



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **69294** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
A61P 39/06 (2006.01)
A61K 36/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2011 11787</p> <p>(22) Дата подання заявки: 06.10.2011</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.04.2012</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2012, Бюл.№ 8</p>	<p>(72) Винахідник(и): Євлаш Вікторія Владленівна (UA), Аксьонова Олена Федорівна (UA), Отрошко Наталія Олександрівна (UA), Акмен Вікторія Олександрівна (UA), Михайленко Володимир Григорович (UA), Д'яков Олександр Георгійович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ХАРКІВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧУВАННЯ ТА ТОРГІВЛІ, вул. Клочківська, 333, м. Харків, 61051 (UA)</p>
---	---

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ІНТЕГРАЛЬНОЇ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ ВОДНИХ ЕКСТРАКТІВ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ ТА ДІЄТИЧНИХ ДОБАВОК

(57) Реферат:

Спосіб оцінки інтегральної антиоксидантної активності водних екстрактів рослинної сировини та дієтичних добавок включає підготовку водних екстрактів рослинної сировини та дієтичних добавок. Після окислюють їх бромом. Потім розраховують антиоксидантну активність. При цьому індикацію завершення кулонометричного титрування здійснюють вимірюванням окисно-відновного потенціалу системи.

UA 69294 U

Корисна модель належить до харчової промисловості, фармакології, фармації і може бути використана для оцінки антиоксидантної активності водних екстрактів різних видів рослинної сировини, в тому числі харчових продуктів, дієтичних добавок і біологічно активних добавок (БАДів).

5 Антиоксидантна активність (АОА) водних екстрактів рослинної сировини є показником якості, що характеризує її відновлюючі властивості, тобто здатність вступати в реакцію з вільними радикалами - активними формами кисню (АФК), які з'являються в організмі у присутності кисню, при його неповному відновленні з утворенням наступних частинок:

- 10 - супероксидний аніон-радикал ($O_2^{\cdot-}$),
- гідропероксидний радикал ($HO_2\cdot$);
- пероксид водню (H_2O_2);
- гідроксил радикал ($HO\cdot$) і ін.

У разі гіпероксидування, АФК організму можуть виступати в ролі радикалів, що атакують ліпіди в клітинних мембранах, білки тканин, ензими, полісахариди і ДНК. Процес старіння і важкі захворювання пов'язані з ушкодженням організму людини активним кисневмісними радикалами, особливо при їх надлишку або при зниженні активності ендогенної антиоксидантної системи організму людини. Для підтримки необхідної концентрації в організмі вільних радикалів використовуються лікарські препарати або біологічно активні речовини, у тому числі у вигляді харчових продуктів, дієтичних добавок або БАДів.

20 Для вимірювання АОА зазвичай використовують хімічні та фізико-хімічні методи, побудовані на прямому або посередньому вимірюванні швидкості або повноти протікання окисно-відновної реакції. Всі відомі методи вимірювання АОА можна розділити на три типи, що базуються на наступних вимірюваннях: споживання кисню; утворення продуктів окиснення; поглинання (або зв'язування) вільних радикалів.

25 Існують такі способи, як TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity), TRAP (total radical trapping antioxidant parameter), FRAP (ferric reducing antioxidant power) та ін., засновані на реакціях відновлення довгоживучих вільних радикалів або відновленні комплексу Fe (III). Основними недоліками цих методів є той факт, що антиоксидантна активність в них розглядається як функція багатьох параметрів (зокрема часу, температури, природи речовини, концентрації антиоксиданту і інших сполук); під час реалізації цих методів використовуються синтетичні вільні радикали, які нічого спільного не мають з вільними радикалами в організмі людини [1, 2].

35 Відомий спосіб визначення АОА заснований на методі катодної вольтамперометрії, як модельна реакція використовується реакція електровідновлення кисню до супероксидного аніон-радикалу ($O_2^{\cdot-}$). Для оцінки АОА у досліджуваному об'єкті розглядається залежність граничного струму першої хвилі електровідновленого кисню від концентрації антиоксидантів в об'ємі розчину та від часу протікання процесу. В присутності антиоксидантів спостерігається зменшення струму за рахунок їх взаємодії із супероксидним аніон-радикалом [3].

