурової кислоти). Вивчено вплив рН середовища, температури і умов зберігання екстрактів на їх ЗАЕ. Так, активність екстрактів м'яти і моркви була вищою при рН 9, ніж при рН 4, тоді як екстракт листя моринги відрізнявся високою активністю при обох значеннях рН. Одержані дані свідчать про те, що анти- і прооксидативні властивості екстрактів рослин залежать від методів обробки і умов ініціювання реакції. Необхідно

тивні для ідентифікації селеноамінокислот, третій метод гірше підходить для поділу всіх хімічних форм Se, але допомагає ідентифікувати хімічні форми Se в харчових продуктах [7].

Утворення різних гетероциклічних амінів, знайдених у маринованій їжі і маринаді, вивчено методом ВЕРХ з фотодіодним детектором. Кількість таких амінів зростала зі збільшенням часу нагрівання (1-32 години) при $98 \pm 2^\circ\text{C}$. Вітаміни С, Е, а також БГТ мало ефективні як інгібітори утворення таких амінів [8].

Для ідентифікації природних антиоксидантів застосовують також метод «відбитку пальців» [9], заснований на тому, що для кожного виду рослин характерний вміст у певних кількостях і поєднаннях фенольних сполук. Цей метод дає змогу визначати джерела походження рослинної сировини і, отже, запобігти фальсифікації.

Вивчено фізико-хімічні властивості і антиоксидантний потенціал насіння *Brassica oleracea* (капусти «tranchuda»). Хроматографічними і МС методами виділені і кількісно визначені 13 фенольних сполук. Методом ВЕРХ з УФ-детектуванням виміряно вміст аконітової, лимонної, аскорбінової, малонової, шкимої та інших жирних кислот, досліджено антиокислювальну активність екстракту з насіння залежно від його концентрації [1].

Методом ВЕРХ з використанням діодного детектора визначені фенольні сполуки пурпурової кукурудзи (*Zea mays L.*) з району Анд і склад каротиноїдів плодів



застосовувати відповідне обладнання і створити оптимальні технологічні умови, що впливають на активність і біодоступність природних антиоксидантів для їх використання в харчових продуктах і біологічних системах [1].

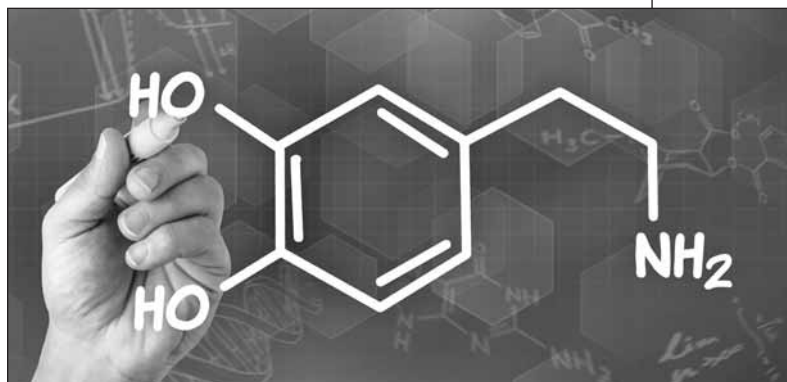
Запропонована методика визначення загального вмісту сполук Se, неорганічних Se (IV) і Se (VI) і селенометіоніну в дріжджах і пшеничному борошні за допомогою методу ізотопного розбавлення і квадрупольної мас-спектрометрії з індуктивно зв'язаною плазмою і октаполусною реакційною системою. Різні сорти квітів використовуються в якості інгредієнтів для приготування їжі, зокрема для зміни смакових і поживних властивостей, підвищення її якості та безпеки. До таких рослин відноситься фіалка триколірна, що має цінні біологічні властивості, в основному, за рахунок наявності великої кількості флавоноїдів.

За допомогою методу ВЕРХ-МС проведено аналіз вмісту фенольних сполук і антоціанінів. Антиоксидантна активність водно-метанольних екстрактів фіалки визначена методом ДФПГ, (β -каротин / лінолеат), а також біохімічним аналізом [13]. Вивчено вплив різних доз опромінення γ -променями і потоком електронів на антиоксидантні властивості фіалки. Опромінення (1 кГр) призводить до підвищення ЗАЕ. Варіюючи дози опромінення, можна досягти збільшення кількості фенольних сполук, а також стійкості розчинів фіалки триколірної з метою використання їх у функціональній їжі [13].

