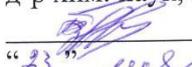


МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«Кубанский государственный университет»
(ФГБОУ ВО «КубГУ»)**

**Факультет химии и высоких технологий
Кафедра аналитической химии**

Допустить к защите
Заведующий кафедрой
д-р хим. наук, проф.
 З.А. Темердашев
«23»  2019 г.

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
(БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА)**

**МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ АТТЕСТАЦИЯ ЭКСПРЕСС-МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ МЕТОДОМ
FRAP С ПРИМЕНЕНИЕМ ИНДИКАТОРНОЙ СИСТЕМЫ FE(III) – 2,2-
ДИПИРИДИЛ**

Работу выполнила  А. Н. Бухта

Направление подготовки 27.03.01 – Стандартизация и метрология

Направленность (профиль) Стандартизация и сертификация

Научный руководитель,
канд. хим. наук, доц.  О. Б. Воронова

Нормоконтролер
канд. хим. наук, доц.  О. Б. Воронова

Краснодар
2019

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
1 Аналитический обзор	4
1.1 Антиоксиданты, их характеристика и область применения	4
1.1.1 Антиоксиданты как источник физиологической ценности продукта	4
1.1.2 Виды биологических антиоксидантов.....	4
1.1.3 Антиоксиданты в пищевых продуктах	6
1.2 Методы исследования антиоксидантов	8
1.2.1 Классификация методов исследования антиоксидантов.....	8
1.2.2 Общая характеристика методов определения антиоксидантной активности	9
1.2.3 Методы определения антиоксидантов фенольного типа	10
1.3 FRAP – метод определения антиоксидантной активности.....	14
1.4 Аттестация методик выполнения измерений.....	17
1.4.1 Понятие МВИ и ее виды	17
1.4.2 Цели проведения аттестации МВИ и требования, предъявляемые к ней.....	18
1.4.3 Особенности аттестации методик количественного химического анализа.....	20
2 Экспериментальная часть	27
2.1 Исходные реактивы, материалы и используемая аппаратура	27
2.2 Приготовление растворов	27
2.3 Построение градуировочных графиков	28
2.4 Подготовка проб к анализу	29
2.5 Определение антиоксидантной активности пищевых продуктов.....	30
Заключение.....	42
Список использованных источников.....	43
Приложение А.....	50
Приложение Б	52

ВВЕДЕНИЕ

На современном этапе развития пищевой промышленности применяется большое количество различных видов сырья, ингредиентов и добавок при производстве пищевых продуктов. Поэтому приоритетной проблемой является обеспечение и контроль качества выпускаемой продукции. В конце 20-го века были найдены полезные свойства пищевых продуктов с точки зрения их антиокислительного влияния на организм человека и возникла проблема разработки различных методик определения АОА для контроля качества пищевых продуктов.

Количественный химический анализ подразумевает применение аттестованных средств измерения и реактивов, выбор стандартных веществ и способов обработки результатов. В настоящее время регламентированной методики определения антиоксидантной активности пищевых продуктов не существует, хотя их разработано достаточное количество.

Актуальной является разработка и аттестация методики определения АОА, которая будет обеспечивать получение достоверных результатов с заданной точностью при возможно меньших затратах времени и стоимости анализа[1, 2].

Целью данной работы является метрологическая аттестация экспресс-методики определения антиоксидантной активности пищевых продуктов методом FRAP с применением индикаторной системы Fe(III) – 2,2'-дипиридил.

Работа выполнена с использованием научного оборудования ЦКП «Эколого-аналитический центр» Кубанского государственного университета, уникальный идентификатор RFMEF 1593 17X008.

1 Аналитический обзор

1.1 Антиоксиданты, их характеристика и область применения

1.1.1 Антиоксиданты как источник физиологической ценности продукта

Антиоксиданты (АО) - это вещества, имеющие различную химическую природу. Кислород, присутствующий практически во всех продуктах в различных формах, имеет способность окислять органические соединения, превращая их в свободные радикалы, отрицательно воздействующие на организм человека. Антиоксиданты, обладая антирадикальным действием, тормозят этот процесс[3]. Существует их разновидность – биоантиоксиданты. Это соединения полифункционального характера, как в модельных смесях, так и в живом организме являются ингибиторами окислительных реакций. Их особенность в том, что антиокислительная функция различных антиоксидантов выражена в разной степени. Биоантиоксиданты играют важную роль в живом организме. Рост всех клеток и тканей обеспечивается благодаря их наличию[4, 5, 6]. В организм они попадают, находясь непосредственно в продуктах или в виде биологически активных пищевых добавок (БАД). В готовые продукты АО вводятся для увеличения сроков годности с сохранением внешнего вида, присущего свежим высококачественным продуктам. При этом АО обладают разного рода свойствами: одни бактериостатические, другие бактерицидные, а также фунгистатические и фунгицидные[7, 8]. Тем не менее, их количество строго регламентируется, поскольку поступление их в избытке в организм может иметь негативные последствия для человека, проявляющиеся в виде аллергии и дисбаланса химических веществ[9,10,11]. Продукты, пересыщенные АО, могут стать токсичными в следствие изменения таких показателей как pH, консистенция, вкус, цвет, запах. Для того, чтобы обеспечить разумный баланс поступления этих веществ в продукцию и, как следствие, в организм человека, необходимо использовать простые и чувствительные методы их определения, контролируя качество и выпуск готовой продукции, обогащенной АО[12].

1.1.2 Виды биологических антиоксидантов

Биологически активные вещества (БАВ) бывают следующих видов: водорастворимые, жирорастворимые, ферментные и неферментные.

К БАВ относятся фенольные соединения, состоящие из ароматических колец и гидроксильных групп. Они входят в состав практически любой молекулы белка, и находят применение в различных отраслях промышленности: в производстве различных феноло-альдегидных смол, ПАВ (поверхностно-активные вещества), антимикробных, противовоспалительных и других лекарственных средств, в частности благодаря их наличию в растениях в виде свободных соединений - гликозидов. В зависимости от химической структуры выделяют две основные группы фенолов: имеющие от одного до трех ароматических колец и полимерные фенолы[13, 14].

Представителями первой группы являются простые фенолы, к ним относятся лигнаны, хромоны, диокси-, триоксибензолы и фенольные кислоты, такие как протокатеховая, оксибензойная, галловая, салициловая. Особое внимание уделяется галловой кислоте, в особенности, ее сложным эфирам, которые обладают высокой противомикробной и противовирусной активностью, а также противоопухолевыми и антилучевыми свойствами. Благодаря ей и катехинам в совокупности, такой напиток как, например, зеленый чай, обладает высокой биологической и Р-витаминной активностью, способствующими борьбе с нарушениями капиллярной функции[15, 16].

Фенолокислоты применяются в пищевой и парфюмерной промышленности в качестве АО. Необходимо упомянуть полезность действия хлорогеновой кислоты, относящейся также к сложным эфирам. Впервые ее кристаллы были получены из кофейных зерен. Она стимулирует работу нервной системы путем ускорения белкового обмена в тканях мозга и в то же время ингибируя усвоение глюкозы в организме; помогает регулировать уровень сахара в крови. Эти кислоты содержатся в высоких концентрациях во многих ягодах и фруктах, кофейных бобах (7-10 %), благодаря чему кофе обладает высокой АОА по сравнению с различными видами чая, пивом, фруктовыми соками.

Вторая группа фенолов, в ароматическом кольце которых есть более трех гидроксильных групп, называется полифенолы. Это самые распространенные природные соединения, обладающие антиоксидантной и биологической активностью. Они содержатся в фруктах, овощах, зерне, черном и зеленом чае, кофе, вине. Наличие определенных полифенолов обуславливает вкус, цвет и аромат продуктов[12, 17, 18]. Их крупнейший класс – флавоноиды, которые содержат около 5000 различных видов со схожей биологической активностью. В организме проявляют антиаллергические и антисклеротические свойства. Эти вещества участвуют в клеточной регуляции и синтезе коллагена. Среди них выделяют наиболее восстановленные формы – катехины – бесцветные соединения, которыми в большей мере обусловлены антиоксидантные

свойства многих растительных продуктов, и наиболее окисленные – флавонолы – соединения, окрашенные в желто-оранжевые цвета. Флавоноиды содержатся в таких растениях как рябина, шиповник, пустырник, чай. Свыше 50% растений содержат в своих цветках и листьях мерикетин, рутин, кверцетин.

Для увеличения срока службы органических материалов применяются антиоксиданты – замещенные фенолы, прежде всего алкилированные, которые эффективно взаимодействуют с перекисными радикалами[19, 20, 21].

1.1.3 Антиоксиданты в пищевых продуктах

В настоящее время многие группы напитков рассматриваются потребителем как продукты, обладающие некоторой физиологической, пищевой ценностью, способные обогатить организм необходимым набором биологически активных веществ. Антиоксидантные свойства пищевых продуктов реализуются за счет суммарного действия восстановителей различной природы: поли- и монофенольных соединений, витаминов, лигнина, полисахаридов и аминокислот[22, 23]. В зависимости от метода могут определяться конкретные кислоты, обладающие антиокислительными свойствами (витамин Е, кофейная кислота), или определяется их совместное влияние, которое несет больше информации, чем отдельные компоненты. Учесть характер и особенности воздействия отдельного антиоксиданта в живом организме трудно, а суммарный их эффект дает заметные результаты[24-30].

Вина в своем составе содержат широкий круг биологически активных веществ, таких как дубильные вещества, флавоноиды, катехины, антоцианы, витамины, некоторые органические кислоты. Эти вещества по структуре молекул схожи друг с другом и обеспечивают высокую антиоксидантную активность вин. Кроме того, вино содержит липидные антиоксиданты, имеющие в своей молекулярной структуре так называемые радикальные ловушки[31-34]. АОА вин в особенности обусловлена наличием в них полифенолов, которые, акцептируя свободные радикалы, подавляют окисление витаминов, липидов и многих других важных компонентов. Красное вино содержит большее число антиоксидантов, чем белое[35]. Этим объясняется заинтересованность онкологов к красным винам, их свойствам и содержащимся в них биофлавоноидам. Кроме того, красное вино богато компонентами фенольного комплекса. К ним относятся фенолокислоты, относящиеся к биологически активным веществам, которые защищают многие компоненты вина от ультрафиолета и воздуха и формируют его тонкий вкус и аромат. Благодаря проведенным исследованиям [36], известно, что за время хранения

содержание танинов в красных винах снижается на 10-20 %, а в белых винах повышается содержание фенольных соединений всех групп.

Авторская работа [14] посвящена исследованию АОА в различных напитках и показывает, что АОА, в отличие от концентрации фенольных соединений, имеет более широкий диапазон разброса значений с более высокими показателями, причем, значения АОА больше варьировались в красных винах, нежели в белых, что свидетельствует о различном составе фенолов, присутствующих в пробе. Окисленные формы фенолов не дают сигнала антиоксидантной активности, а только восстановленные, что также сказывается на величине АОА. Этим объясняется различное влияние красного и белого вин на организм и разный характер их потребительских свойств. Таким образом, показатель АОА дает больше информации о качестве вина, поскольку именно восстановленные формы фенольных соединений имеют благотворное действие для человека.

При производстве вина для повышения его качества применяют различные пищевые добавки. Они улучшают органолептические свойства и стабильность при длительном хранении. Пищевые добавки имеют разное строение и свою реакционную способность, поэтому нужно учитывать их индивидуальный вклад в качественный состав вин, влияние на организм потребителя этого продукта и на пищевую ценность. В частности, пищевые добавки вследствие химического взаимодействия с компонентами вин могут оказать отрицательное влияние на концентрацию фенолов и их производных, а значит, и на антиокислительные свойства. Поэтому с учетом сорта винограда и условий, в которых он произрастал, необходимо подбирать технологию производства и обработки вин таким образом, чтобы минимизировать отрицательное влияние пищевых добавок[31, 37-39].

В связи со сложным химическим составом коньяков, сведений о них недостаточно, в основном работы, посвященные исследованию АОА в коньяке, можно встретить в зарубежных источниках, и информация имеет больше описательных характер. К числу основных антиоксидантов коньяка относятся фенольные соединения, в частности, галловая и эллаговая кислоты, их эфиры, сиреневый альдегид, кониферальдигид, фурановые соединения и ванилин. Эти АО обуславливают вкус, цвет, терпкость и горечь коньяка. АОА также обусловлена наличием в нем экстрагируемых в процессе выдержки из древесины дуба соединений, таких как лигнин, ароматические кислоты, эллагиновые и катехиновые кислоты. С возрастом коньяка его АОА возрастает. Употребление в умеренных количествах коньяка благодаря фенольным соединениям,

снижает риск заболеваний сердечно-сосудистой системы. Например, эллаговая кислота обладает противоопухолевыми свойствами и антимуtagenным действием.

Чаще всего АО в коньяке определяют электрохимическими методами в силу их легкого вступления в окислительные реакции. Рядом преимуществ обладает титрование с электрогенерированными окислителями кулонометрическим методом. Отсутствует необходимость предварительного снятия градуировочной зависимости, поскольку метод не предполагает зависимость АОА от концентрации анализируемого вещества; метод экспрессный, так как одно титрование занимает не более 5 минут; прост в проведении анализа, а результаты, в свою очередь, отличаются точностью и воспроизводимостью[40, 41, 42].

АОА коньяка можно также определять фотометрическими методами. Анализ коньяка [14] спектрофотометрическим методом с использованием реактива Фолина-Чокальтеу показал, что по значениям АОА коньяк по физиологической ценности существенно уступает красному и белому сухим винам.

Наряду с другими пищевыми продуктами, источником антиоксидантов является пиво. При его производстве неизбежны процессы окисления, а самый известный окислитель – кислород, часто превышает норму $0,15 \text{ мг/дм}^3$. Это приводит к появлению компонентов, которые определяют вкус пива, его длительную сохранность, физико-химические и органолептические характеристики свежего пива. В ходе окисления могут образовываться ацетоин, диацетил, альдегиды. При хранении пива под действием попавшего при розливе кислорода могут также образовываться некоторые количества карбониллов старения. Все эти факторы заставляют задумываться над каждым этапом производства пива, чтобы контролировать уровень кислорода и минимизировать возможность образования продуктов окисления. Кроме технических способов, повышение качества пива достигается внесением в него антиоксидантов. Используют соли сернистой и тиосерной кислот, аскорбиновую и изоаскорбиновую кислоты[43].

1.2 Методы исследования антиоксидантов

1.2.1 Классификация методов исследования антиоксидантов

Методы определения АОА делятся по следующим типам: источник окисления, окисляемое соединение, по способу измерения окисленного соединения и по способу регистрации проявляемой АОА[34].

В свою очередь в зависимости от способа регистрации методы разделяются на:

- волноометрические;
- фотометрические;
- хемилюминесцентные;
- флуоресцентные;
- электрохимические (регистрация соединения, на концентрацию которого косвенно влияют процессы окисления, либо прямое измерение потенциалов; недостатком этого метода является возможность протекания побочных реакций с веществами, не являющимися антиоксидантами)[36, 42];

- более специфичные (с применением биологических маркеров).

Также методы определения общей АОА могут быть основаны на:

- поглощении кислорода при перекисном окислении липидов;
- окислении кроцина;
- хемилюминесценции с люминолом;
- окислении R- фикоэритрина;
- чувствительности эритроцитов к гемолизу;
- активности, восстанавливающей железо;
- генерировании липидных перекисей[43].

