

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013156374/15, 18.12.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.12.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 18.12.2013

(43) Дата публикации заявки: 10.08.2015 Бюл. № 22

(45) Опубликовано: 20.09.2015 Бюл. № 26

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: SU 1051428 A, 30.10.1983. RU 2322658 C2, 20.04.2008. RU 2426109 C1, 10.08.2011. RU 2238554 C1, 20.10.2004. RU 2086610 C1, 10.08.1997. RU 2452947 C1, 10.06.2012

Адрес для переписки:

625003, г.Тюмень, ул. Семакова, 10, ФГБОУ ВПО "Государственный аграрный университет Северного Зауралья"

(72) Автор(ы):

Перевозкина Маргарита Геннадьевна (RU),
Еремин Дмитрий Иванович (RU),
Перевозкин Андрей Андреевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования
"Государственный аграрный университет Северного Зауралья" (RU)C 2
2 5 6 3 1 7 7
R U

(54) КИНЕТИЧЕСКИЙ СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ БИОМАТЕРИАЛА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, биологии, фармации и пищевой технологии применительно к исследованию гомолитических свойств липидов и их участия в свободнорадикальных реакциях окисления, а также - к осуществлению подбора антиоксидантов. Способ осуществляют путем экстрагирования из навески биоматериала жирорастворимого антиоксиданта в виде гептанового экстракта и водорастворимого антиоксиданта в виде изопропилового экстракта, насыщения пробы модельного субстрата каждого антиоксиданта кислородом с перемешиванием при температуре $60,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$ и определения объема поглощенного кислорода во времени волюметрическим методом в термостатированной установке типа Варбурга с построением графика в координатах $\Delta V/t$, последующим определением из кинетических кривых величины периода индукции (τ_i) и расчетом суммарной антиоксидантной

активности компонентов биоматериала в составе модельного субстрата с учетом контрольных проб, не содержащих гептанового и изопропилового экстракта, причем модельный субстрат жирорастворимого антиоксиданта включает в себя: биоматериал, метиловый или этиловый эфир высших ненасыщенных жирных кислот, раствор азо-бис-изобутиронитрила (АИБН) в хлорбензоле в концентрации в пробе $(2-60) \times 10^{-3}$ М, полученный образец доводят хлорбензолом до 2 мл, модельный субстрат водорастворимого антиоксиданта включает в себя: биоматериал, метиловый или этиловый эфир ненасыщенных жирных кислот, водный раствор хлорида меди (II) в концентрации в пробе $(1-3) \times 10^{-3}$ М, водный раствор цетилtrimетиламмония бромида (ЦТМАБ) в концентрации в пробе $(1-5) \times 10^{-3}$ М, полученный образец доводят водой до 4 мл, а определение суммарной антиоксидантной активности жирорастворимых и

R U
2 5 6 3 1 7 7
C 2

R U 2 5 6 3 1 7 7 C 2

водорастворимых компонентов биоматериала осуществляют из заданной расчетной

зависимости. Достигаются повышение точности и ускорение определения. 1 табл., 4 пр.

R U 2 5 6 3 1 7 7 C 2

RU 2563177 C2

RUSSIAN FEDERATION



(19) RU (11) 2 563 177⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 7/18 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2013156374/15, 18.12.2013

(24) Effective date for property rights:
18.12.2013

Priority:

(22) Date of filing: 18.12.2013

(43) Application published: 10.08.2015 Bull. № 22

(45) Date of publication: 20.09.2015 Bull. № 26

Mail address:

625003, g.Tjumen', ul. Semakova, 10, FGBOU VPO
"Gosudarstvennyj agrarnyj universitet Severnogo
Zaural'ja"

(72) Inventor(s):

Perevozkina Margarita Gennad'evna (RU),
Eremin Dmitrij Ivanovich (RU),
Perevozkin Andrej Andreevich (RU)