Антиоксидантні властивості α -токоферолу, тролокса, аскорбінової кислоти і аскорбілпальмітату при концентрації 0,01, 0,1 і 1,0 мМ рибофлавіну в його фотосенсибілізованій водно-жировій емульсії визначали з використанням зменшення вмісту кисню в пароповітряному просторі (*headspace analysis*), оцінкою кількості гідропероксидів ліпідів, а також аналізом летких сполук [14]. Через 32 год опромінення видимим світлом вміст кисню в пароповітряному просторі емульсії без антиоксидантів, з додаванням α -токоферолу, тролокса, аскорбінової кислоти і аскорбілпальмітату знизився до 18,50%, 18,85%, 16,01%, 17,92% і 19,88%, відповідно, в той час як ці зразки в темряві містили 20,74% кисню. Тролокс і аскорбінова кислота виступили в якості прооксидантів, тоді як їх ліпофільні аналоги, α -токоферол і аскорбілпальмітат, відповідно, показали антиоксидантні властивості в концентрації 1,0 мМ [14].

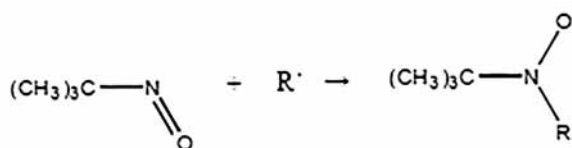
Для визначення полімерних проантоціанідинів в грушевому соку, які мають антиоксидантну активність, застосовані методи ^{13}C -ЯМР спектроскопії, мас-спектрометрії з електророзпилюючою іонізацією і часу пролітної мас-спектрометрії з іонізацією за допомогою лазерної десорбції з матриці [1].

Наші відомості про структуру молекул отримані, головним чином, шляхом аналізу молекулярних спектрів поглинання, вимірюючи ослаблення потоку електромагнітного випромінювання залежно від довжини хвилі при проходженні його через зразок. Лінії або смуги в спектрі відповідають переходам між рівнями енергії в молекулах. У більшості випадків з молекулами взаємодіє електрична компонента поля [1]. Мо-



лекули з постійним магнітним диполем будуть взаємодіяти з магнітною компонентою електромагнітного випромінювання. Резонансне поглинання випромінювання такими системами в статичному магнітному полі називають парамагнітним резонансом. Спектроскопія електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) — метод, який можна застосовувати лише для систем з ненульовим сумарним електронним спіновим моментом. До об'єктів дослідження ЕПР відносяться багато систем, зокрема вільні радикали в твердій, рідкій і газовій фазах [1]. Відмінною рисою методу ЕПР є його висока чутливість, що досягає 10-11 М. Додаткову інформацію щодо будови радикала можна одержати з інтерпретації надтонкої структури його спектра ЕПР. Кількість стабільних радикалів можна виміряти не тільки спектрофотометрично, але і ЕПР спектроскопією. Окрім ДФПГ для аналізу ЗАЕ використовувалися й інші органічні стабільні радикали — вердазили і фенокисильний радикал — гальваноксил. У даний час все більше застосовують нітрокисильні радикали, основна перевага яких — висока розчинність у воді [1].

Широкого розповсюдження набув метод ЕПР з використанням спінових пасток для захоплення вільних радикалів різної природи. Найбільш розповсюдженими є нітрокисильні сполуки, що утворюють з активними радикалами стабільні нітроксиди.



Поширеною спіновою пасткою є N-третбутил- α -фенілнітрон, що має ліпофільний характер. Його успішно використовували в якості спінової пастки для аналізу ліпідних радикалів, що утворюються при окисненні їжі [15]. Окислювальна стабільність при нагріванні рослинної оливкової олії вивчена методом ЕПР з використанням N-третбутил- α -фенілнітрона як радикальної пастки. Зроблено висновок про те, що метод ЕПР зі спіновою пасткою є дуже чутливим методом оцінки термоокислювальної стабільності рослинних олій [15].

Використання методу ЕПР і 5,5-диметил-1-піролін-N-оксиду в якості спінової пастки для гідроксильних, алкільних радикалів і супероксид радикала допомогло визначити антиоксидантну ємність хітоолігосахаридів



[17]. Ці вуглеводи розчинні у воді і мають такі важливі функціональні властивості як антиканцерогенна і анти-мікробна активність, імуностимулюючий ефект. Відзначена дуже висока активність хітоолігосахаридів по відношенню до гідроксильних радикалів і супер-оксиду, тоді як з алкільними радикалами взаємодія слабка. Знайдено, що ЗАЕ хітоолігосахаридів зростає при збільшенні їх концентрації і залежить від молекулярної маси [16].

Підбиваючи підсумки, слід відзначити перспективу використання методу ЕПР зі спіновою пасткою як простого, інформативного, швидкого і високочутливого методу визначення ЗАЕ різних сполук і харчових продуктів.

Загалом, проблематично визначити загальну ефективність антиоксиданту. Він може бути ефективний в одній системі, але абсолютно неефективний в іншій. Не існує досконалої системи, здатної встановити справжню антиоксидантну ємність як індивідуальної сполуки, так і комплексної суміші, оскільки визначення антиоксидантної активності дуже залежить від умов тестової системи.