1.2.2 Общая характеристика методов определения антиоксидантной активности

Разработка различных методик нахождения АОА для контроля пищевых продуктов началась в конце 20 века, когда были найдены полезные свойства пищевых продуктов с точки зрения их антиокислительного влияния на организм человека. В связи с этим производства стали выпускать продукцию, обогащенную антиоксидантами и с контролируемым их содержанием.

Самыми широко используемыми методами определения АОА являются спектрофотометрические и электрохимические методы. Среди электрохимических применяются катодная и импульсная вольтамперометрия и амперометрическое титрование. Они экспрессны и позволяют, на примере амперометрического детектирования, определять гидроксильные группы в пределах $10^{-9} - 10^{-12}$ г/дм³. Можно также определять вольтамперометрическим методом суммарную АОА, где происходит относительное изменение тока за счет кислородного электровосстановления на ртутно-пленочном электроде относительно хлоридсеребрянного насыщенного электрода при потенциалах [0,0 – (-0,6)] В. Благодаря экспрессности, методы позволяют решать проблему определения АОА при низких концентрациях ($10^{-7} - 10^{-5}$ г/дм³) в ходе немедленного

окисления их кислородом воздуха в разбавленных растворах. К спектрофотометрическим методам относится определение индивидуальных и суммарных АО, например, основанных на окраске комплекса Fe(II) – ферроцин. Проводилось множество исследований различных сортов чая по наличию в них антиоксидантных свойств, также с участием комплекса Fe(III). Его недостаток состоит в том, что антиоксиданты и их природные связи изучены недостаточно хорошо и получать многомерные градуировки сложно[40]. Кулонометрическим методом чаще всего определяют АО в пищевых продуктах и в настоянках лекарственных растений. Потенциометрический метод проводят в медиаторной системе, в которой реагент находится в окисленной и восстановленной форме одновременно (хинон/гидрохинон). Среди хроматографических наиболее используемые методы ВЭЖХ и тонкослойной хроматографии с различными детекторами: флуоресцентным, масс-спектрометрическим и УФ-детектором. Предел обнаружения 1-10 мкг/см³. Вышеперечисленные методы высокочувствительны, достаточно просты и селективны[12].

Неудобство всех применяемых методов состоит в отличающихся друг от друга результатах определения АОА. Единицы измерения для этого значения также нет, поэтому в качестве наиболее достоверного способа получения АОА применяют вещество-стандарт, содержащееся в пищевых продуктах. Ими могут служить рутин, кверцетин, аскорбиновая и галловая кислоты, которые, являясь сильными восстановителями, производят эквивалентный аналитический сигнал при своем окислении, что и 1 г исследуемого продукта[43, 44].

1.2.3 Методы определения антиоксидантов фенольного типа

Данная группа антиоксидантов легко окисляется благодаря гидроксильным и хромофорным группам, поэтому для их определения применяются следующие методы: хроматографические, химические, электрохимические и спектроскопические. В силу развития науки и удобства применения чаще применяются хроматографические и химические методы.

1.2.3.1 Хроматографические методы

Среди первых методов определения биологически активных соединений использовали тонкослойную и флеш-хроматографию, которые просты и дешевы. Анализы источников фенолов сложных форм проводили методами двумерной и

высокоэффективной тонкослойной хроматографии. В зависимости от особенностей строения антиоксидантов, могут использоваться электрофоретические методы (при наличии гидроксильных легко окисляющихся групп) или последовательность нескольких методов. Так, например, соединения, содержащие хромофорные группы, можно хроматографически разделять и затем спектрофотометрически детектировать.

Рядом достоинств обладает обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ ВЭЖХ) с электрохимическим или ультрафиолетовым детектированием. Она высокоселективна для сорбентов, чувствительна для многих детекторов и температурные условия проведения анализа обеспечивают целостность веществ, т.е. предотвращают их разложение.

В зависимости от различного строения, фенолы имеют разные максимумы поглощения. Катехины определяют при длине волны 275 ± 5 нм, танины – при 210 нм. Для идентификации полифенолов методом ВЭЖХ необходимо учитывать также наличие нескольких максимумов поглощения, поэтому для достоверных результатов их сканируют одновременно по нескольким длинам волн, применяя диодно-матричное детектирование. Таким образом на наличие фенолов исследуют пищевые продукты и напитки. В диапазоне низких концентраций (до 10 нг/см^3) используют флуориметрическое и хемилюминесцентное детектирование. Оно также подходит для определения следовых количеств полифенолов. В растительных маслах при определении антиоксидантной активности используют кулонометрическое детектирование. Методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором с химической ионизацией при нормальном атмосферном давлении было проведено исследование около 40 экстрактов овощей и фруктов, среди которых выделены 7 различных флавоноидов. Проведением качественного и количественного анализа были обнаружены 1,85 мг/г апигенина в петрушке и 0,02 мг/г кверцетина в яблоках.

При количественном и качественном определении катехинов используется метод адсорбционной тонкослойной хроматографии (ТСХ) с силикагелем в качестве неподвижной фазы. Преимущества метода состоят в доступности оборудования и экспрессности. Также его используют для анализа сложных природных фенольных источников. На силикагеле можно выделять 13 и более видов полифенолов, галловую кислоту и другие.

Трудности, которые возникают в ходе применения методов хроматографии, в большинстве связаны с предварительной очисткой пробы перед ее введением в колонку и отсутствием стандартов на природные соединения многочисленных форм для качественного разделения. Последнее решают с помощью метода «отпечатков пальцев»,

в котором «отпечатки» служат для определения источников происхождения растительного сырья, так как они строго индивидуальны и принадлежат конкретному виду соединения.

1.2.3.2 Электрохимические методы

Широкое применение электрохимических методов обусловлено тем, что все полифенолы являются электродноактивными веществами и легко окисляются при наличии в их молекулах больших количеств гидроксильных групп. Поэтому они легкоокисляемы на электродах.

Методом амперометрии можно определять природные АО в пищевых продуктах, БАДах, винах. Этот метод высокоселективен и для анализа достаточно иметь необходимые стандарты, а наличие реактивов не требуется. Поскольку разные вещества вступают в реакцию при разных значениях потенциалов, то, варьируя эту величину на электроде, можно разделять АО на классы. В последние годы широко распространен метод капиллярного электрофореза с УФ детектированием. С его помощью определяют фенолы в соках, чае, растительных маслах, ягодах и винах. Этот метод освобождает анализ от стадии пробоподготовки за счет возможности введения пробы в капилляр в разбавленном виде под давлением, а также он имеет преимущество перед ВЭЖХ, поскольку определения проводятся в более широком диапазоне рН.

Чаще метод капиллярного электрофореза применяется в дополнении к методу ВЭЖХ при разделении фенолов и последующим их определении[12, 43].

1.2.3.3 Фотометрические методы

Удобными и доступными, а потому широко используемыми методами являются методы с фотометрической регистрацией. Это методы:

– ТАС, который основан на окислении кроцина, впоследствии его усовершенствовали и стандартизовали по индивидуальному соединению, в качестве которого был взят Тролокс, являющийся водорастворимым аналогом витамина Е. В настоящее время метод может применяться не только для анализа пищевых продуктов, но и плазмы крови[45];

– Система АВТS/H₂O₂/пероксидаза хрена на планшетном сканере. Метод основан на инкубировании АВТS (2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолино-6-сульфоновая) кислота) с пероксидазой и перекисью водорода с образованием относительно стабильного катион–

радикала ABTS^{•+}, с максимумом поглощения электромагнитного спектра в 414 нм. За счет наличия низкомолекулярных антиоксидантов окраска появляется через время. Чем больше АО, тем дольше окрашивается проба. При этом метод быстрый, но дорогостоящий;

– Фолина-Чокальтеу, простой и удобный метод, которым определяют танины. Он основан на окислительно-восстановительной реакции, где восстанавливается фосфорно-молибденовая кислота. Одним из недостатков является трудность определения танинов из-за присутствия в пробе восстанавливающих сахаров, аскорбиновой кислоты, белков и аминокислот (тирозин и цистеин). Тем не менее, метод заслуживает внимания и сравнения в ряде схожих с ним. Например, фенольные соединения в чае определяют по следующим методикам: перманганатометрического титрования, гравиметрически по Дейсу и спектрофотометрически по Фолину-Чокальтеу. Наиболее специфичной в отношении определяемых соединений является именно спектрофотометрия.

– Метод FRAP (ferric reducing/antioxidant power), основанный на восстановлении железа. В результате перехода Fe(III) в Fe(II) при низких значениях pH, комплекс железа с реагентом окрашен. Этот метод позволяет определять низкомолекулярные антиоксиданты. Преимущества метода в том, что он отличается простотой, быстротой и небольшими затратами для проведения анализа. Контроль за этим процессом можно вести по убыли ионов Fe(III) или по возрастанию ионов Fe(II). Для этого используют вспомогательные вещества, которые образуют окрашенные комплексы с этими ионами;

– DPPH. Основан на реакции антиоксиданта АН с 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом: $DPPH\cdot + AH \rightarrow DPPH-H + A\cdot$, в результате чего пурпурно-синяя окраска восстановленного антиоксидантом DPPH уменьшается[48].

Существенным недостатком этих методов является невозможность определения индивидуальных соединений АО, спектрофотометрия подразумевает получение только суммарного содержания полифенолов. Поэтому в последние десятилетия применяются сорбционно-спектроскопические методы. Методом твердофазной люминесцентной спектроскопии можно предварительно концентрировать аналит и затем закреплять его на твердофазном сорбенте, что обеспечивает возможность выделения определяемого компонента. При этом используется как собственная люминесценция лигандов, так и сенсibilизированная люминесценция, которая основана на переносе энергии возбуждения от оптических центров донорных ионов к люминесцирующим акцепторным. Сенсibilизированной люминесценции находят достаточное применение. Удавалось определить содержание ванилина в коньяке, галловой кислоты в вине, полифенольных

соединений в растительном сырье и БАДах. С помощью собственной люминесценции в твердофазном сорбенте были определены хлорогеновая кислота в кофейных зернах и катехины в чае. Собственную люминесценцию можно усилить комплексобразованием, так проводилось определение таких флавоноидов как рутин, морин, кверцетин.

Спектрофотометрическими методами можно портативно и быстро проводить анализы, их простота и дешевизна обеспечивает качественный контроль за безопасностью и фальсификацией пищевых продуктов[12, 43].

1.3 FRAP – метод определения антиоксидантной активности

Существует два вида методов, используемых при определении антиоксидантов в пищевых продуктах. Первый из них заключается в процессе взаимодействия антиоксидантов с генерируемыми в системе радикалами, такие методы называют прямыми. Другой представляет собой косвенное определение антиоксидантов путем их взаимодействия с металлами, имеющими переменную валентность. Метод FRAP относится к последнему. Его сущность состоит в реакции между избыточным количеством ионов Fe(III) и фотометрическим реагентом, например, ортофенантролином или дипиридиллом. Перед анализом объекта исследования строят градуировочный график, используя растворы одного из стандартных веществ, к которым относятся кверцетин, рутин, тролокс, галловая, аскорбиновая и некоторые другие кислоты. Реакция, ход которой определяет интенсивность окраски образующегося комплекса Fe(II) с реагентом, протекает медленно, поэтому аналитический сигнал измеряют раньше, чем в пробе установится равновесие. Затем по аналитическому сигналу, можно рассчитать концентрацию и активность антиоксидантов. Обычно АОА выражают в пересчете на стандартное вещество и выражают массой или числом молей стандартного вещества, аналитический сигнал которого равен аналитическому сигналу для 1 г исследуемого объекта.

Факторами, влияющими на величину АОА, являются: содержание полифенолов, их количественное соотношение и разновидности, а, следовательно, и скорость протекания реакций, выбор стандартного вещества, условия проведения анализа. Кроме того, данные факторы являются основными источниками погрешностей. Несмотря на это, показатель АОА всегда прямо пропорционален суммарному содержанию полифенолов в пробе (САО), если использовать одну методику для анализа объектов одного типа. Сложность получения приемлемых результатов по данному показателю состоит лишь в том, что

аналитический сигнал формируется в искусственно смоделированных условиях *in vitro*, что отличается от поведения и активности АО в биологических системах *in vivo*. В связи с этим нужно стараться подобрать такие условия проведения анализа и протекания реакций, чтобы реакционная система максимально была приближена к естественным условиям. В качестве индикаторной системы используют комплексный реагент, который содержит ионы металлов с переменной валентностью. Это наиболее практично, поскольку АО – сильные восстановители – лучше всего будут взаимодействовать с ионами, находящимися в высшей степени окисления. Ионы металлов при восстановлении создают прочные комплексы, не мешая определению АОА [9, 43]. Этой цели вполне отвечает метод FRAP, в котором АОА определяется неселективной реакцией с окислителем или веществом, генерирующим радикалы. В данном методе используют реагенты систем Fe(III)/Fe(II) – о-фенантролин и Fe(III)/Fe(II) – 2,2-дипиридил. Для получения аналитического сигнала в пробу вводят избыток комплексного реагента, который содержит ионы Fe(III) и один из реагентов: о-фенантролин (PHEN) или 2,2-дипиридил (DIP). Затем через 10 или 60 мин (в зависимости от цели анализа) измеряют аналитический сигнал при длине волны 510 или 520 нм относительно чистого растворителя. При этом pH раствора должен быть в пределах от 2 до 5, максимальный сигнал образуется при pH=3,6.

В целом, сведений о природе и особенностях различных антиоксидантах недостаточно, из-за чего такие методики применяются нечасто. Вместо вышеупомянутого показателя CAO, показывающего концентрацию полифенолов в пробе, на практике обычно определяют именно АОА, которая еще называется суммарной антиоксидантной емкостью. Она более точно отражает характер взаимодействия АО в пробе. Однако, разные АО формируют различный сигнал и вступают в реакции по-разному, а это создает трудности в получении закономерности между CAO и АОА и при интерпретации результатов. Пока это остается нерешенной проблемой, поэтому неточности в получении результатов относят к погрешностям оценки CAO [9, 25, 26, 32].

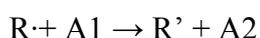
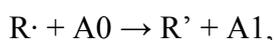
В противовес неизбежным трудностям, данному методу присуще и много достоинств. Очень прост процесс пробоподготовки, который заключается в разбавлении пробы водой. Влияние мешающих веществ минимально и высока воспроизводимость результатов. Также метод FRAP позволяет определять содержание АО на уровне 10^{-6} – 10^{-3} моль/дм³. Температура при проведении анализа может колебаться в пределах 1°C. Время экспозиции можно сокращать до 10 мин за счет изученной пропорциональности между содержанием полифенолов и величиной аналитического сигнала через определенное время. Исследования однотипных пищевых продуктов дали следующие результаты: за

первые 10 минут в реакцию вступают 50-70% АО, за 60 минут – 80-90%. Обоснованным является соотношение $AOA_{10} < AOA_{60} < CAO$.