(73) Proprietor(s):

federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego
professional'nogo obrazovanija
"Gosudarstvennyj agrarnyj universitet
Severnogo Zaural'ja" (RU)

(54) KINETIC METHOD OF DETERMINING BIOMATERIAL ANTIOXIDANT ACTIVITY

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, biology, pharmacy and food technology in application to research of homolytic properties of lipids and their participation in free-radical oxidation reactions, as well as to realisation of selection of antioxidants. Method is realised by extraction from biomaterial charge of fat-soluble antioxidant in form of heptane extract and water-soluble antioxidant in form of isopropyl extract, saturation of model substrate sample of each antioxidant with oxygen with mixing at temperature $60.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ and determination of volume of absorbed oxygen in time by volumetric method in thermostated Warburg type installation with building graph in $\Delta V/t$ coordinates, further determination of induction period value (τ_i) from kinetic curves and calculation of the total antioxidant activity of biomaterial components in composition of model substrate taking into account control samples, which do not contain heptanes and

isopropyl extract, with model substrate of fat-soluble antioxidant including biomaterial, methyl or ethyl ether of higher unsaturated fatty acids, solution of azo-bis-isobutyronitrile (AIBN) in chlorobenzene in concentration in sample $(2-60) \times 10^{-3}$ M; obtained sample is brought to 2 ml with chlorobenzene; model substrate of water-soluble antioxidant includes biomaterial, methyl or ethyl ether of unsaturated fatty acids, water solution of copper (II) chloride in concentration in sample $(1-3) \times 10^{-3}$ M, water solution of cetyltrimethylammonium bromide (CTMAB) in concentration in sample $(1-5) \times 10^{-3}$ M; obtained sample is brought to 4 ml with water, with determination of the total antioxidant activity of fat-soluble and water-soluble components of biomaterial being realised on the basis of specified calculated dependence.

EFFECT: increased accuracy and acceleration of determination are achieved.

1 tbl, 4 ex

R U 2 5 6 3 1 7 7 C 2

Изобретение относится к медицине, биологии, фармации и пищевой технологии, а именно к тем их разделам, где исследуются гомолитические свойства липидов и их участие в свободнорадикальных реакциях окисления, осуществляется подбор антиоксидантов.

- 5 В настоящее время развитие многих патологий связывают с активацией перекисного окисления липидов биомембран /Бурлакова Е.Б., Алесенко А.В., Молочкина А.М. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. - М.: Наука, 1975. - 214 с.; Коган А.Х., Сыркин А.Л., Дриницина С.В. Кислородные свободнорадикальные процессы в патогенезе ишемической болезни сердца и перспективы применения антиоксиданта Q₁₀ (убихинона) для их коррекции // Кардиология. - 1997. - №12. - С.62-70; Козлов Ю.П. Свободные радикалы и их роль в нормальных и патологических процессах. - М.: Изд-во МГУ, 1973. - 174 с./. При этом в организме нарушается баланс процессов образования и распада пероксидов, свойственный нормальным тканям. Увеличение концентрации пероксидов меняет физические и биологические свойства мембран. Поэтому терапию многих патологий связывают с применением антиоксидантов. Актуальной остается проблема предварительного тестирования их антиоксидантной активности, контролирование и диагностика антиоксидантной активности липидов биомембран в норме и при патологии.
- 10 В последние годы ведется целенаправленный поиск эффективных ингибиторов окисления среди объектов растительного и биологического материала: морепродукты, лекарственные растения, сапропели. Исследования подобного рода позволили открыть новые классы антиоксидантов, отыскать альтернативные природные источники ингибиторов окисления. При этом необходимо проводить тестирование суммарной антиоксидантной активности растительного и животного биоматериала.
- 15 20 Разработан экспресс-способ тестирования антиоксидантной активности соединений в водно-липидной среде в условиях эмульсий, приближенных к биологическим средам, позволяющий тестировать водорастворимые антиоксиданты /Ушкалова В.Н., Перевозкина М.Г., Барышников Э.В. Разработка способа тестирования средств антиоксидантотерапии // В сб.: Свободно-радикальное окисление липидов в эксперименте и клинике. - Тюмень, Из-во Тюм. ГУ, 1997. - С.77-82/.
- 25 30 35