40 Основним недоліком цього способу є використання як індикаторного ртутно-плівкового електроду, експлуатація якого є дуже складною та небезпечною, оскільки потребує жорстких вимог до приміщення лабораторії, до виконання правил техніки безпеки та до рівня підготовки персоналу. Також недоліком є те, що даний метод реєструє не тільки антиоксиданти, але й речовини, що такими не є (редуючі цукри, гумінові кислоти).

45 Найбільш близьким технічним рішенням до корисної моделі є спосіб оцінки АОА за допомогою кулонометричного титрування з амперметричною індикацією. Під час реалізації цього способу вимірюється кількість електрики, що проходить через комірку під час окиснення антиоксидантного комплексу аналізованої речовини на поверхні з певним потенціалом. В цьому випадку для визначення антиоксидантної активності можна використовувати електрогенеровані окиснювачі: хлор, бром і йод. Електрогенерацію галогенів в методі кулонометричного титрування проводять при постійній силі струму 5,0 мА із 0,2 М водного розчину KCl, KBr або KI у 0,1 М H_2SO_4 з визначенням кінця титрування за допомогою амперметричної індикації з двома поляризованими платиновими електродами. Залежність між кількістю доданого титранта і величиною дифузійного струму є кривою амперметричного титрування [4].

50 Основним недоліком цього способу є необхідність залучення 2-х джерел живлення: перше подає постійний струм на кулонометричний титратор, а друге подає малий струм на два вимірювальні платинові електроди. Саме цей струм і вимірюється. Результат залежить від електричної провідності розчину, яка, у свою чергу, визначається його чистотою (відсутністю завислих часток), тобто кулонометричне титрування з амперметричною індикацією не дозволяє проводити вимірювання антиоксидантної активності суспензій. Але більша частина
60 біологічно активних добавок є суспензіями. Отже амперметрична індикація в

кулонометричному титруванні дозволяє вимірювати лише ту частину антиоксидантів, що екстрагується у розчин.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробки способу оцінки сумарної антиоксидантної активності водних екстрактів рослинної сировини та дієтичних добавок шляхом кулонометричного титрування з потенціометричною індикацією.

Поставлена задача досягається тим, що у відомому способі оцінки інтегральної антиоксидантної активності (АОА) водних екстрактів рослинної сировини та дієтичних добавок, що включає підготовку водних екстрактів рослинної сировини та дієтичних добавок, окиснення їх бромом, що генерується в електрохімічній комірці, розрахунок АОА за законом Фарадея, згідно з корисною моделлю, індикація завершення кулонометричного титрування здійснюється за допомогою вимірювання окисно-відновного потенціалу системи.

Відміна даного способу полягає у тому, що замість амперометричної було використано потенціометричну індикацію для реєстрації завершення експерименту. Реалізація цього способу оцінки АОА дозволяє використовувати як робочі електроди для електрогенерації бром у графітові електроди замість платинових.

Запропонований спосіб може бути застосований до досліджуваних об'єктів в рідкому стані, у тому числі і до суспензій.

Підготовку аналізованих проб здійснюють шляхом приготування водних екстрактів з різних видів рослинної сировини та дієтичних добавок. В залежності від природи сировини проводять її попередню підготовку для екстракції. Основною задачею попередньої підготовки є подрібнення або навіть гомогенізація проби, що аналізуватиметься.

Перед проведенням вимірювань будь-яким з відомих методів оцінки АОА здійснюють екстракцію з дослідної сировини речовин, які зумовлюють її антиоксидантну активність. В якості екстрагенту зазвичай використовують воду. Водні екстракти готують одноразовим екстрагуванням водою при температурі 65...100 °С протягом 15-30 хвилин залежно від виду сировини. Одержаний екстракт фільтрують для видалення завислих частинок і отримання майже прозорого фільтрату. Але, запропонований спосіб також дозволяє визначати АОА суспензій. При цьому вимірювання АОА проводиться у нефільтрованій пробі.