На определение АОА также влияет присутствие комплексантов в пробе. Это выражается в снижении чувствительности при определении полифенолов. Авторами [27] было проведено исследование влияния комплексантов на оценку АОА полифенолов. В качестве комплексантов использовали фосфат, фторид и цитрат натрия. При их концентрации на 3 и более порядков выше, чем самих полифенолов, определение последних было сильно затруднено или невозможно. Полученные данные свидетельствовали о том, что полифенолы не вступают с комплексантами в прямое химическое взаимодействие как с белками, например, с казеином или альбумином, то есть их антиоксидантная активность в пробе не снижается фактически, но величина аналитического сигнала свидетельствует об обратном. Причина состоит в том, что комплексанты, такие как фосфаты, фториды, и другие, не дающие самостоятельно аналитического сигнала, связывают в прочные комплексы ионы Fe(III), вследствие чего снижается формальный редокс-потенциал Fe(II)/Fe(III) системы и константы равновесия тех реакций, где окислителем служит Fe(II). В результате аналитический сигнал АОА становится значительно ниже. Ослаблением этого воздействия может служить введение реагента в большем количестве, но при этом возникнут побочные процессы, в которых будут участвовать уже образующиеся фосфаты и салицилаты. Обобщенная АОА будет показывать недопустимо заниженные результаты. По способу добавок можно решить эту проблему путем введения в пробу вещества-стандарта, например, галловую кислоту. Аналитический сигнал полифенолов, присутствующих в пробе изначально, снижается пропорционально сигналу вводимой ГК. Таким образом повышается правильность анализа, уменьшается систематическая составляющая общей неопределенности АОА, обусловленная влиянием комплексантов. Причем, независимо от того, проводят ли способ добавок аналитически (с одной добавкой) или графически (с двумя), результаты приблизительно совпадают. Это позволит разрабатывать и использовать новые методики оценивания АОА пищевых продуктов, устойчивые к присутствию комплексантов [12, 23, 32, 46, 48].

Важным аспектом в методе FRAP является выбор стандартного вещества. Это обусловлено тем, что единой единицы измерения АОА пока не существует и сами по себе значения этого показателя варьируются даже для однотипных продуктов. Применение сильного восстановителя в качестве вещества, с которым можно сравнить антиокислительные свойства объекта, является универсальным способом данного метода. При выборе восстановителя необходимо учитывать стехиометрию окисления АО. Число

электронов, которое отдает одна молекула АО в ходе ее взаимодействия с Fe(III), у разных АО различно. Такие восстановители как кверцетин и галловая кислота при окислительно-восстановительном взаимодействии с избытком Fe(III) отдают большее число электронов и образуют больше ионов Fe(II), что и объясняет высокую чувствительность фотометрического определения этих АО по сравнению, например, с аскорбиновой кислотой. Также следует обращать внимание на особенности выбираемой системы. Например, для тестовых систем антиоксидант Fe(III)/2,2'-дипиридил обычно характерно медленное течение реакции и суммарный итог АОА является следствием не одного, а нескольких одновременно проходящих процессов:



где

R· – оксидант;

A₀ – исходный антиоксидант;

A₁, A₂, ... – продукты его последовательного одноэлектронного окисления.

Было экспериментально подтверждено то, что последовательные реакции могут служить причиной нелинейности в количественной характеристике АОА [33, 38, 39, 44, 47, 49, 50].

Необходимо отметить, что метод FRAP предназначен не только для оценки полезности пищевых продуктов и контроля их качества. Этим методом часто судят о ценности различных вин, сортов чая и других продуктов, обладающих высоким содержанием полезных для организма АО. Метод FRAP довольно широко применяют в биохимии и технологии пищевых продуктов. В целом, преимущества метода состоят в экспрессности и низкой стоимости анализа, простоты оборудования и хорошей сходимости результатов. Недостатком является отсутствие стандартизованных методик определения АОА. Результаты, которые получают по одним и тем же объектам, но по разным методикам, иногда несопоставимы. Поэтому актуальным в практическом и в теоретическом плане является процесс исследования и разработки методик спектрофотометрического определения АОА в пищевых продуктах [9, 43].

1.4 Аттестация методик выполнения измерений

1.4.1 Понятие МВИ и ее виды

Согласно ОСТ 95 10430-2001, методика выполнения измерений (МВИ) – это совокупность операций и правил, выполнение которых обеспечивает получение результатов измерений (испытаний) с известной погрешностью, или результатов контроля с известной достоверностью [51].

МВИ излагаются либо отдельным документом, либо его частью, в зависимости от содержания и сложности. Они бывают следующих уровней: государственного, отраслевого и уровня предприятий.

В зависимости от объектов, на которые распространятся методика, МВИ бывают:

- типовые, они применяются, если измерения проводят для однотипных объектов или в схожих условиях. Оформляются они в основном как отраслевые стандарты или инструкции, а также могут содержать требования к рабочим МВИ;

- рабочие, которые описывают процедуры выполнения измерений, метрологические требования и нормативы контроля. На каждую рабочую МВИ должна быть обязательно разработана типовая, поскольку рабочая поясняет, расширяет ее содержание и требования[52].

1.4.2 Цели проведения аттестации МВИ и требования, предъявляемые к ней

Аттестация методик выполнения измерений – это исследование и подтверждение соответствия методик выполнения измерений установленным метрологическим требованиям к измерениям.

Программа и особенности аттестации МВИ согласовываются между заявителем и уполномоченной организацией. В договоре могут быть прописаны сокращенный порядок проведения данной процедуры в виде последовательных экспериментальных этапов исследования методики с требованиями и описанием каждого из них.

Критерии для аттестации методик следующие:

- полнота изложения требований и операций в документе на методики измерений;
- наличие и обоснованность показателей точности;
- соответствие требованиям нормативных правовых документов в области обеспечения единства измерений.

Согласно ГОСТ Р 8.563-2009, документ на аттестованную методику измерений должен содержать методики приготовления используемых в ходе определения смесей, реактивов, а также отвечать требованиям технических характеристик, в частности требованиям к:

- соответствию области ее применения;

- метрологическим характеристикам;
- условиям измерений, испытаний, контроля;
- выбору средств измерений, испытаний, вспомогательного оборудования, материалов, реактивов;
- требованиям безопасности;
- регламентации требований к уровню квалификации операторов, выполняющих измерения;
- измерительным процедурам (требования эксплуатационной документации);
- процедурам контроля качества измерений;
- вычислению и представлению результатов измерений[53, 54].

Аттестация бывает обязательная и добровольная. Те методики, которые входят в сферу государственного регулирования, подлежат обязательной аттестации. При аттестации устанавливаются и оцениваются метрологические характеристики методики в соответствии с требованиями точности и проводятся исследования по внутреннему оперативному контролю результатов измерений.

Согласно решению «Об утверждении Порядка метрологической аттестации методики измерений», метрологические исследования проводят в следующей последовательности:

1) устанавливают: соответствие назначения методики свойствам измеряемых величин, проверку соответствия условий проведения анализа прописанным в методике, степень полноты описания всех процедур, правильность представления результатов измерений, соблюдение требований межгосударственных стандартов и международной системы единиц, а также правильность оформления документа;

2) оценивают: правильность методов пробоотбора и пробоподготовки, выбор средств измерений, стандартных образцов, реактивов и материалов, условий проведения анализа, способов обработки результатов.

Внутренний оперативный контроль подразумевает контроль качества показателей методики для обеспечения точности текущего анализа. В частности, проводят оценку внутрилабораторной прецизионности и систематической погрешности лаборатории. Существуют следующие виды внутреннего контроля:

- оперативный контроль (ВОК). Проводят для выявления и устранения причин нарушения требований точности результатов измерений и проверки показателей воспроизводимости правильности, точности и сходимости;

- периодический контроль (ПК). По цели проведения заменяет ВОК, если ВОК нецелесообразно проводить часто;

– контроль стабильности результатов (КС). Если процесс измерений становится неконтролируемым, применяют данный вид контроля;

– статистический контроль. Предназначается для анализа, контроля и оценки результатов, собранных за определенный промежуток времени.

Кроме того, для выявления статистики изменений показателей качества, нахождения и устранения причин, их вызывающих, применяют контрольные карты [45, 51, 55, 56, 57].

1.4.3 Особенности аттестации методик количественного химического анализа

Методика количественного химического анализа (МКХА) – это совокупность конкретно описанных операций, выполнение которых обеспечивает получение результатов количественного химического анализа с установленными показателями точности.

Методики КХА являются разновидностью методик измерений. Они служат для того, чтобы контролировать состав вещества и других объектов из области технического регулирования в соответствии с требованиями к точности и метрологическим показателям; некоторые из них подвергаются государственному регулированию.

Методики КХА содержат в себе некоторые особенности. Одна из них заключается в том, что именно с помощью градуировочной зависимости рассчитываются и обрабатываются результаты анализа, так как этот способ расчета минимизирует влияние погрешности пробоотбора, пробоподготовки и перевода вещества в форму для анализа. Другая особенность КХА, это влияние на результаты таких факторов, как квалификация выполняющего анализ, степень его ответственности и настроение в момент проведения анализа. Поэтому для получения достоверных и наиболее качественных результатов необходим опыт работы лаборанта.

Также при выборе методики КХА нужно учитывать стоимость проведения анализа, квалификацию сотрудников, метрологические требования и другие особенности, присущие выполнению данного вида анализа [58].

1.4.3.1 Этапы аттестации методики количественного химического анализа

Аттестация является заключительным этапом разработки методики. Методики бывают разных видов и предназначаются для разных целей, однако, несмотря на их разнообразие, этапы проведения аттестации носят общий характер. Вся процедура

аттестации сводится к тому, чтобы получить документально подтвержденную методику с заданными метрологическими характеристиками. Она включает начальную и конечную стадии, отведенное время для каждой из них, а также затраты на проведение исследовательских мероприятий, экспертиз, оформления. В данной процедуре принимают участие многие заинтересованные лица, например, метрологические службы, эксперты, а также организации, компетентные в этой области. Для проведения аттестации разработчик данной методики или заявитель должен подать заявление в аттестационную комиссию. Аттестацию проводят уполномоченные для этого органы, аккредитованные на данный вид деятельности. Целью аттестации МКХА является подтверждение того, что процедура выполнения измерений соответствует метрологическим требованиям, предъявляемым к методике. После получения свидетельства об аттестации методика будет обеспечивать получение результата с заданной точностью [59, 60, 61].

Процедура аттестации включает следующие этапы:

- 1) разработка методики
- 2) метрологическое исследование методики
- 3) аттестация методик КХА

На первом этапе разрабатывается методика на основе результатов улучшения стадий процесса подготовки пробы к анализу, прописываются условия проведения анализа и необходимое оборудование. Особое внимание следует обратить на выбор используемых средств измерения, вспомогательного оборудования и реактивов (например, средства измерений должны быть обязательно утвержденного типа, а определяемый компонент в стандартных образцах должен лежать внутри заданного диапазона градуировки СИ). Кроме того, на данном этапе уделяется внимание выбору способа обработки результатов измерения физических величин. В зависимости от цели и возможностей проведения анализа используют аналитический способ методом наименьших квадратов или с помощью электронных таблиц со встроенными функциями и графический.

Важной процедурой является градуировка средства измерения. Ее проводят с использованием:

– одного градуировочного раствора с концентрацией определяемого компонента, находящейся в середине заданного диапазона. Такую градуировку проводят в том случае, если измерение, проводимое однократно, занимает много времени, например, в случае хроматографического разделения 15 аминокислот, анализ занимает 2,5 часа;

– трех градуировочных систем, применяют при неdestructивном анализе для твердых объектов. Так, например, определяют содержание ртути в твердых матрицах атомно-абсорбционной спектроскопией;

– от пяти градуировочных систем и более анализ обычно проводят для растворов, которые были получены разбавлением одного стандартного образца с высокой концентрацией.

В результате разработки методики должны быть: сформулированы задачи измерения и содержательное описание всех процедур, выбраны методы и средства измерения. Методика должна быть экспериментально опробована и прописана в протоколе.

Второй этап аттестации методики – метрологическое исследование, предполагает работу с результатами измерений, их анализ, статистическая обработка, выявление стохастической зависимости и нормального распределения среди выборок, установление измеряемого диапазона, а также расчет и оценка показателей прецизионности, правильности и точности.

При анализе выборок на выбросы обычно используют критерий Кохрена или Граббса. Критерием Кохрена обрабатывают внутрилабораторные расхождения, тогда как критерием Граббса можно обрабатывать и межлабораторные расхождения. После того, как выбросы устранены проводят проверку на нормальное распределение, которое характеризует показатель прецизионности. При отсутствии нормального распределения или отклонении от него совокупности результатов измерений, увеличивают число измерений до тех пор, пока их распределение не станет нормальным.

Кроме того, метрологические исследования методики включают в себя нахождение погрешностей, а именно:

- случайной погрешности;
- систематической погрешности;
- суммарной неопределенности.

Характеристики погрешности при получении окончательных результатов указывают:

- в абсолютной форме (в единицах измеряемой величины);
- в относительной форме (в процентах, относительных долях);
- в виде функциональной зависимости от результата измерения [54, 56, 60].

Отдельное внимание следует уделить оценке метрологических исследований. Показателем, от которого в большей мере зависит качество анализа, является ранее упомянутая характеристика – погрешность. Чтобы найти зависимость этой величины от

измеряемого параметра, необходимо проводить измерения минимум в трех различных точках диапазона измерений, две из которых обязательно должны являться крайними значениями. Каждое из значений измеряется определенное количество раз, которое должно быть минимальным и зависит от того, в какой форме выражается погрешность, от метрологических возможностей методики и многих других факторов[63, 64].

Чтобы оценить стандартные отклонения сходимости и воспроизводимости анализируют контрольный образец в нескольких сериях, проводя по несколько измерений в каждой и проверяют полученные значения на промахи. После этого находят следующие показатели:

- среднее значение для каждой серии;
- общее среднее значение для всех серий;
- стандартное отклонение сходимости;
- стандартное отклонение воспроизводимости.

Оценки этих показателей зависят, например, от вида и состояния основного и вспомогательного оборудования, квалификации персонала. Общая случайная погрешность является суммой стандартных отклонений воспроизводимости, сходимости и повторяемости.

Следующая составляющая погрешности анализа – систематическая – характеризуется правильностью, которую проверяют на основе экспериментальных исследований. В зависимости от состава матрицы и природы вещества можно использовать следующие способы проверки правильности:

– когда есть образцы сравнения. Анализируемые пробы измеряют определенное количество раз, затем вычисляют среднее значение и стандартное отклонение. Чтобы узнать, имеет ли место в данном анализе наличие систематической погрешности, проверяют гипотезу о равенстве средних для каждой из проб, сравнивая их концентрации с концентрациями стандартных образцов. Если концентрации оказываются одинаковые, то гипотеза принимается и считается, что в погрешности присутствует только случайная составляющая, если концентрации разные – систематическая составляющая также имеет место;

– методом сравнения. Если отсутствуют образцы сравнения, то можно сравнивать концентрации проб, измеренных по двум различным методикам. Сравнивают результаты, как и в предыдущем способе, принимая или отвергая гипотезу о равенстве средних. Данный способ менее достоверен, чем предыдущий, так как систематическая составляющая может быть заложена уже в одной из методик и тогда вряд ли удастся сделать правильные выводы о составляющих погрешности;

– методом добавок. Его используют также в случае отсутствия образцов сравнения. Измерения по методу добавок проводят в соответствии с общеизвестным порядком. Затем также, проверяют гипотезу о равенстве концентраций, рассчитанных и полученных экспериментально. Принятие гипотезы означает, что систематическая составляющая погрешности отсутствует. Существует другой вариант метода добавок – графический. Графическая интерпретация данного метода представлена на рисунке 1. Прямую, полученную из совокупности значений аналитического сигнала добавленных концентраций, экстраполируют до пересечения с осью абсцисс. Если систематическая погрешность отсутствует, то отрезок от нуля до пересечения с прямой, будет близок к C_x .