В качестве прототипа был выбран кинетический способ определения антиоксидантной активности липидов /А.с. 1051428 (СССР), МКИ³ G01N 33/48. Способ определения антиокислительной активности липидов. Ушкалова В.Н., Кадочникова Г.Д., Соловьев В.Е., заявка №3357314/28-13, 16.10.1981, опубл. 30.10.1983. Бюл. №40, с.154/. Сущность способа состоит в том, что в качестве субстрата окисления используют метилолеат (0,5-2,5 мл) в присутствии азо-бис-изобутиронитрила (АИБН) в количестве 0,5-4 мг/мл в растворе хлорбензола и добавки липидов (1-3 мл), пробу насыщают кислородом при температуре 60,0±0,2°C, волюметрическим методом определяют t_{i2} время поглощения 25 mm³ кислорода на 1 мл пробы. В аналогичных условиях определяют t_{i1} время поглощения 25 mm³ кислорода на 1 мл контрольной пробы без добавок липидов. Рассчитывают антиоксидантную активность липидов по формуле:

$$AOA = \frac{t_{i2} - t_{i1}}{t_{i1}} \times K,$$

45 где t_{i1} - время поглощения кислорода на 1 мл субстрата при окислении контрольной пробы, мин;

t_{i2} - время поглощения кислорода на 1 мл субстрата при окислении пробы, мин;

$$K = \frac{1}{2}, P - \text{навеска липидов, мг.}$$

Недостатком способа (прототипа) является исключение определения антиоксидантной активности суммы водорастворимых ингибиторов окисления в гомогенатах растительного и животного биоматериала, использование большого количества липидов и эфиров высших ненасыщенных жирных кислот, что делает сложным применение способа к дорогостоящим биологическим объектам, а также трудоемкость и длительность анализа.

Задачей, решаемой заявляемым изобретением, является увеличение эффективности способа и сокращение времени тестирования пробы биоматериала.

Технический результат - простой способ, не требующий больших материальных затрат, основанный на определении суммарной антиоксидантной активности жирорастворимых и водорастворимых компонентов биоматериала, ведущий к увеличению точности результатов и сокращению времени тестирования пробы биоматериала.

Указанный технический результат достигается тем, что наряду с определением антиоксидантной активности жирорастворимых компонентов биоматериала в составе модельного субстрата, включающего в себя: биоматериал, эфиры высших ненасыщенных жирных кислот (этилолеата, метилолеата, метиллиниолеата и др.) в присутствии азо-
20 бис-изобутиронитрила (АИБН) в концентрации в пробе $(2-60)\times 10^{-3}$ М в хлорбензоле, особенностью является то, что параллельно проводят определение антиоксидантной активности водорастворимых компонентов биоматериала в составе модельного субстрата, включающего в себя: биоматериал, эфиры высших ненасыщенных жирных
25 кислот (этилолеата, метилолеата, метиллиниолеата и др.), водный раствор хлорида меди (II) в концентрации в пробе $(1-3)\times 10^{-3}$ М, водный раствор цетилtrimетиламмония бромида (ЦТМАБ) в концентрации в пробе $(1-5)\times 10^{-3}$ М, поглощение кислорода оценивают волюметрическим методом в термостатированной установке типа Варбурга при температуре $t=(60\pm 0,2)^\circ\text{C}$ при перемешивании на магнитной мешалке.