Як зазначалося вище, існує безліч шляхів генерування вільних радикалів, різноманітні механізми їх реакцій, багато факторів впливають на них, наприклад, концентрація антиоксиданту, так що в одному випадку він проявляє антиоксидантні властивості, а в іншому — прооксидантні. Таким чином, величини ЗАЕ певних сполук і їх сумішей, одержані в різних лабораторіях різними методами, є відносними і важкими для порівняння між собою.

З огляду на різноманіття механізмів утворення вільних радикалів у процесі окиснення, необхідно застосовувати антиоксиданти різних класів для збільшення ефективності їх дії. При цьому виникає проблема їх взаємодії між собою (адитивність, синергізм, антагонізм) і з продуктами реакції, які утворюються.

Висновки і перспективи. Найбільш досконалі сучасні методи дослідження антиоксидантної активності

природних сполук є хроматомас-спектрометричні методи, мас-спектрометричний з індуктивно зв'язаною плазмою і особливо метод ЕПР з використанням спінових пасток. Вони швидкі, інформативні і високочутливі у визначенні ЗАЕ різних сполук і харчових продуктів. І у багатьох випадках дають змогу ідентифікувати, як індивідуальні антиоксиданти, так і вільні радикали, що викликають процес окиснення. Визначення детального механізму реакції окиснення відкриває шляхи до подолання цього негативного процесу, як у харчових продуктах, так і у біологічних об'єктах.

Література

1. **Полумбрик М.О.** Природные антиоксиданты пищевых продуктов [Текст] / М.О. Полумбрик, З.В. Ловкис, В.В. Литвяк, И.М. Почичкая, Л.В. Баль-Прилипко. Минск: Изд-во Минфина, 2017. – 158 с.
2. *Encyclopedia of food and health.* Edited by Caballero B., Finglas P., Toldra F. 2015. N.Y.: Academic Press. 4006 p.
3. *Processing and impact on antioxidants in beverages.* Edited by V.Preedy. 2014. N.Y.: Academic Press. 336 p.
4. de Cerio E.D., Gomez-Caravaca A.M., Verardo V. et.al. Determination of guava (*Psidium guajava* L.) leaf phenolic-compounds using HPLC-DAD-QTOF-MS // *J. Funct. Foods.* 2016. v. 22, p. 376-388.
5. **Cacho J.I., Campillo N., Vinas P.** et.al. Determination of synthetic phenolic antioxidants in edible oils using microvial insert large volume injection gas-chromatography // *Food Chem.* 2016. v. 200, p. 249-254.
6. **Kelebek H.** LC- DAD-ESI-MS/MS characterization of phenolic constituents in Turkish black tea: effect of infusion time and temperature // *Food Chem.* 2016. v. 204, p. 227-238.
7. **Polec-Pawlak K., Ruzik D., Makowska I.** et.al. Determination of selenium species in food by liquid chromatography coupled to mass spectrometry // *Chem. Anal.* 2005. v. 50, p. 249-263.
8. **Lan C. M., Kao T. H., Chen B.H.** Effects of heating time and antioxidants on the formation of heterocyclic amines in marinated foods // *J. Chromatogr. B.* 2004. v. 802, p. 27-37.
9. Drasar P., Moravcova J. Recent advances in analysis of Chinese medical plants and traditional medicines // *J. Chromatogr. B.* 2004. v. 812, p. 3-21
10. **Zanatta C.F., Mercadante A.Z.** Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*) // *Food Chem/* 2007. v. 101, p. 1526-1532.
11. **Zuoa R., Zhoua S., Zuoa Y.** et.al. Determination of creatinine, uric and ascorbic acid in bovine milk and orange luice by hydrophilic interaction HPLC // *Food Chem.* 2015. v. 182, p. 242-245.
12. **Hernandez Y., Lobo G., Gonzalez M.** Determination of vitamin C in tropical fruits: a comparative evaluation of methods // *Food Chem.* 2006. v. 96, p. 654-664.
13. **Koike A., Barreira J., Barros L.** et.al. Edible flowers of *Viola tricolor* L. as a new functional food: antioxidant activity, individual phenolics and effects of gamma and electronbeam irradiation // *Food Chem.* 2015. v. 179, p.6-14.
14. **Kimb T.S., Deckerc E.A., Lee J.H.** Antioxidant capacities of α -tocopherol, trolox, ascorbic acid, and ascorbyl palmitate in riboflavin photosensitized oil-in-water emulsions // *Food Chem.* 2012. v. 133, p. 68-75.
15. **Thomsen M.K., Kristensen D., Skibsted L.H.** Electron spin resonance spectroscopy for determination of the oxidative stability of food lipids // *J.Am. Chem. Oil Soc.* 2000. v. 77, p. 725-730.
16. **Park P.J., Je J.Y., Kim S.K.** Free radical scavenging activity of chitooligosaccharides by electron spin resonance spectrometry // *J. Agric. Food Chem.* 2003. v. 51, p. 4624-4627.