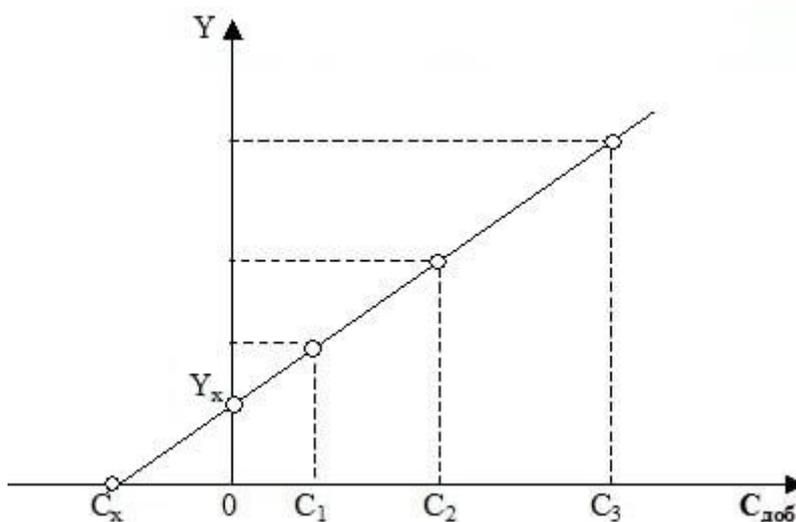


Рисунок 1 – Графическая интерпретация метода добавок

Метод добавок используется в основном для жидких или газообразных веществ, которые проще добавлять в пробу в том виде, в котором находится определяемый компонент.

Кроме перечисленных существуют способы проверки правильности с помощью однофакторных или многофакторных планов эксперимента, методом варьирования навески, а также простым суммированием составляющих систематической погрешности компонентов[23, 65, 66].

Нельзя забывать о такой характеристике как диапазон измерения. Он тесно связан с погрешностью измерения, поэтому их определяют совместно. После того, как будут установлены границы измерения, значения, полученные при анализе проб с концентрацией внутри заданного диапазона, должны иметь погрешность, не выше допустимого ее значения. Если это условие выполняется, то диапазон считается

установленным. Иногда нижнюю границу диапазона устанавливать нецелесообразно или невозможно, если, например, проводят анализ объектов окружающей среды, содержащих определяемые компоненты (как правило, опасные для жизни) в низких концентрациях, или при проверке качества очень чистых материалов в электрической технике. Для таких анализов существует предел обнаружения (ПО) – минимальная концентрация образца, которая может быть найдена при некоторой доверительной вероятности с заданной точностью. При установлении предела обнаружения сначала многократно измеряют холостую пробу, затем рассчитывают среднее значение результатов и его среднеквадратическое отклонение и непосредственно ПО[67].

Третьим этапом является непосредственно аттестация методики. Для ее проведения заявитель предоставляет в уполномоченную организацию следующие документы:

- заявку на аттестацию методики;
- исходные данные по разработанной методике: область применения, наименование технического регламента, согласно которому выполнялись требования, перечень метрологических требований и условий проведения анализа и при необходимости нормативно-ссылочную информацию, которая также подлежит аттестации;
- пропись методики, содержащую проект документа, регламентирующий методику;
- отчет с программой и результатами метрологических исследований методики, результатами теоретических и экспериментальных исследований.

По предоставленным документам проводится метрологическая экспертиза, проверяется правильность оформления. После полной проверки документов на соблюдение требований, делают заключение об утверждении или отклонении методики. При положительном решении оформляется свидетельство об аттестации, его выдают заявителю в соответствии с решением «Об утверждении порядка метрологической аттестации методики измерений», методика утверждается и вносится в соответствующий реестр, после этого допускается ее применение. Свидетельство заполняется в электронном виде и содержит сведения о разработчике, наименование и описание документа с методикой, способ, которым подтверждалось соответствие показателей методики требованиям и выводы по результатам аттестации о подтверждении соответствия[53, 55, 65, 67, 68, 69].

После проведения аттестации документ подписывают метролог, ответственный за работу, главный метролог и руководитель предприятия, в котором проводилась

аттестация. При необходимости в методику вносят изменения. После завершения данных действий за методикой устанавливается государственный метрологический надзор[53, 70].

2 Экспериментальная часть

2.1 Исходные реактивы, материалы и используемая аппаратура

Для выполнения экспериментальных исследований использовались следующие средства измерений, устройства, реактивы, материалы:

- спектрофотометр LEKI SS2107;
- кюветы стеклянные номинальной толщиной поглощающего слоя 20 мм, ГОСТ 8.298-2013;
- весы лабораторные ВЛР-200 2 класса точности, ТУ 25-06-1131-75;
- колбы мерные вместимостью 50, 100, 250 см³ исполнения 2,2 класса точности, ГОСТ 20292-74;
- стаканы химические вместимостью 50 и 100 см³, ГОСТ 25336-82;
- пипетки градуированные вместимостью 1, 2, 5, 10 и 25 см³ исполнения 2,2 класса точности, ГОСТ 20292-74;
- кислота соляная о.с.ч., 20-4, ГОСТ 14261-77;
- спирт этиловый ректификованный, ГОСТ 5062-67;
- железоаммонийные квасцы, ТУ 6-09-53559-97;
- кислота аскорбиновая, имп.;
- кислота галловая, имп.;
- кверцетин, имп.;
- кислота протокатеховая, имп.;
- 2,2'-дипиридил, имп.;
- вода дистиллированная, ГОСТ 6709-72.

2.2 Приготовление растворов

Приготовление реагента:

1 На аналитических весах взвесить 0,72300 г железоаммонийных квасцов с погрешностью 0,00025 г, перенести в мерную колбу вместимостью 250 см³, добавить 0,42 см³ концентрированной соляной кислоты. Полученный раствор довести до метки дистиллированной водой. Полученный раствор содержит 0,006 моль/дм³ Fe(III).

2 На аналитических весах взвесить 0,20000 г дипиридила с погрешностью 0,00025 г, перенести в мерную колбу на 100 см³. Полученный раствор довести до метки этиловым спиртом. Полученный раствор содержит 0,0036 моль/дм³ 2,2'-дипиридила.

Приготовление стандартного раствора аскорбиновой кислоты (АК) с концентрацией 0,001 моль/дм³. Приготовление раствора осуществляется в день проведения анализа. На аналитических весах взвесить 0,17600 г аскорбиновой кислоты с погрешностью 0,00025 г, перенести в мерную колбу вместимостью 100 см³ и довести объем до метки дистиллированной водой. Полученный раствор аскорбиновой кислоты разбавить в 10 раз.

Приготовление стандартного раствора галловой кислоты (ГК) с концентрацией 0,01 моль/дм³. Приготовление раствора осуществляется в день проведения анализа. На аналитических весах взвесить 0,17010 г галловой кислоты с погрешностью 0,00025 г, перенести в мерную колбу вместимостью 100 см³ и довести объем до метки дистиллированной водой. Полученный раствор галловой кислоты разбавить в 10 раз.

Приготовление стандартного раствора галловой кислоты (ГК) с концентрацией 0,001 моль/дм³. Приготовление раствора осуществляется в день проведения анализа. 10 см³ раствора, полученного по пункту 2.2.3, перенести в мерную колбу вместимостью 100 см³ и довести объем до метки дистиллированной водой.

Приготовление стандартного раствора кверцетина (КК) с концентрацией 0,001 моль/дм³. На аналитических весах взвесить 0,03020 г кверцетина с погрешностью 0,00025 г, перенести в мерную колбу вместимостью 100 см³ и довести до метки этиловым спиртом.

Приготовление стандартного раствора кверцетина (КК) с концентрацией 0,0001 моль/дм³. 10 см³ раствора, полученного по пункту 2.2.5, перенести в мерную колбу вместимостью 100 см³ и довести объем до метки этиловым спиртом.

Приготовление стандартного раствора катехола (КТ) с концентрацией 0,001 моль/дм³. Приготовление раствора осуществляется в день проведения анализа. На аналитических весах взвесить 0,01100 г галловой кислоты с погрешностью 0,00025 г, перенести в мерную колбу вместимостью 100 см³ и довести объем до метки дистиллированной водой.

2.3 Построение градуировочных графиков

Градуировочный график для расчета антиоксидантной активности. В семь мерных колб вместимостью 50 см³ поместить приблизительно 20 см³ дистиллированной

воды, в каждую колбу внести 1 см³ реагента № 1 и 1 см³ реагента № 2. Добавить последовательно 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 и 0,5 см³ стандартного раствора АО с концентрацией 0,001 моль/дм³. Объемы растворов довести до метки дистиллированной водой, тщательно перемешать. Градуировочные концентрации соответственно равны 0; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 и 10,0 мкмоль/дм³. Измерить оптическую плотность каждого раствора на спектрофотометре при длине волны 490 нм в стеклянной кювете относительно дистиллированной воды через 10, 30 и 60 минут после его приготовления.

Градуировочный график строят, откладывая по оси абсцисс – концентрации АО, введенные в градуировочные растворы, по оси ординат – соответствующие значения оптической плотности.

Уравнение регрессии получают, обрабатывая полученные данные методом наименьших квадратов. Из полученного линейного уравнения вычисляют градуировочную концентрацию, учитывая сигнал холостой пробы, по формуле

$$C = \frac{A-A_0}{a}$$

где

A – оптическая плотность анализируемой пробы;

A₀ – оптическая плотность холостой пробы;

a – коэффициент чувствительности градуировочной зависимости.

2.4 Подготовка проб к анализу

Подготовка пробы белого вина к анализу. В мерную колбу на 50 см³ внести 25 см³ дистиллированной воды, добавить 1 см³ нагретого до комнатной температуры белого вина (разбавление 1:25). Раствор тщательно перемешать.

Подготовка пробы красного вина к анализу. В мерную колбу на 250 см³ внести 100 см³ дистиллированной воды, добавить 1 см³ нагретого до комнатной температуры красного вина (разбавление 1:100). Раствор тщательно перемешать.

Подготовка пробы коньяка к анализу. В мерную колбу на 50 см³ внести 10 см³ дистиллированной воды, добавить 1 см³ нагретого до комнатной температуры коньяка (разбавление 1:10). Раствор тщательно перемешать.

Подготовка пробы пива светлого к анализу. Перед проведением анализа была проведена дегазация светлого пива. В мерную колбу на 50 см³ внести 10 см³ дистиллированной воды, добавить 1 см³ нагретого до комнатной температуры темного пива (разбавление 1:1). Раствор тщательно перемешать.

Подготовка пробы пива темного к анализу. Перед проведением анализа была проведена дегазация темного пива. В мерную колбу на 50 см³ внести 10 см³ дистиллированной воды, добавить 1 см³ нагретого до комнатной температуры темного пива (разбавление 1:10). Раствор тщательно перемешать.

2.5 Определение антиоксидантной активности пищевых продуктов

Анализ вина. В мерную колбу вместимостью 50 см³ внести приблизительно 20 см³ дистиллированной воды, добавить 1 см³ реагента № 1 и 1 см³ реагента № 2, перенести 2 см³ пробы вина, приготовленного по пункту 2.4.1 или пробы вина, приготовленного по пункту 2.4.2. Объем раствора довести до метки дистиллированной водой, тщательно перемешать. Измерение проводить по пункту 2.3.

Концентрация антиоксидантов в вине C_{AOA} , ммоль/дм³, рассчитывается по формуле

$$C_{AOA} = (C_{ур} * V_{\text{колбы для разб.}} * V_{\text{колбы для р-ции}}) / (V_{\text{пробы в р-цию}} * V_{\text{вина для разб.}}),$$

Где

$C_{ур}$ – концентрация галловой кислоты в исследуемом растворе, найденная по градуировочному графику, мкмоль/дм³;

$V_{\text{колбы для разб.}}$ – вместимость мерной колбы, в которой проводится разбавление, равная 50 см³;

$V_{\text{колбы для р-ции}}$ – вместимость мерной колбы, взятой для анализа, равная 50 см³;

$V_{\text{пробы в р-цию}}$ – объем пробы, отобранный для анализа, см³;

$V_{\text{вина для разб.}}$ – объем пробы, отобранный для разбавления, см³.

3 Результаты и обсуждения

Согласно общепринятой терминологии, антиоксиданты – это вещества, ингибирующие процессы окисления в биологических системах. Органические соединения под действием сильных окислителей превращаются в свободные радикалы, нанося вред живому организму. Чтобы это предотвратить, необходимо антирадикальное воздействие на систему, которое обеспечивается восстановителями различной природы со схожими характеристиками.

Различные антиоксиданты вступают в реакцию с окислителями с разной скоростью и за один процесс взаимодействия могут отдавать разное число электронов. Так, например, галловая кислота может уменьшать реакционную способность большего числа радикалов, чем аскорбиновая кислота за один и тот же промежуток времени. Свойства антиоксидантов зависят от их химической природы. Для их определения в пищевых продуктах необходимы регламентированные методики. В настоящей работе для аттестации методики количественного химического анализа был выбран наиболее удобный в применении метод FRAP с индикаторной системой Fe(III)/2,2'-дипиридил.

Определение величины АОА в пищевых продуктах осуществляется взаимодействием избыточного количества ионов Fe(III) с фотометрическим реагентом – 2,2-дипиридилем. Преимуществом используемой нами индикаторной системы, является малая фотохимическая чувствительность реагента. Незначительное изменение потенциала при этом не является критичным. Аналитический сигнал возрастает пропорционально интенсивности окрашенного комплекса Fe(II) с реагентом.

Изучена зависимость аналитического сигнала от времени экспозиции пробы. Доказано, что за первые 10 мин успевают прореагировать до 80% антиоксидантов, присутствующих в пробе. Это объясняется введением в пробу избытка реагента, ускоряющего протекание реакции, а также тем, что ионы Fe(II) создают прочный комплекс с реагентом и не оказывают мешающего влияния на дальнейшее протекание реакции. Тем не менее, объем вводимого реагента обязательно контролируется во избежание занижения значения аналитического сигнала.

При выборе вещества-стандарта руководствовались характером его взаимодействия с компонентами пробы. Для анализа необходимо было выбрать сильный восстановитель, по своей природе близкий к формированию аналитического сигнала пищевых продуктов. Получены градуировочные зависимости наиболее известных антиоксидантов (рисунки 2-5).