30 Измеряют объем (мм^3) поглощенного кислорода во времени, строят график в координатах $\Delta V/t$. Графическим методом из кинетических кривых определяют величину периода индукции (τ_i) и рассчитывают суммарную антиоксидантную активность жирорастворимых и водорастворимых компонентов биоматериала с учетом
35 контрольных проб.

Сущность предлагаемого способа состоит в том, что гомогенат биоматериала 0,001-0,05 г экстрагируют 10-100-кратным избытком смеси (1:1 по объему) н-гептан: изопропиловый спирт в течение 5 минут, центрифугируют 2-3 минуты при 1500-3000 об/мин, разделяют на 2 фазы.

40 Гептановый экстракт (жирорастворимые антиоксиданты) сушат 20 мин безводным сульфатом натрия, 0,5-1 мл гептанового экстракта помещают в манометрическую ячейку, добавляют 0,5-1 мл эфира высшей ненасыщенной жирной кислоты (этилолеата, метилолеата, метиллиниолеата и др.) и раствор азо-бис-изобутиронитрила (АИБН) в концентрации в пробе $(2-60)\times 10^{-3}$ М в хлорбензоле, доводят хлорбензолом до общего объема пробы 2 мл. Поглощение кислорода оценивают волюметрическим методом в термостатированной установке типа Варбурга при температуре $t=(60\pm 0,2)^\circ\text{C}$ при
45 перемешивании на магнитной мешалке. Измеряют объем (мм^3) поглощенного кислорода во времени, строят график в координатах $\Delta V/t$. Графическим методом из кинетических

кривых определяют величину периода индукции (τ_i). В аналогичных условиях определяют поглощение кислорода в контрольной пробе (без добавок гептанового экстракта).

0,5-1 мл изопропилового экстракта помещают в манометрическую ячейку, добавляют 5 0,5-1 мл эфира высшей ненасыщенной жирной кислоты (этилолеата, метилолеата, метиллиноволеата и др.), добавляют водный раствор хлорида меди (II) в концентрации в пробе $(1\text{-}3)\times10^{-3}$ М, водный раствор цетилtrimетиламмония бромида (ЦТМАБ) в концентрации в пробе $(1\text{-}5)\times10^{-3}$ М, доводят водой до общего объема пробы 4 мл.

10 Поглощение кислорода оценивают волюметрическим методом в термостатированной установке типа Варбурга при температуре $t=(60\pm0,2)^\circ\text{C}$ при перемешивании на магнитной мешалке. Измеряют объем (мм^3) поглощенного кислорода во времени, строят график в координатах $\Delta V/t$. Графическим методом из кинетических кривых определяют величину периода индукции (τ_i). В аналогичных условиях определяют поглощение кислорода в 15 контрольной пробе (без добавок изопропилового экстракта). Разработанный экспресс-способ тестирования антиоксидантной активности водорастворимых соединений в водно-эмulsionной среде позволяет сократить время тестирования биоматериала в 2-3 раза по сравнению с прототипом.

20 Полученные в процессе окисления липидных субстратов экспериментальные кинетические кривые описываются функциональными зависимостями методом наименьших квадратов.

Определение суммарной антиоксидантной активности жирорастворимых и водорастворимых компонентов биоматериала осуществляется по формуле:

$$25 \Sigma \text{АОА} = \frac{\tau_{i1} \times (\tau_{i2} - \tau_{i3}) + \tau_{i3} \times (\tau_{i4} - \tau_{i1})}{\tau_{i3} \times \tau_{i1}} \times K,$$

где $\Sigma \text{АОА}$ - суммарная антиоксидантная активность;

τ_{i1} - период индукции без изопропиловой пробы (контроль), мин;

τ_{i2} - период индукции гептановой пробы (жирорастворимые антиоксиданты), мин.;

30 τ_{i3} - период индукции без гептановой пробы (контроль), мин;

τ_{i4} - период индукции изопропиловой пробы (водорастворимые антиоксиданты), мин;

$$K = \frac{1}{P}, P - \text{навеска биоматериала, мг.}$$

35 При навеске менее 5 мг биоматериала на 1 мл метилолеата поправочным коэффициентом К можно пренебречь.