Установка для оцінки антиоксидантної активності водних екстрактів рослинної сировини та дієтичних добавок складається з джерела постійного струму, мілівольтметра, електрохімічної комірки та електронного мілівольтметра. Анодом, на якому отримується електрогенерований титрант служить графітовий електрод. Як катод виступає графітовий електрод, забраний в капіляр Лугіна (капіляр було використано, щоб уникнути розрядження титранту на катоді). Для індикації потенціалу використовується платиновий та хлорсрібний електроди, підключені до електронного мілівольтметра.

Для ініціювання процесу електрогенерації струм пропускають через систему. Під впливом струму на аноді виділяється вільний бром, який вступає у реакцію з речовинами, що мають антиоксидантну активність, чим поступово нейтралізує антиоксиданти. В той момент, коли в системі з'являється вільний бром, тобто антиоксиданти у розчині вже відсутні, відбувається стрибок потенціалу, який саме фіксується. Кількість антиоксидантів прямо пропорційна часу, що пройшов, струму, який є постійним, та зворотно пропорційна об'єму проби, взятої для дослідження. Після вимірювання розраховують кількість електрики, Кл, що пройшла крізь розчин до моменту стрибка потенціалу та відносять цю кількість до 100 г (100 мл) рослинної сировини. Розрахунок роблять за формулою:

$$A.O.A. = \frac{I \cdot t \cdot V_0 \cdot 100}{V_x \cdot m}$$

де

I - сила струму;

A; t - час електролізу, с;

V_0 - об'єм розчину екстракту, см³;

V_x - об'єм проби, см³;

m - маса наважки сировини, г.

Спосіб оцінки антиоксидантної активності водних екстрактів рослинної сировини та дієтичних добавок проілюстровано наступними прикладами.

Приклад 1.

Оцінка АОА свіжозамороженої чорної смородини. В кулонометричну комірку вносимо 200 см³ дистильованої води, 2,5 см³ концентрованої сульфатної кислоти, 20 см³ розчину KBr з молярною концентрацією 0,2 моль/дм³ та перемішуємо на магнітній мішалці. Для приготування екстрактів відбираємо наважку свіжозамороженої чорної смородини масою 5 г. Наважку розтираємо у фарфоровій ступці та готовимо настої на 200 см³ дистильованої води кімнатної

температури. Екстракцію проводимо 15 хв. Після закінчення часу екстракції проводимо фільтрування через паперовий фільтр "синя стрічка" та відбираємо пробу об'ємом 5 см³, вносимо в кулонометричну комірку. Пропускаємо струм 1·10⁻³ А, одночасно з джерелом постійного струму вмикаємо електронний вольтметр. Після зростання потенціалу титрування завершуємо. Кінцевою точкою титрування вважаємо час початку зростання потенціалу (№ 360 с). Розраховуємо АОА:

$$A.O.A. = \frac{I \cdot t \cdot V_0 \cdot 100}{V_x \cdot m} = \frac{1 \cdot 10^{-3} \times 360 \times 200 \times 100}{5 \times 5} = 288 \text{ Кл/100г}$$

де

I - сила струму, А;

t - час електролізу, с;

V₀ - об'єм розчину екстракту, см³;

V_x - об'єм проби, см³;

m - маса наважки сировини, г.

Приклад 2.

Оцінка АОА сухого червоного вина каберне "Коблево". Пробу вина об'ємом 10 см³ відбираємо безпосередньо після відкоркування пляшки, для запобігання довгого контакту вина із повітрям. Дослідження проводимо як в прикладі 1. Антиоксидантну активність вина розраховували за формулою:

$$A.O.A. = \frac{I \cdot t \cdot 100}{V_x} = \frac{1 \cdot 10^{-3} \times 2100 \times 100}{10} = 8,4 \text{ Кл/100см}^3$$

де

I - сила струму, А;

t - час електролізу, с;

V_x - об'єм проби, см³.

Приклад 3.

Оцінка АОА какао-порошку ТМ "Мрія". Для приготування настоїв какао беремо наважки какао-порошку масою 5 г та дистильовану воду об'ємом 200 см³. Какао-порошок поміщаємо у холодну воду, після чого доводимо до кипіння та кип'ятимо 1-2 хв. Після охолодження настою відбираємо пробу об'ємом 5 см³. Частину настою фільтруємо через паперовий фільтр "синя стрічка" та теж відбираємо пробу об'ємом 5 см³.