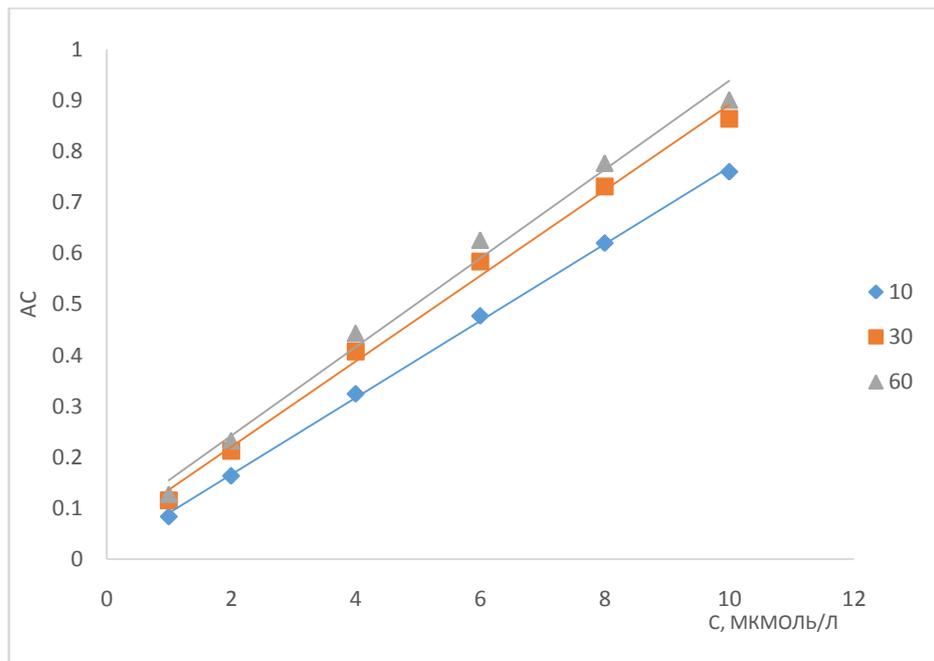


Рисунок 2 – Градуировочный веер галловой кислоты

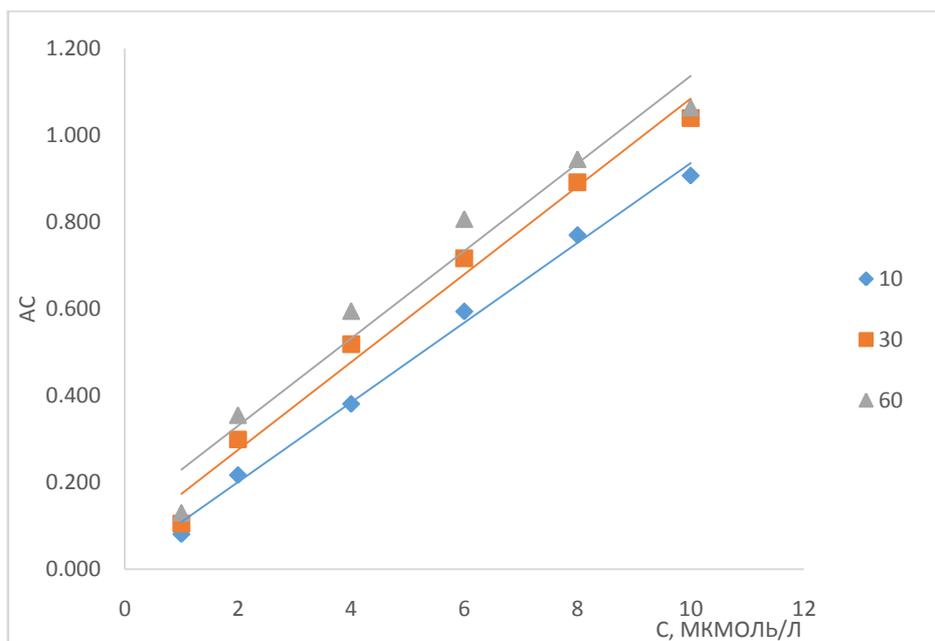


Рисунок 3 – Градуировочный веер кверцетина

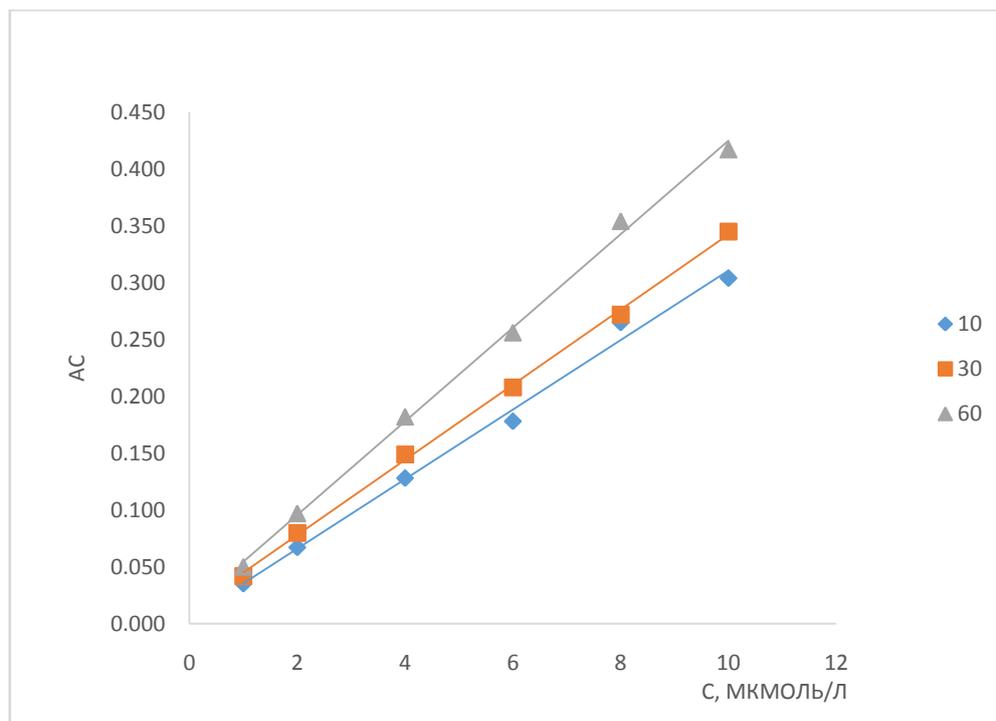


Рисунок 4 – Градуировочный веер катехола

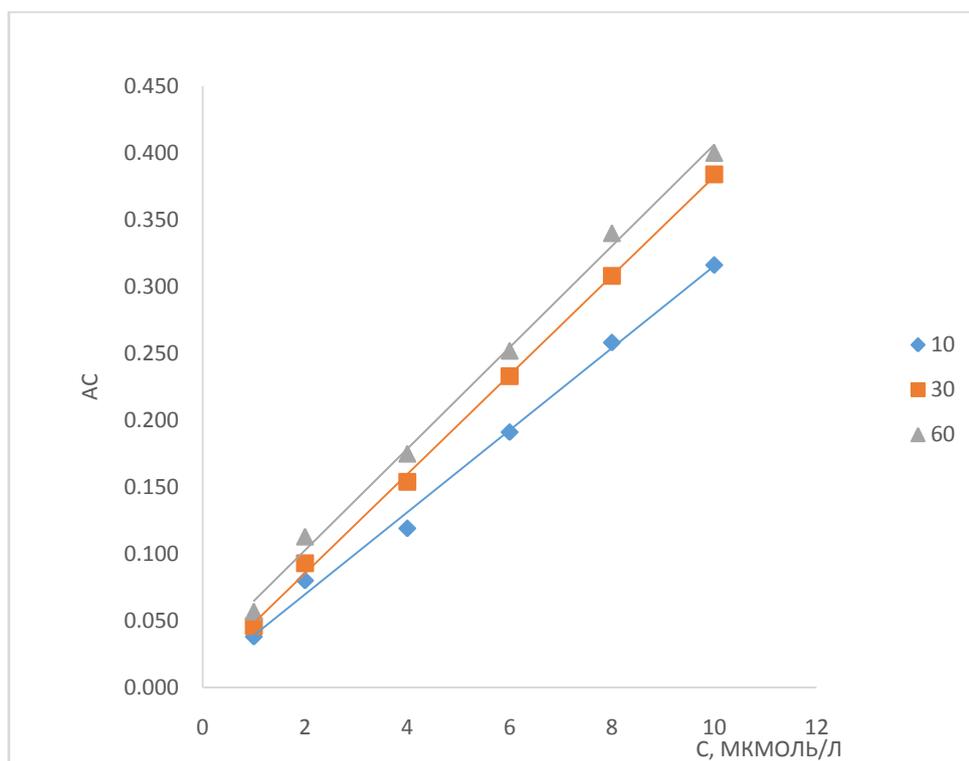


Рисунок 5 – Градуировочный веер аскорбиновой кислоты

На основе изученного отечественного опыта в литературе и полученных экспериментально зависимостей видно, что кверцетин и галловая кислота проявляют себя как восстановители большей силы в сравнении с другими. Однако галловая кислота более

устойчива к изменениям температуры и при хранении, поэтому в качестве стандартного вещества при аттестации была выбрана именно она.

Преимуществом выбранного метода является то, что вся пробоподготовка заключается в разбавлении пробы водой. Для того, чтобы проводить измерения в заданном диапазоне концентраций, измерение антиоксидантной активности проб продуктов проводили при их различном разбавлении.

Перед анализом красного и белого вин было изучено изменение АС от времени экспозиции при разной степени разбавления пробы и постоянном объеме аликвоты 1 см^3 , вводимой в реакцию (рисунок 6, 7).

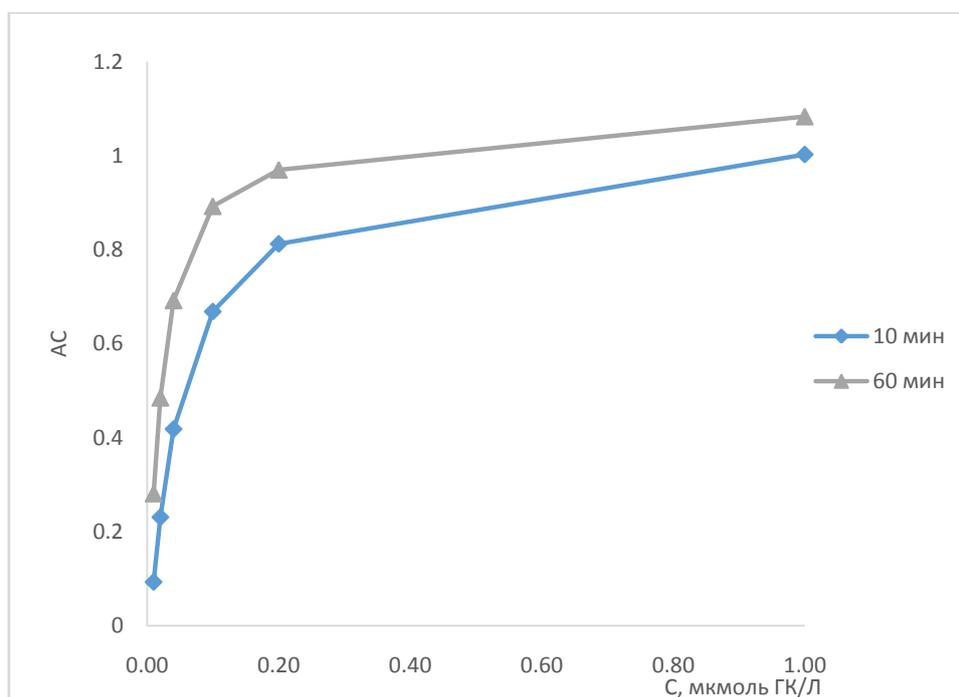


Рисунок 6 – Изменение АС пробы красного вина от степени разбавления образца при разном времени экспозиции

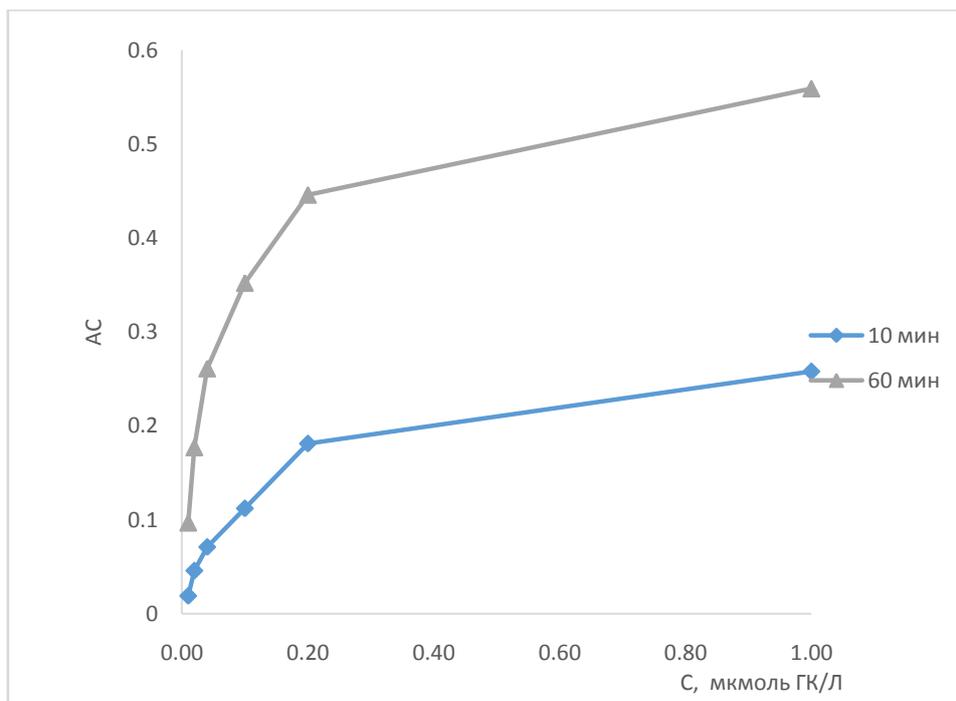


Рисунок 7 – Изменение АС пробы белого вина от степени разбавления образца при разном времени экспозиции

Показано, что при использовании разбавления пробы 1:100 для красных вин и 1:25 для белых вин наблюдается пропорциональный рост аналитического сигнала при введении возрастающего объема пробы (рисунок 8, 9).