Сущность изобретения иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1.

40 Берут 0,005 г (точная навеска) лярда пеляди, экстрагируют 5 мл смеси (1:1 по объему) н-гептан:изопропиловый спирт в течение 5 минут, центрифугируют 2-3 минуты при 1500-3000 об/мин, разделяют на 2 фазы.

Гептановый экстракт сушат 20 мин. 0,5 г безводного сульфата натрия, 0,5 мл гептанового экстракта помещают в манометрическую ячейку, добавляют 0,5 мл метилолеата, добавляют раствор азо-бис-изобутиронитрила (АИБН) в концентрации 45 в пробе 3×10^{-3} М в хлорбензоле, доводят хлорбензолом до общего объема пробы 2 мл. Поглощение кислорода оценивают волюметрическим методом в термостатированной установке типа Варбурга при температуре $t=(60\pm0,2)^\circ\text{C}$ при перемешивании на магнитной

мешалке. Измеряют объем (мм^3) поглощенного кислорода во времени, строят график в координатах $\Delta V/t$. Графическим методом из кинетических кривых определяют величину периода индукции (τ_i). В аналогичных условиях определяют поглощение кислорода в контрольной пробе (без добавок гептанового экстракта).

1 мл изопропилового экстракта помещают в манометрическую ячейку, добавляют 1 мл метилолеата, добавляют водный раствор хлорида меди (II) в концентрации в пробе 3×10^{-3} М, водный раствор цетилtrimетиламмония бромида (ЦТМАБ) в концентрации в пробе 1×10^{-3} М доводят водой до общего объема пробы 4 мл. Поглощение кислорода оценивают волюметрическим методом в термостатированной установке типа Варбурга при температуре $t=(60\pm0,2)^\circ\text{C}$ при перемешивании на магнитной мешалке.

Измеряют объем (мм^3) поглощенного кислорода во времени, строят график в координатах $\Delta V/t$. Графическим методом из кинетических кривых определяют величину периода индукции (τ_i). В аналогичных условиях определяют поглощение кислорода в контрольной пробе (без добавок изопропилового экстракта).

Определение суммарной антиоксидантной активности жирорастворимых и водорастворимых компонентов биоматериала осуществляется по формуле:

$$\sum \text{AOA} = \frac{5 \times (50 - 15) + 15 \times (25 - 5)}{15 \times 5} \times 1 = 6,3$$

Пример 2.

Берут 0,005 г (точная навеска) липидов эритроцитов крови, экстрагируют 5 мл смеси (1:1 по объему) н-гептан:изопропиловый спирт в течение 5 минут, центрифугируют 2-3 минуты при 1500-3000 об/мин, разделяют на 2 фазы.

Гептановый экстракт сушат 20 мин. 0,5 г безводного сульфата натрия, 0,5 мл гептанового экстракта помещают в манометрическую ячейку, добавляют 0,5 мл метилолеата, добавляют раствор азо-бис-изобутиронитрил (АИБН) в концентрации в пробе 3×10^{-3} М в хлорбензоле, доводят хлорбензолом до общего объема пробы 2 мл. Поглощение кислорода оценивают волюметрическим методом в термостатированной установке типа Варбурга при температуре $t=(60\pm0,2)^\circ\text{C}$ при перемешивании на магнитной мешалке. Измеряют объем (мм^3) поглощенного кислорода во времени, строят график в координатах $\Delta V/t$. Графическим методом из кинетических кривых определяют величину периода индукции (τ_i). В аналогичных условиях определяют поглощение кислорода в контрольной пробе (без добавок гептанового экстракта).