Розраховуємо АОА фільтрованого та нефільтрованого зразків як в прикладі 1. Для фільтрованого зразка АОА=240 Кл/100 г, для нефільтрованого АОА=720 Кл/100 г.

Приклад 4.

Оцінка антиоксидантної активності дієтичних добавок на основі крові КРС та рослинної сировини: "Калгем", "Редгем", "Фітогем". Для приготування екстрактів наважку дієтичної добавки масою 5 г поміщують у колбу, заливають дистильованою водою t=22-25 °С, об'ємом 200 см³. Екстракцію проводять при постійному перемішуванні на магнітній мішалці протягом 30 хв. Після цього підготовку проб проводять наступними способами:

1 спосіб. Відбирають пробу об'ємом 5 см³ та вносять у кулонометричну комірку;

2 спосіб. Екстракт фільтрують через паперовий фільтр "синя стрічка" для видалення зважених частинок, потім відбирають пробу об'ємом 5 см та вносять у кулонометричну комірку.

Розрахунок АОА проводять за формулою зазначеною у прикладі 1.

АОА визначена у дієтичних добавках за способом 1 складає:

"Калгем" - 875 Кл/100 г;

"Редгем" - 1100 Кл/100 г;

"Фітогем" - 990 Кл/100 г.

АОА визначена у дієтичних добавках за способом 2 складає:

"Калгем" - 960 Кл/100 г;

"Редгем" - 1200 Кл/100 г;

"Фітогем" - 1080 Кл/100 г.

Приклад 5.

Оцінка антиоксидантної активності фруктово-ягідних начинок, збагачених на гемове залізо (на основі яблучно-чорноплідногогоробинового повидла). Для приготування екстрактів наважку начинки масою 5 г помішують у колбу, заливають дистильованою водою t=22-25 °С, об'ємом 200 см³. Екстракцію проводять при постійному перемішуванні на магнітній мішалці протягом 30 хв. Після цього відбирають пробу об'ємом 5 см³ та вносять у кулонометричну комірку.

Розрахунок АОА проводять за формулою зазначеною у прикладі 1.

АОА визначена у фруктово-ягідних начинках збагачених на гемове залізо (на основі яблучно-чорноплідного-робинового повидла) складає 840 Кл/100 г.

Таким чином, запропонований спосіб має такі переваги перед прототипом:

5 1. Застосування методу кулонометричного титрування із потенціометричною індикацією завершення титрування дозволяє визначати антиоксидантну активність не лише у фільтрованих розчинах, а й у суспензіях.

2. Можливість використання графіту як робочі електроди для електрогенерації броду замість платини, що дозволяє значно здешевити установку для визначення антиоксидантної активності.

10 Джерела інформації:

1. Хасанов, В. В. Методы исследования антиоксидантов [Текст] / В.В. Хасанов, Г.А. Рыжова, Е.Р. Мальцева // Химия растительного сырья. - 2004. - № 3. - С. 63-75.

2. Roginsky, V. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food [Текст] / V. Roginsky, E. A. Lissi // Food chemistry. - 2005. - V. 92 - p. 235.

15 3. Короткова, Е.И. Новый способ определения активности антиоксидантов [Текст] / Е.И. Короткова // Физическая химия. - 2000. - Т. 74. - № 9. - С. 1544-1546.

20 4. Яшин, А.Я. Инжекционно-проточная система с амперометрическим детектором для селективного определения антиоксидантов в пищевых продуктах и напитках [Текст] / А.Я. Яшин // Российский химический журнал (Журнал российского химического общества им. Д.И. Менделеева). - 2008. - Т. LII. - № 2. - с. 130-135.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

25 Спосіб оцінки інтегральної антиоксидантної активності водних екстрактів рослинної сировини та дієтичних добавок, що включає підготовку водних екстрактів рослинної сировини та дієтичних добавок, окиснення їх бромом, що генерується в електрохімічній комірці, розрахунок антиоксидантної активності за законом Фарадея, який **відрізняється** тим, що індикація завершення кулонометричного титрування здійснюється за допомогою вимірювання окисно-відновного потенціалу системи.

30

Комп'ютерна верстка Л.Литвиненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601