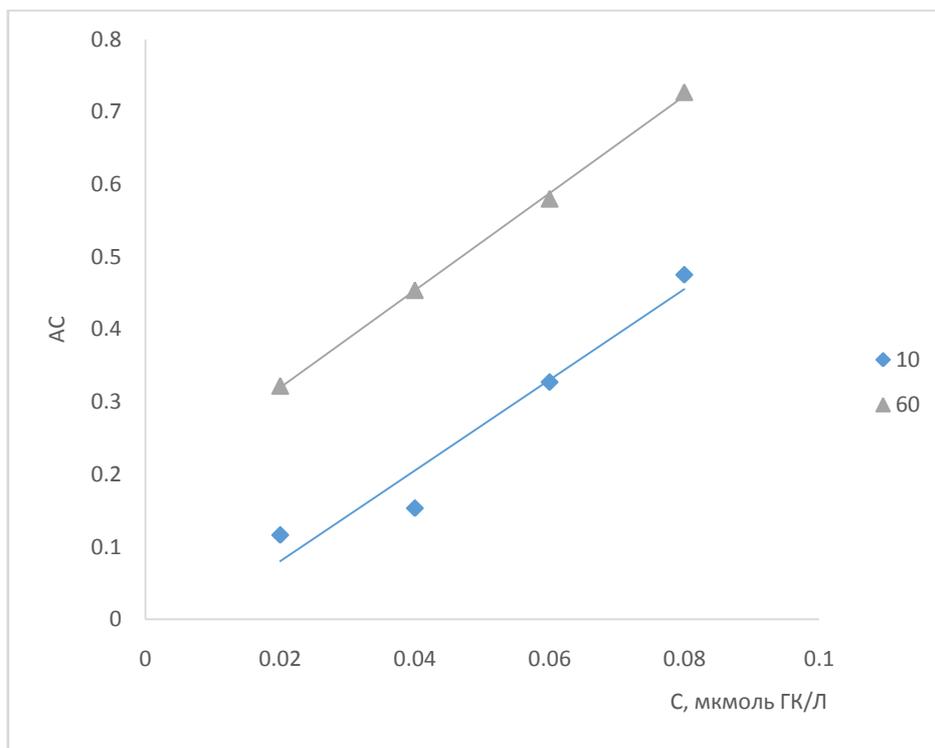


Рисунок 8 – Выбор объема вводимой пробы красного вина при разбавлении 1:100

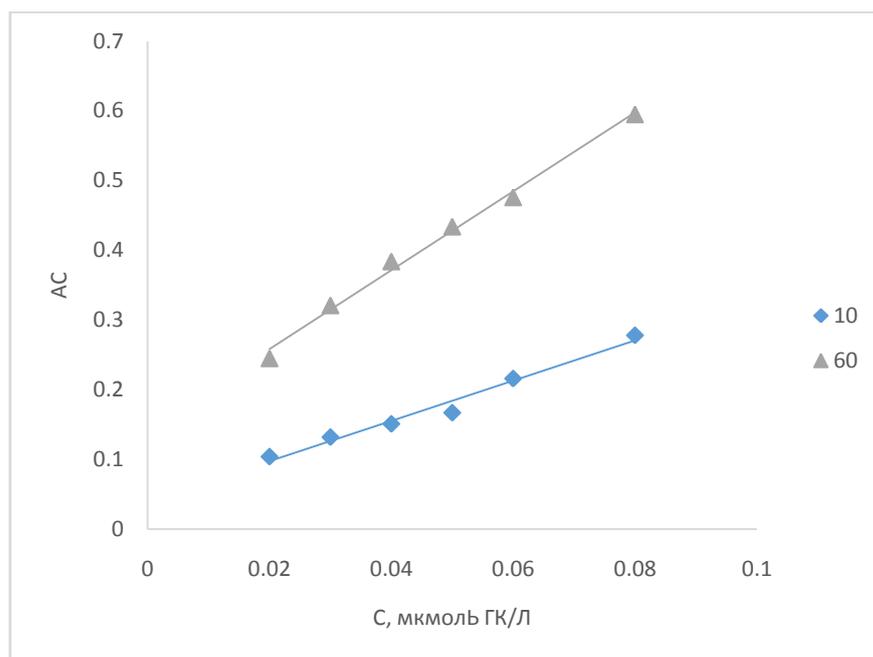


Рисунок 9 – Выбор объема вводимой пробы белого вина при разбавлении 1:25

При анализе коньяка было выявлено пропорциональное возрастание аналитического сигнала при разбавлении 1:10 (рисунок 10).

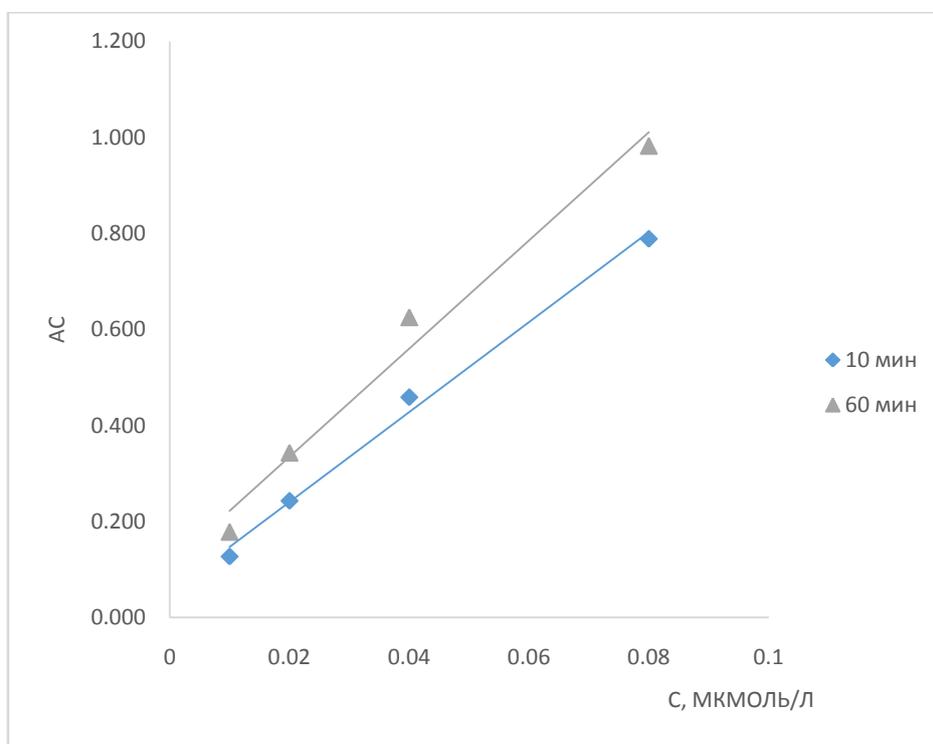


Рисунок 10 – Выбор объема вводимой пробы коньяка при разбавлении 1:10

Перед анализом пива было изучено изменение АС от степени разбавления пробы при постоянном объеме аликвоты 1 см^3 , вводимой в реакцию (рисунок 11, 12).

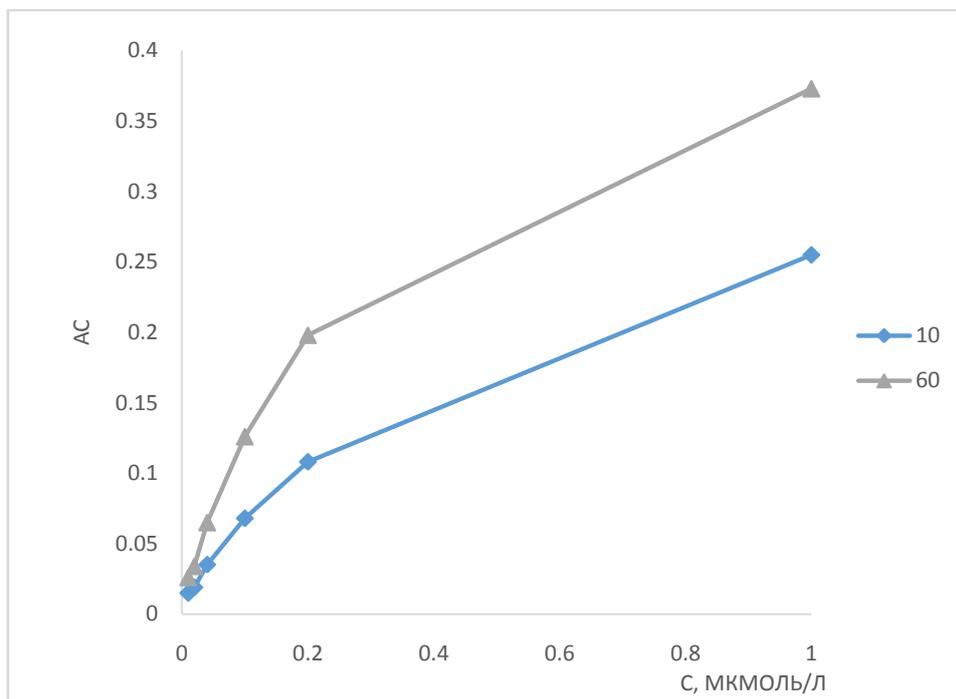


Рисунок 11 – Изменение АС пробы светлого нефilterованного пива от степени разбавления образца при разном времени экспозиции

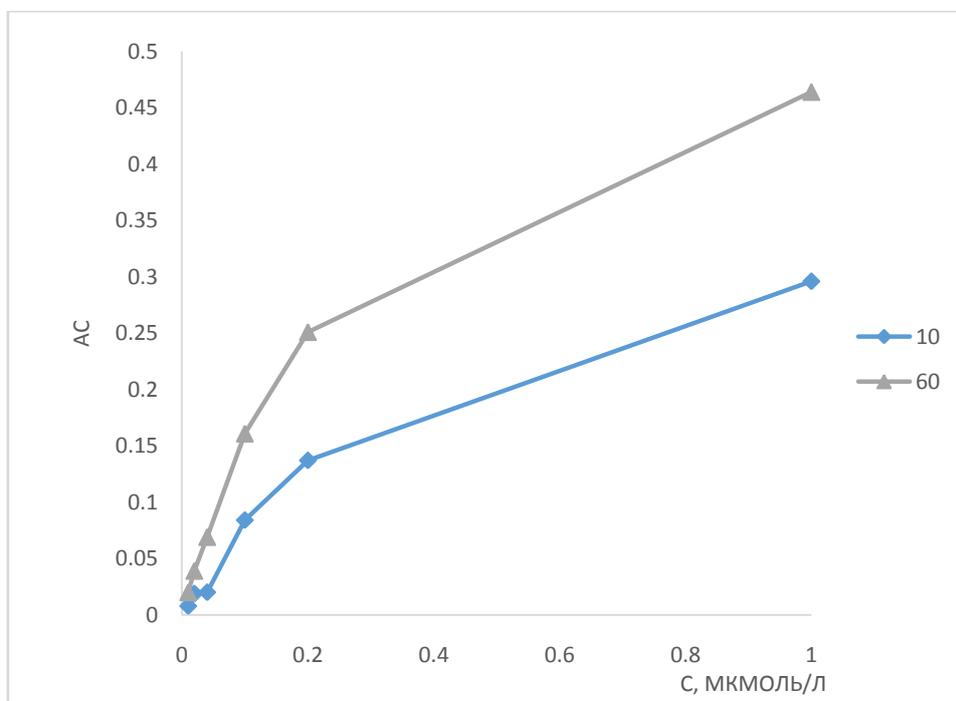


Рисунок 12 – Изменение АС пробы темного нефilterованного пива от степени разбавления образца при разном времени экспозиции

Показано, что при использовании разбавления пробы 1:1 для светлого пива и 1:10 для темного пива наблюдается пропорциональный рост аналитического сигнала при введении возрастающего объема пробы (рисунок 13, 14).

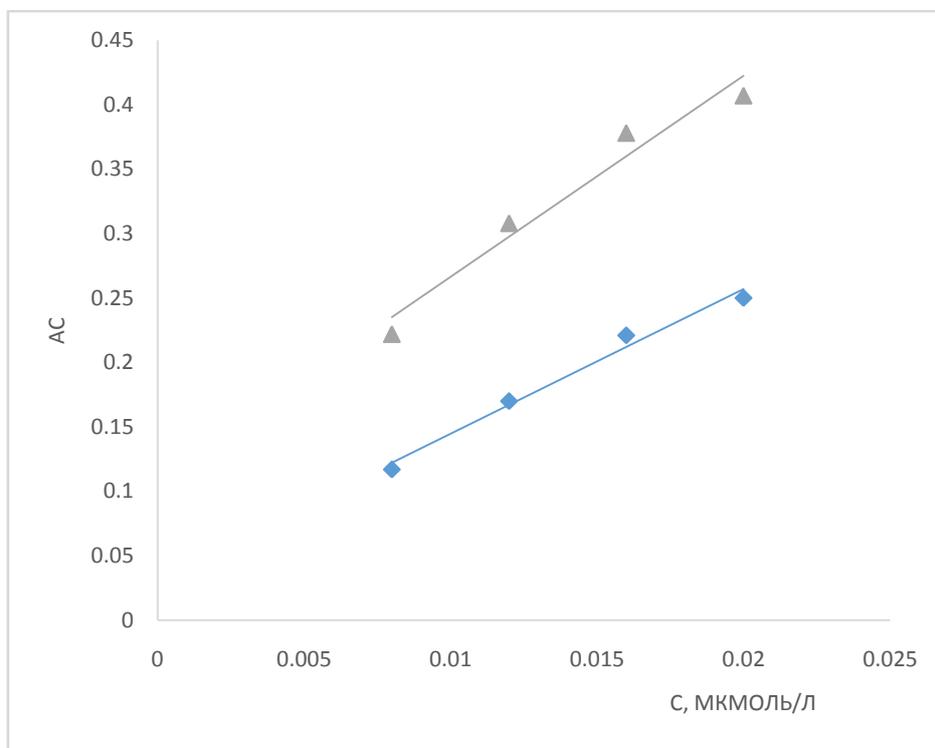


Рисунок 13 – Выбор объема вводимой пробы светлого пива при разбавлении 1:1

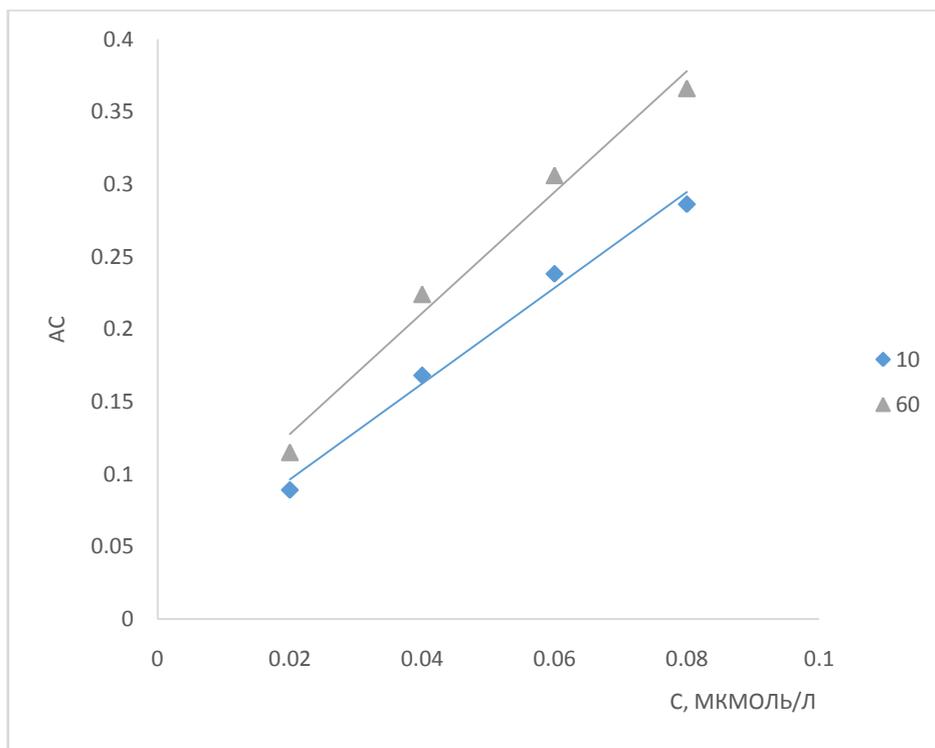


Рисунок 14 – Выбор объема вводимой пробы темного пива при разбавлении 1:10

Условия определения АОА исследуемых продуктов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Условия определения АОА пищевых продуктов

Продукт	Степень разбавления	Объем вводимой добавки, см ³
Вино красное	1:100	1,0-4,0
	1:50	0,5-2,0
Вино белое	1:50	2,0-4,0
	1:25	1,0-2,0
Коньяк	1:10	0,5-2,0
Пиво светлое	1:1	0,2-0,6
Пиво темное	1:10	0,5-2,0

Оценку метрологических характеристик методики проводили согласно ГОСТ Р 8.563-2009 и МИ 2336-2002.

Для образцов каждого из исследуемых продуктов в условиях внутрилабораторной прецизионности было получено по 20 сходимых результатов определения АОА, каждое из которых представляло среднее арифметическое 2-х параллельных определений.