1 мл изопропилового экстракта помещают в манометрическую ячейку, добавляют 1 мл метилолеата, добавляют водный раствор хлорида меди (II) в концентрации в пробе 3×10^{-3} М, водный раствор цетилtrimетиламмония бромида (ЦТМАБ) в концентрации в пробе 1×10^{-3} М, доводят водой до общего объема пробы 4 мл. Поглощение кислорода оценивают волюметрическим методом в термостатированной установке типа Варбурга при температуре $t=(60\pm0,2)^\circ\text{C}$ при перемешивании на магнитной мешалке. Измеряют объем (мм^3) поглощенного кислорода во времени, строят график в координатах $\Delta V/t$. Графическим методом из кинетических кривых определяют величину периода индукции (τ_i). В аналогичных условиях определяют поглощение кислорода в контрольной пробе (без добавок изопропилового экстракта).

Определение суммарной антиоксидантной активности жирорастворимых и водорастворимых компонентов биоматериала осуществляется по формуле:

$$\sum \text{AOA} = \frac{5 \times (140 - 15) + 15 \times (40 - 5)}{15 \times 5} \times 1 = 15,3$$

Пример 3.

Берут 0,005 г (точная навеска) облепихового масла, экстрагируют 5 мл смеси (1:1 по объему) н-гептан:изопропиловый спирт в течение 5 минут, центрифугируют 2-3 минуты при 1500-3000 об/мин, разделяют на 2 фазы.

Гептановый экстракт сушат 20 мин. 0,5 г безводного сульфата натрия, 0,5 мл гептанового экстракта помещают в манометрическую ячейку, добавляют 0,5 мл метилолеата, добавляют раствор азо-бис-изобутиронитрил (АИБН) в концентрации в пробе 3×10^{-3} М в хлорбензоле, доводят хлорбензолом до общего объема пробы 2 мл. Поглощение кислорода оценивают волюметрическим методом в термостатированной установке типа Варбурга при температуре $t=(60 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ при перемешивании на магнитной мешалке. Измеряют объем (мм^3) поглощенного кислорода во времени, строят график в координатах $\Delta V/t$. Графическим методом из кинетических кривых определяют величину периода индукции (τ_i). В аналогичных условиях определяют поглощение кислорода в контрольной пробе (без добавок гептанового экстракта).

1 мл изопропилового экстракта помещают в манометрическую ячейку, добавляют 1 мл метилолеата, добавляют водный раствор хлорида меди (II) в концентрации в пробе 3×10^{-3} М, водный раствор цетилtrimетиламмония бромида (ЦТМАБ) в концентрации в пробе 1×10^{-3} М, доводят водой до общего объема пробы 4 мл. Поглощение кислорода оценивают волюметрическим методом в термостатированной установке типа Варбурга при температуре $t=(60 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ при перемешивании на магнитной мешалке.

25 Измеряют объем (мм^3) поглощенного кислорода во времени, строят график в координатах $\Delta V/t$. Графическим методом из кинетических кривых определяют величину периода индукции (τ_i). В аналогичных условиях определяют поглощение кислорода в контрольной пробе (без добавок изопропилового экстракта).

30 Определение суммарной антиоксидантной активности жирорастворимых и водорастворимых компонентов биоматериала осуществляется по формуле:

$$\sum \text{AOA} = \frac{5 \times (70 - 15) + 15 \times (30 - 5)}{15 \times 5} \times 1 = 8,7$$

Пример 4.

35 Капотен является производным пролина с отдаленной боковой тиольной группой. Препарат применяют при лечении легкой и умеренной гипертонии, а также при тяжелых формах сердечно-сосудистых заболеваний. Была изучена антиоксидантная активность капотена в процессе окисления метиллиноволеата в условиях инициирования в среде хлорбензола и катализа в водно-липидной среде в сравнении с дубонолом и α -

40 токоферолом. Была установлена высокая антиоксидантная активность капотена в водно-липидных катализируемых субстратах, превышающая ингибирующие свойства α -токоферола и уступающая активности дубонола. В безводной среде капотен проявлял низкие антиоксидантные свойства /Перевозкина М.Г., Тихонова В.В., Кадочникова Г.Д. и др. / Физико-химические закономерности окисления липидных субстратов под действием гипотензивных препаратов // Свободно-радикальное окисление липидов в эксперименте и клинике. - Тюмень, Изд-во Тюм. ГУ, 1997. - С. 104-113/.

45 Кинетические параметры окисления метиллиноволеата в растворе хлорбензола в присутствии 6×10^{-3} М АИБН и в водно-липидной среде в присутствии 2×10^{-3} М CuCl_2

в зависимости от концентрации капотена, [InH] - ингибитор, t=600С (Таблица 1).

Таблица 1

безводная среда, 6×10^{-3} М АИБН				
[InH], М	τ, мин.	Wнач. $\times 10^{-8}$, M \times c $^{-1}$	Wmax. $\times 10^{-7}$, M \times c $^{-1}$	[АИБН] [InH]
Контроль МЛ	20	6,0	2,2	-
1×10^{-6}	42	5,0	1,9	6000 : 1
5×10^{-6}	36	4,7	1,8	1200 : 1
5×10^{-5}	90	4,5	1,7	120 : 1
1×10^{-4}	44	4,5	1,7	60 : 1
5×10^{-4}	36	4,9	2,0	12 : 1
1×10^{-3}	20	6,0	2,2	6 : 1
1×10^{-2}	30	7,2	2,4	1 : 1,7
1×10^{-1}	22	8,0	2,8	1 : 17
водно-липидная среда, 2×10^{-3} М CuCl₂, 1×10^{-3} М ЦТМАБ				
[InH], М	τ, мин.	Wнач. $\times 10^{-5}$, M \times c $^{-1}$	Wmax. $\times 10^{-4}$, M \times c $^{-1}$	[CuCl ₂] [InH]
Контроль МЛ	5	14,4	2,6	-
1×10^{-6}	8	7,6	1,6	2000 : 1
1×10^{-5}	15	6,9	1,0	200 : 1
1×10^{-4}	26	6,2	1,6	20 : 1
1×10^{-3}	45	3,6	1,7	2 : 1
1×10^{-2}	95	2,1	1,7	1 : 5
1×10^{-1}	395	0,6	1,7	1 : 50

С учетом этих выводов проанализируем биоматериал больных, проходивших лечение капотеном, при этом важно учитывать жирорастворимые и водорастворимые фракции препарата.

Берут 1,0 г (точная навеска) цельной крови больных, принимавших препарат капотен в среднесуточной дозе 150 мг в течение двух недель, экстрагируют 5 мл смеси (1:1 по объему) н-гептан:изопропиловый спирт в течение 5 минут, центрифугируют 2-3 минуты при 1500-3000 об/мин, разделяют на 2 фазы.

Гептановый экстракт сушат 20 мин. 0,5 г безводного сульфата натрия, 0,5 мл гептанового экстракта помещают в манометрическую ячейку, добавляют 0,5 мл метилолеата, добавляют раствор азо-бис-изобутиронитрил (АИБН) в концентрации в пробе 3×10^{-3} М в хлорбензоле, доводят хлорбензолом до общего объема пробы 2 мл. Поглощение кислорода оценивают волюметрическим методом в термостатированной установке типа Варбурга при температуре $t=(60 \pm 0,2)$ °С при перемешивании на магнитной мешалке. Измеряют объем (мм) поглощенного кислорода во времени, строят график в координатах $\Delta V/t$. Графическим методом из кинетических кривых определяют величину периода индукции (τ_i). В аналогичных условиях определяют поглощение кислорода в контрольной пробе (без добавок гептанового экстракта).