Алгоритм оценивания прецизионности включал в себя расчет показателя разброса, проверку однородности дисперсии по критерию Кохрена и расчет показателей и пределов повторяемости. После расчета среднего измерения находили показатель и предел воспроизводимости. Данные для оценивания прецизионности экспресс-методики по всем пищевым продуктам представлены в таблицах А.1-А.5 (приложение А).

Для оценки правильности и точности методики анализа применили метод добавок. Образцами для исследования являлись рабочие пробы и рабочие пробы с добавкой, которую вносили в виде раствора вещества-стандарта ГК. Данные для оценивания правильности и точности экспресс-методики представлены в таблицах Б.1-Б.5 (приложение Б).

Полученные метрологические характеристики экспресс-методики определения АОА пищевых продуктов на примере сухих вин, нефильтованного пива и коньяка представлены в таблице 2. Полученные показатели повторяемости и воспроизводимости сравнимы с показателями, полученными как по экспресс-методике для индикаторной системы Fe(III) – ортофенантролин, так и по аттестованной ранее методике.

Таблица 2 – Результаты метрологической аттестации экспресс-методики

Продукт	АОА, ммоль ГК/дм ³	Повторяемость, %	Воспроизводи мость, %	Правильность, %	Точность, %
Вино красное	9,3	9,9	5,5	5,2	12,3
Вино белое	2,2	13,2	7,5	11,1	17,4
Коньяк	1,8	1,8	7,5	1,9	15,9
Пиво светлое	0,5	4,3	3,8	5,9	9,4
Пиво темное	0,5	2,6	3,5	3,8	7,7

Полученные исходные данные и проведенные расчеты были использованы при проведении метрологической аттестации методики определения АОА «Экспресс-определение антиоксидантной активности пищевых продуктов спектрофотометрическим методом» (таблица 3). Объединенные метрологические характеристики для систем Fe(III)-органический реагент (*o*- фенантролин, 2,2-дипиридил) представлены в таблице 4.

Таблица 3 – Диапазоны измерений, относительные значения показателей точности, повторяемости и воспроизводимости методики для проведения определений АОА при доверительной вероятности P=0,95

Наименование продукта	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ_r , %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), σ_R , %	Показатель правильности (границы систематической погрешности), $\pm\Delta_c$, %	Показатель точности (границы относительной погрешности), $\pm\delta$, %
Вино красное	9,9	5,5	4,7	8,1
Вино белое	13,2	7,5	11,6	16,6
Коньяк	1,8	7,5	2,9	6,8
Пиво светлое	4,4	3,8	6,6	11,8
Пиво темное	2,6	3,4	6,3	13,9
Кофе растворимый	7,3	7,7	2,4	16,6
Кофе натуральный	4,4	4,9	2,9	9,2

Продолжение таблицы 3

Наименование продукта	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ_r , %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), σ_R , %	Показатель правильности (границы систематической погрешности), $\pm\Delta_c$, %	Показатель точности (границы относительной погрешности), $\pm\delta$, %
Чай черный	2,4	3,4	4,7	14,0
Чай зеленый	1,9	4,4	5,6	15,9

Таблица 4 – Диапазоны измерений, относительные значения показателей точности, повторяемости и воспроизводимости методики для проведения определений антиоксидантной активности с использованием индикаторных систем Fe(III)-о-фенантролин или Fe(III)-2,2-дипиридил при доверительной вероятности P=0,95

Наименование продукта, диапазон измерений антиоксидантной активности, ммоль/дм ³ или ммоль/г (по ГК)	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ_r , %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), σ_R , %	Показатель правильности (границы систематической погрешности), $\pm\Delta_c$, %	Показатель точности (границы относительной погрешности), $\pm\delta$, %
Пищевой продукт, 0,1 –10	10	7	8	20

Предлагаемая методика прошла метрологическую аттестацию: свидетельство № С.42.02067847.08. RA.RU. 322345–2018 от 10.12.2018 (приложение В).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1 На основе литературных и наших экспериментальных данных показана актуальность метрологической аттестации экспресс-методики определения антиоксидантной активности пищевых продуктов с использованием индикаторной системы Fe(III) – 2,2'-дипиридил. В качестве объектов исследования выбраны пищевые продукты с различной антиоксидантной активностью (ммоль ГК/дм³): 9,3 – красное сухое вино, 1,2 – белое сухое вино, 0,49 – светлое нефилтрованное пиво, 0,71 – темное нефилтрованное пиво, 2,26 – коньяк.

2 Для экспресс-определения проведено варьирование степени разбавления образца и выбор объема аликвоты пробы, вводимой в реакцию: для образцов красного сухого вина – разбавление 1:100, $V_{\text{пробы}} 1-4\text{см}^3$; белого сухого вина – разбавление 1:25, $V_{\text{пробы}} 1-2\text{см}^3$; пива светлого нефилтрованного – разбавление 1:1, $V_{\text{пробы}} 0,2-0,6\text{см}^3$; пива темного нефилтрованного – разбавление 1:10, $V_{\text{пробы}} 0,5-2\text{см}^3$; коньяка – разбавление 1:10, $V_{\text{пробы}} 0,5-2\text{см}^3$.

3 Для проведения метрологической аттестации методики экспресс-определения антиоксидантной активности получен массив данных, включающий результаты определения антиоксидантной активности красного сухого вина, белого сухого вина, светлого нефилтрованного пива, темного нефилтрованного пива, коньяка и антиоксидантной активности проб с добавкой стандартного вещества – галловой кислоты.

Проведена метрологическая аттестация экспресс-методики определения антиоксидантной активности пищевых продуктов и получены следующие объединенные метрологические характеристики: показатель повторяемости (σ_r) – 10%, показатель воспроизводимости (σ_R) – 7%, показатель правильности ($\pm\Delta_c$) – 8%, показатель точности ($\pm\delta$) – 20%.

Предлагаемая методика прошла метрологическую аттестацию: свидетельство № С.42.02067847.08. RA.RU. 322345–2018 от 10.12. 2018

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Лагута, И. В. Анализ антиоксидантных свойств экстрактов растений (Представлено академиком НАН Украины Н. Т. Картелем) / И. В. Лагута и др. // Институт химии поверхности им. А. А. Чуйко, НАН Украины, Киев; заявлено 29.12.2014; опубл. 2015, № 5 – 8 с.
- 2 Дворкин, В. И. Метрология и обеспечение качества количественного химического анализа: монография / В. И. Дворкин. – М.: Химия, 2001. – 263 с.
- 3 Гимадиева, А. Р. Экспресс-оценка антиоксидантной активности производных урацила / А.Р. Гимадиева и др. // Биомедицинская химия. Краткие сообщения. – 2015. – № 6. – С. 765-769.
- 4 Büyüktinçel, E. Comparison of Total Phenolic Content and Total Antioxidant Activity in Local Red Wines Determined by Spectrophotometric Methods / E. Büyüktinçel, E. Porgali1, C. Colak (Turkey). – Received 22.06.2014; accepted 7.08.2014. – 9 p.
- 5 Balasundram, N. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses / N. Balasundram, K. Sundram, S. Samman // Food chemistry. – 2006. – № 1. – P. 191-203.
- 6 Шаталов, Д. О. Антиоксиданты, как перспектива снижения заболеваний системы кровообращения, возникающих по причине ухудшающейся экологической обстановки / Д.О. Шаталов и др. // Вестник СГНЭ. – 2015. – № 3. – 7 с.
- 7 Milovanovi, M. Antioxidant activities of the constituents of *Picris echioides*: Original scientific paper / M. Milovanovi and others. – Belgrade: Department of Food Technology, Faculty of Agriculture, University of Belgrade. – 2001. – 9с.
- 8 Percival, M. Antioxidants / Dr. Mark Percival. – Clinical nutrition insights NUT031 01.1996 Rev. 10.1998. – 4с.
- 9 Самойлова, З. Ю. Изучение антиоксидантного действия растительных экстрактов на бактерии *escherichia coli*: 03.00.07 Микробиология: автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. Биол. Наук (01.10.2009) / Самойлова Зоя Юрьевна; Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН. – Пермь, 2009. – 26 с.
- 10 Герасёв, А. Д. Коррекция антиоксидантами морфологических изменений в печени после ишемии головного мозга / Организационный комитет: А. Д. Герасёв и др. // Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине: Материалы Международной научно-практической конференции ФГБОУ ВПО «НГПУ». – Новосибирск, 2013. – С. 3-7.

11 Charles, D. J. Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources / Denys J. Charles. – Norway: Springer Science+Business Media New York, 2013. – 589 p.

12 Бельтюкова, С. В. Антиоксиданты в пищевых продуктах и методы их определения / С. В. Бельтюкова, А. А. Степанова, Е. О. Ливенцова // Вестник ОНУ. Химия. – 2014. – № 4. – 16 с.

13 Yashin, A. Determination of Antioxidant Activity in Tea Extracts, and Their Total Antioxidant Content / A. Yashin, Y. Yashin, B. Nemzer // Biomedical Sciences. – 2011. – № 3. – P. 322-335.

14 Бодорев, М. М. Совершенствование оценки потребительских свойств алкогольных и безалкогольных напитков на основе определения антиоксидантной активности: 05.18.15: автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. технич. наук: 17.04.2011 / Бодорев Максим Михайлович; ГОУ ВПО МГУТУ. – Москва, 2009. – 26 с.

15 Тарун, Е. И. Сравнение антиоксидантной активности галловой, кофейной и хлорогеновой кислот [электронный ресурс]/ Е. И. Тарун, В. П. Курченко. – Электрон. текстовые дан. – Минск. – Режим доступа: http://elib.bsu.by/bitstream/123456789/177657/1/ilovepdf_com-51-56.pdf свободный.

16 Stratil, P. Comparison of the Phenolic Content and Total Antioxidant Activity in Wines as Determined by Spectrophotometric Methods Pavel Stratil, Vlastimil KUBÁŇ and Jitka Fojtová Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Brno, Czech Republic / P. Stratil, V. Kubáň J. Fojtová // Czech J. Food Sci. – 2008. – № 4. – P. 242–253.

17 Шарафутдинова, Е. Н. Качество пищевых продуктов и антиоксидантная активность / Е.Н. Шарафутдинова и др. // Аналитика и контроль. – 2011. – № 3. – 6 с.

18 Шарафутдинова, Е. Н. Качество пищевых продуктов и антиоксидантная активность / Е.Н. Шарафутдинова и др. // Аналитика и контроль. – 2011. – № 3. – 6 с.

19 Рогинский, В.А. Фенольные антиоксиданты. Реакционная способность и эффективность / В.А.Рогинский. – Москва: Академия наук СССР, 1988. – 247 с.

20 Бидарова, Ф. Н. Экспресс-методы оценки антиокислительной и антирадикальной активности органических субстратов / Ф. Н. Бидарова и др. // СОГМА. – Владикавказ, 2014. – 33 с.

21 Tirzitis, G. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights: review / G. Tirzitis, G. Bartosz // Acta Biopoilemica Polonica. – 2010. – Vol. 57 №1. – P. 139-142.

22 Ибатов, М. К. Раздел 5. «Химические технологии. Безопасность жизнедеятельности» / М.К. Ибатов и др. // Scientific magazine. – 1991. – № 5. – С. 90-102.

23 Бриленок, Н. С. Оценка антиоксидантной активности полифенолов по методу FRAP в присутствии комплексантов / Н.С. Бриленок, В.И.Вершинин, М.В. Бахарева // Аналитика и контроль. – 206. – № 3. – С. 209-217

24 Чупрынина, Д. А. Методические аспекты оценки суммарной антиоксидантной активности пищевых продуктов в условиях *in vitro* с использованием интегральных показателей состава: 02.00.02 – аналитическая химия: автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. юрид. Наук / Чупрынина Дарья Александровна; ФГБОУ ВПО «Кубанский государственный университет». – Краснодар, 2013. – 26 с.

25 Цюпко, Т. Г. Аналитические решения при определении некоторых показателей безопасности и качества пищевых продуктов: автореф. дис. на соиск. учен. степ. докт. хим. наук: Цюпко Татьяна Григорьевна; ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет». – Краснодар, 2012 – 48 с.

26 RONALD, L. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements / L. Ronald, WU Xianli, Karen Schaich // Agricultural and food chemistry. – 2005. - №53. – P. 4290-4302.

27 Шарафутдинова, Е. Н. Качество пищевых продуктов и антиоксидантная активность / Е.Н. Шарафутдинова и др. // Аналитика и контроль. Т. 15. – 2011. – № 3. – С. 281-286.

28 Ульянова, Е. В. Высокоэффективная жидкостная хроматография в исследовании протекторных свойств вин в условиях окислительного стресса: 02.00.04 – физическая химия: автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. юрид. наук (06.09.2011) / Ульянова Екатерина Владимировна; РАН (ИФХЭ РАН). – Москва, 2011. – 24 с.

29 Плисс, Е. М. Кинетика гомолитических жидкофазных реакций: учебное пособие / Е. М. Плисс, Е. Т. Денисов. – Ярославль: ЯрГУ, 2015. – 312 с.

30 Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю. А. Владимиров // Биология. – Москва, 2000. – 7 с.

31 Кубышкин, А. В. Полифенолы винограда красных сортов в вине и концентратах для применения в реабилитационных технологиях / А.В. Кубышкин и др. // Сельскохозяйственная биология. – 2017. – № 3. – С. 622-630.

32 Лапин, А.А. Определение антиоксидантной активности вин кулонометрическим методом: научно-методическое пособие / А.А. Лапин и др. – М.:РАЕН, 2009. – 64 с.

33 Барабой, В. А. Фенольные соединения виноградной лозы: структура, антиоксидантная активность, применение [Электронный ресурс] // Режим доступа:

http://biotechnology.kiev.ua/storage/2009/%232_2009/Baraboy%232_2009.pdf. – (дата обращения 24.04.19).

34 Огенко, В. М. Колебательные и ориентационные состояния поверхностных гидроксильных групп / В.М. Розенбаум, В.М.Огенко, А.А. Чуйко // Химия, физика и технология поверхности. – 1993. – № 3. – С. 36-65.

35 Mitić, M. N. Antioxidant activity and polyphenol profile of Vranac red wines from Balkan region / Milan N. Mitić and others // Scientific paper. – 2016. – P. 254-275.

36 Ульянова, Е.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография в исследовании антиоксидантных свойств вин / Е.В. Ульянова, О.Г. Ларионов, А.А. Ревина // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2010. – № 4. – 11 с.

37 Давидович, Е.А. Антиоксидантные свойства и качество натуральных красных и белых сухих вин // Пищевая и перерабатывающая промышленность. Реферативный журнал. – 2010. - №4. – С. 10-37.

38 Николаева, Н. А. Определение суммарного содержания антиоксидантов в винах с применением железосодержащих индикаторных систем: 02.00.02 - аналитическая химия: автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. хим. наук (15.12.2011) / Николаева Наталья Александровна; ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет». – Краснодар, 2011. – 27 с.

39 Кустова, И. А. Разработка технологии новых пищевых продуктов с использованием экстрактов из вторичного виноградного сырья: дис. на соиск. учен. степ. канд. технич. Наук / Кустова Ирина Андреевна; ФГБОУ ВО «Самарский государственный технический университет». – Самара, 2016. – 186 с.