1 мл изопропилового экстракта помещают в манометрическую ячейку, добавляют 1 мл метилолеата, добавляют водный раствор хлорида меди (II) в концентрации в пробе 3×10^{-3} М, водный раствор цетилtrimетиламмония бромида (ЦТМАБ) в концентрации в пробе 1×10^{-3} М, доводят водой до общего объема пробы 4 мл. Поглощение кислорода

оценивают волюметрическим методом в термостатированной установке типа Варбурга при температуре $t=(60\pm0,2)^\circ\text{C}$ при перемешивании на магнитной мешалке. Измеряют объем (мм) поглощенного кислорода во времени, строят график в координатах $\Delta V/t$. Графическим методом из кинетических кривых определяют величину 5 периода индукции (τ_i). В аналогичных условиях определяют поглощение кислорода в контрольной пробе (без добавок изопропилового экстракта).

Определение суммарной антиоксидантной активности жирорастворимых и водорастворимых компонентов биоматериала осуществляется по формуле:

$$10 \quad \Sigma AOA = \frac{5 \times (70 - 15) + 15 \times (40 - 5)}{15 \times 5} \times 1 = 10,7$$

Преимущества предлагаемого способа состоят в том, что он позволяет определять суммарную антиоксидантную активность водорастворимых и жирорастворимых компонентов биоматериала, увеличить точность расчетов, снизить расходование 15 метилового или этилового эфира высших ненасыщенных жирных кислот, а также сократить время тестирования пробы биоматериала.

Формула изобретения

Кинетический способ определения антиоксидантной активности биоматериала путем 20 экстрагирования из навески биоматериала жирорастворимого антиоксиданта в виде гептанового экстракта и водорастворимого антиоксиданта в виде изопропилового экстракта, насыщения пробы модельного субстрата каждого антиоксиданта кислородом с перемешиванием при температуре $60,0\pm0,2^\circ\text{C}$ и определения объема поглощенного кислорода во времени волюметрическим методом в термостатированной установке 25 типа Варбурга с построением графика в координатах $\Delta V/t$, последующим определением из кинетических кривых величины периода индукции (τ_i) и расчетом суммарной антиоксидантной активности компонентов биоматериала в составе модельного субстрата с учетом контрольных проб, не содержащих гептанового и изопропилового 30 экстракта, причем модельный субстрат жирорастворимого антиоксиданта включает в себя биоматериал, метиловый или этиловый эфир высших ненасыщенных жирных кислот, раствор азо-бис-изобутиронитрила (АИБН) в хлорбензоле в концентрации в пробе $(2-60)\times10^{-3}$ М, полученный образец доводят хлорбензолом до 2 мл, модельный субстрат водорастворимого антиоксиданта включает в себя: биоматериал, метиловый или этиловый эфир ненасыщенных жирных кислот, водный раствор хлорида меди (II) 35 в концентрации в пробе $(1-3)\times10^{-3}$ М, водный раствор цетилtrimетиламмония бромида (ЦТМАБ) в концентрации в пробе $(1-5)\times10^{-3}$ М, полученный образец доводят водой до 4 мл, а определение суммарной антиоксидантной активности жирорастворимых и водорастворимых компонентов биоматериала осуществляют по формуле:

$$40 \quad \Sigma AOA = \frac{\tau_{i1} \times (\tau_{i2} - \tau_{i3}) + \tau_{i3} \times (\tau_{i4} - \tau_{i1})}{\tau_{i3} \times \tau_{i1}} \times K$$

где ΣAOA - суммарная антиоксидантная активность;

τ_{i1} - период индукции без изопропиловой пробы (контроль), мин;

τ_{i2} - период индукции гептановой пробы (жирорастворимые антиоксиданты), мин;

τ_{i3} - период индукции без гептановой пробы (контроль), мин;

τ_{i4} - период индукции изопропиловой пробы (водорастворимые антиоксиданты), мин;

$K = \frac{1}{P}$, P - навеска биоматериала, мг.

5

10

15

20

25

30

35

40

45