40 Зиятдинова, Г. К Реакции антиоксидантов коньяка с электрогенерированными окислителями / Г. К. Зиятдинова //Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки, 2013, Т. 155, № 1. - С. 78-86.

41 Иванова, Е.Г. Антиоксиданты для улучшения вкуса и стабильности пива // Пиво и напитки. – 2004. - № 2. – С.25.

42 Наумова, Н. Л. Современный взгляд на проблему исследования антиоксидантной активности пищевых продуктов: обзорная статья / Н.Л. Наумова. – Челябинск: Вестник ЮУрГУ. Серия «Пищевые биотехнологии», 2014 – С. 5-8.

43 Хасанов, В. В. Методы исследования антиоксидантов / В.В. Хасанов, Г.Л. Рыжова, Е.В. Мальцева // Химия растительного сырья. – 2004. - №3. – С. 63-75.

44 Темердашев, З. А. 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. - №11 – С.15-19.

45 Об обеспечении единства измерений. – Принят Государственной Думой 11.06.2008. – Москва, Кремль, 26.06.2008. – N 102-ФЗ. – 23 с.

46 Гинс, М.С. Перспективные источники получения натуральных пищевых красителей из растительного сырья / М.С. Гинс, Е.К. Платонова, С.Ю. Платонова // Биохимия растений. – Москва. – С. 34-41.

47 Цюпко, Т. Г. Определение суммарного содержания антиоксидантов методом FRAP / Т.Г. Цюпко и др. // Аналитика и контроль. – 2011. – Т. 15, №3. – С. 287-298.

48 Анисимович, И. П. Параметры антиоксидантной активности соединений: относительная антиоксидантная активность чая / И. П. Анисимович и др. // Научные ведомости. Серия: Естественные науки. – 2010. -№9, выпуск 11. – С. 104-110.

49 Беляков, Н. А. Антиоксидантная активность биологических жидкостей человека: методология и клиническое значение / Н.А.Беляков, С.Г.Семесько // Эфферентная терапия. – 2005. – № 1. – С. 5-21.

50 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. Вишникин, Л.П. Цыганок // Аналитика и контроль. – 2015. – № 4. – С. 373-380.

51 ОСТ 95 10430-2001. Отраслевая система обеспечения единства измерений. Порядок проведения аттестации методик выполнения измерений. – Взамен ОСТ 95 10351-88. – Введен 2010-04-15. – Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии. – М.: Стандартиформ, 2010. – 24 с.

52 ГОСТ 8.010-2013 Государственная система обеспечения единства измерений (ГСИ). Методики выполнения измерений. Основные положения. – Введен 2015-03-01. – Введен Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии. – 27 с.

53 ГОСТ Р 8.563-2009 Государственная система обеспечения единства измерений (ГСИ). Методики (методы) измерений. – Взамен ГОСТ Р 8.563—96. – Введен 15.12.2009 – Москва: стандартиформ, 2011. – 20 с.

54 ОСТ 95 10351-2001. Стандарт отрасли. Отраслевая система обеспечения единства измерений Общие требования к методикам выполнения измерений. – Взамен ОСТ 95 10351-88. – Дата введения 2001-11-01. – центр Российской Федерации ВНИИ неорганических материалов имени академика. – 51 с.

55 Об утверждении Порядка метрологической аттестации методики (метода) измерений. – Утвержден Решением Совета ЕЭК. – 17.03.2016. – N 21. – 20 с.

56 ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. – введен 2002-11-01. – М.: Стандартиформ, 2009. – 32 с.

57 ОСТ 95 10289-2005 Стандарт отрасли. Отраслевая система обеспечения единства измерений Внутренний контроль качества измерений. – Взамен ОСТ 95 10289-98. – введения 2005-06-01. – Введен Федеральным агентством по атомной энергии. – 51 с.

58 Р 50.2.090-2013 ГСИ Методики количественного химического анализа. Общие требования к разработке, аттестации и применению. – Введен 2015-01-01 Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии. – 17 с.

59 Громов, А. С. Управление качеством при разработке и аттестации методик выполнения измерений: автореферат дис. ... кандидата технических наук: 05.02.23 / Громов Алексей Сергеевич; МГУПБ. – Москва, 2009. – 23 с.

60 Агранович, Т. В. Особенности аттестации методик измерений в институте стандартных образцов / Т.В. Агранович, И.В. Туремская, Е.И. Чиканцева // Стандартные образцы. – 2012. - №4. – С. 51-53.

61 Владимирова, Л. И. Программное обеспечение для автоматизации процесса аттестации методик анализа и средств измерений в аналитических лабораториях / Л. И. Владимирова, Г. В. Павлинский // Аналитика и контроль. – 1999. – Т.3 №4. – С. 44-47.

62 РМГ 61-2010. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. – введен 2012-09-01. – Введен межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации. – 62 с.

63 Здоровенина, А. О. Метрологические основы аттестации методик выполнения измерений // Пищевая промышленность. – 2006. – С. 36-37.

64 Богданенко, Н. А. Общие требования к порядку метрологических исследований для аттестации методик выполнения измерений / Н. А. Богданенко, Ю. С. Степанов // Медицина экстремальных ситуаций. – 2012. – С. 64-71.

65 МИ 2336-2002 ГСИ. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. Рекомендация. – Введен 24.10.2002 госстандартом России. – 57 с.

66 Ванчикова, Е. В. Аттестация методик количественного химического анализа / Е. В. Ванчикова, Б. М. Кондратёнок // Вестник института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН. – 2012. - №1. – С. 19-24.

67 Бегунов, А. А. Аттестация методики выполнения измерений / А. А. Бегунов, Г. И. Шевцов, И. А. Фридман // Вестник Всероссийского научно-исследовательского института жиров. – 2010. - №2. – С. 24-28.

68 РМГ 63—2003. Рекомендации по межгосударственной стандартизации. – Дата введения 2005-01-01. – Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации. – N 24 5.12.2003. – ИПК Издательств стандартов, Москва. – 16 с.

69 Рекомендации по метрологии Р 50.2.008—2001. Государственная система обеспечения единства измерений. Методики количественного химического анализа. Содержание и порядок проведения метрологической экспертизы. – Введен 2002-01-01. – Постановлением Госстандарта России от 20 июня 2001 г. N 244-ст. – 35 с.

70 ГОСТ Р 8.884-2015. Государственная система обеспечения единства измерений. Метрологический надзор, осуществляемый метрологическими службами юридических лиц. Основные положения. – Введен техническим комитетом ТК 53 «Основные нормы и правила по обеспечению единства измерений». – 4.06.2015. – 15 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Данные для оценивания прецизионности экспресс-методики

Таблица А.1 – Результаты единичного анализа образцов красного сухого вина для оценивания прецизионности

Номер результата анализа (L)	X ₁	X ₂
1	10,20	8,55
2	8,77	10,09
3	8,52	9,50
4	8,63	8,63
5	8,55	10,23
6	8,88	9,98
7	11,04	9,61
8	8,48	10,67
9	8,41	8,88
10	8,59	9,10
Среднее значение	9,27	

Таблица А.2 – Результаты единичного анализа образцов белого сухого вина для оценивания прецизионности

Номер результата анализа (L)	X ₁	X ₂
1	1,10	1,15
2	1,36	1,07
3	1,28	1,27
4	1,28	1,46
5	1,08	1,22
6	0,99	1,35
7	1,05	1,42
8	1,06	1,08
9	1,15	1,08
10	1,09	1,38
Среднее значение	1,20	

Таблица А.3 – Результаты единичного анализа образцов коньяка для оценивания прецизионности

Номер результата анализа (L)	X ₁	X ₂
1	2,46	2,47
2	2,49	2,41
3	2,44	2,43
4	2,34	2,36
5	2,38	2,43
6	2,09	2,17
7	2,12	2,13
8	2,14	2,11

Продолжение таблицы А.3

Номер результата анализа (L)	X ₁	X ₂
9	2,09	1,98
10	2,10	2,15
Среднее значение	2,26	

Таблица А.4 – Результаты единичного анализа образцов светлого пива для оценивания прецизионности

Номер результата анализа (L)	X ₁	X ₂
1	0,49	0,51
2	0,46	0,46
3	0,47	0,52
4	0,48	0,51
5	0,50	0,52
6	0,51	0,47
7	0,52	0,49
8	0,52	0,47
9	0,49	0,46
10	0,46	0,51
Среднее значение	0,49	

Таблица А.5 – Результаты единичного анализа образцов темного пива для оценивания прецизионности

Номер результата анализа (L)	X ₁	X ₂
1	0,71	0,69
2	0,69	0,64
3	0,73	0,71
4	0,71	0,69
5	0,75	0,74
6	0,69	0,72
7	0,71	0,73
8	0,69	0,73
9	0,69	0,72
10	0,75	0,75
Среднее значение	0,71	

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Данные для оценивания правильности и точности экспресс-методики

Таблица Б.1 – Результаты анализа пробы и пробы с добавкой при использовании метода добавок для красного сухого вина

Номер результата анализа (L)	Результаты анализа пробы без добавки (АОА, ммоль ГК/дм ³)	Результаты анализа пробы с добавкой (АОАд, ммоль ГК/дм ³)	Значение экспериментально найденной величины добавки (Сд.р., ммоль ГК/дм ³)	Величина добавки Сд, ммоль ГК/дм ³
1	8,48	18,05	9,57	10,00
2	8,33	17,90	9,57	
3	8,91	17,98	9,06	
4	8,99	18,71	9,72	
5	8,69	17,69	8,99	
6	9,57	19,37	9,79	
7	9,57	19,37	9,79	
8	8,99	19,07	10,08	
9	9,21	18,71	9,50	
10	9,50	18,86	9,35	
Lcp	9,00	18,60	9,50	

Таблица Б.2 – Результаты анализа пробы и пробы с добавкой при использовании метода добавок для белого сухого вина

Номер результата анализа (L)	Результаты анализа пробы без добавки (АОА, ммоль ГК/дм ³)	Результаты анализа пробы с добавкой (АОАд, ммоль ГК/дм ³)	Значение экспериментально найденной величины добавки (Сд.р., ммоль ГК/дм ³)	Величина добавки Сд, ммоль ГК/дм ³
1	1,17	2,33	1,16	1,25
2	1,13	2,20	1,06	
3	1,47	2,47	1,00	
4	1,21	2,41	1,19	
5	1,40	2,41	1,00	
6	1,58	2,69	1,11	
7	1,42	2,45	1,03	
8	1,38	2,58	1,19	
9	1,15	2,30	1,15	

Продолжение таблицы Б.2

Номер результата анализа (L)	Результаты анализа пробы без добавки (АОА, ммоль ГК/дм ³)	Результаты анализа пробы с добавкой (АОАд, ммоль ГК/дм ³)	Значение экспериментально найденной величины добавки (Сд.р., ммоль ГК/дм ³)	Величина добавки Сд, ммоль ГК/дм ³
10	1,10	2,15	1,05	1,25
Ср	1,30	2,40	1,09	

Таблица Б.3 – Результаты анализа пробы и пробы с добавкой при использовании метода добавок для коньяка

Номер результата анализа (L)	Результаты анализа пробы без добавки (АОА, ммоль ГК/дм ³)	Результаты анализа пробы с добавкой (АОАд, ммоль ГК/дм ³)	Значение экспериментально найденной величины добавки (Сд.р., ммоль ГК/дм ³)	Величина добавки Сд, ммоль ГК/дм ³
1	2,09	4,16	2,07	2,00
2	2,17	4,12	1,95	
3	2,12	4,19	2,07	
4	2,13	4,11	1,98	
5	2,14	4,20	2,06	
6	2,11	4,09	1,98	
7	2,09	4,12	2,03	
8	1,98	4,14	2,16	
9	2,10	4,17	2,07	
10	2,15	4,14	1,99	
Ср	2,10	4,14	1,99	

Таблица Б.4 – Результаты анализа пробы и пробы с добавкой при использовании метода добавок для светлого пива

Номер результата анализа (L)	Результаты анализа пробы без добавки (АОА, ммоль ГК/дм ³)	Результаты анализа пробы с добавкой (АОАд, ммоль ГК/дм ³)	Значение экспериментально найденной величины добавки (Сд.р., ммоль ГК/дм ³)	Величина добавки Сд, ммоль ГК/дм ³
1	0,50	1,00	0,49	0,50
2	0,46	0,94	0,47	
3	0,52	1,03	0,51	
4	0,51	1,03	0,52	
5	0,52	1,03	0,51	

Продолжение таблицы Б.4

Номер результата анализа (L)	Результаты анализа пробы без добавки (АОА, ммоль ГК/дм ³)	Результаты анализа пробы с добавкой (АОАд, ммоль ГК/дм ³)	Значение экспериментально найденной величины добавки (Сд.р., ммоль ГК/дм ³)	Величина добавки Сд, ммоль ГК/дм ³
6	0,47	1,03	0,55	0,50
7	0,49	0,98	0,49	
8	0,46	0,95	0,48	
9	0,46	0,96	0,49	
10	0,51	1,04	0,53	
Ср	0,49	1,00	0,51	

Таблица Б.5 – Результаты анализа пробы и пробы с добавкой при использовании метода добавок для темного пива

Номер результата анализа (L)	Результаты анализа пробы без добавки (АОА, ммоль ГК/дм ³)	Результаты анализа пробы с добавкой (АОАд, ммоль ГК/дм ³)	Значение экспериментально найденной величины добавки (Сд.р., ммоль ГК/дм ³)	Величина добавки Сд, ммоль ГК/дм ³
1	0,69	1,18	0,49	0,50
2	0,71	1,25	0,53	
3	0,70	1,21	0,51	
4	0,73	1,24	0,51	
5	0,68	1,20	0,51	
6	0,72	1,25	0,52	
7	0,65	1,21	0,56	
8	0,76	1,26	0,50	
9	0,74	1,21	0,46	
10	0,75	1,21	0,46	
Ср	0,71	1,22	0,50	

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Свидетельство об аттестации методики измерений

МИНИСТЕРСТВО ПРИРОДНЫХ РЕСУРСОВ И ЭКОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральная служба по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды
(Росгидромет)

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ГИДРОХИМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ»

344090, г. Ростов-на-Дону
пр. Стачки, 198

Факс: (863) 222-44-70
Телефон (863) 297-51-63
E-mail: info@gidrohim.com

СВИДЕТЕЛЬСТВО

об аттестации методики измерений
№ С.42.02067847.08.RA.RU.311345-2018

Методика экспресс-определения антиоксидантной активности пищевых продуктов спектрофотометрическим методом,

разработанная федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Кубанский государственный университет», 350040, г. Краснодар, ул. Ставропольская, д. 149

и регламентированная МИ 02067847.08-2018 «Экспресс-определение антиоксидантной активности пищевых продуктов спектрофотометрическим методом» на 18 с.,

аттестована в соответствии с Приказом Минпромторга от 15.12.2015 г. № 4091.

Аттестация осуществлена по результатам метрологической экспертизы и экспериментальных исследований.

В результате аттестации установлено, что методика измерений соответствует метрологическим требованиям, приведенным в Федеральном законе от 26.06.2008 г. № 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений».

Показатели повторяемости, воспроизводимости, правильности и точности приведены в приложении на 1 л., являющемся неотъемлемой частью настоящего свидетельства.

Директор ФГБУ «ГХИ»

Главный метролог

Дата выдачи свидетельства 10.12.2018.



М.М. Трофимчук

А.А. Назарова