

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 614 365** ⁽¹³⁾ **C1**

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

[G01N 24/10 \(2006.01\)](#)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: прекратил действие, но может быть восстановлен (последнее изменение статуса:
29.10.2018)

(21)(22) Заявка: [2015157391](#), 31.12.2015(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
31.12.2015

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 31.12.2015

(45) Опубликовано: [24.03.2017](#) Бюл. № 9

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: А. POPA et al. Antioxidant activity of medicinal tea evidenced by electron spin resonance / Rom. Journ. Phys., Bucharest, 2015, Vol. 60, Nos. 9-10, P. 1501-1507. A.V. dos Santos et al. Antioxidant Properties of Plant Extracts: an EPR and DFT Comparative Study of the Reaction with DPPH, TEMPOL and Spin Trap DMPO / J. Braz. Chem. Soc., 2009, Vol. 20, No. 8, pages 1483-1492. А.А. Федосеева и др. Антиоксидантная активность настоев чая / Химия растительного сырья, 2008, No. 3, с. 123-127.

Адрес для переписки:

620002, г. Екатеринбург, К-2, Мира, 19,
УрФУ, центр интеллектуальной
собственности, Маркс Татьяна
Владимировна

(72) Автор(ы):

**Иванова Алла Владимировна (RU),
Петров Александр Сергеевич (RU),
Вежливцев Евгений Андреевич (RU),
Матери Анатолий Иванович (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Уральский федеральный
университет имени первого Президента
России Б.Н. Ельцина" (RU)**

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ЭЛЕКТРОННО-ПАРАМАГНИТНОЙ РЕЗОНАНСНОЙ
СПЕКТРОСКОПИИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области физико-химических методов анализа, в частности к анализу растворов на предмет количественного определения антиоксидантной активности (АОА). Сущность заявляемого способа заключается в том, что определение АОА проводят по разности количества парамагнитных частиц стабильного радикала, измеряемых до и после прохождения химической реакции частиц радикала с антиоксидантами (АО). Задача настоящего изобретения состоит в преодолении недостатков известных способов и в создании нового способа,

позволяющего повысить точность и экспрессность определения, а также позволяющего количественно в стандартизированных единицах установить АОА определяемого вещества в исследуемом образце и механизм взаимодействия АО со свободными радикалами дифенилпикрилгидразила (ДФПГ). 4 ил., 4 пр.

Изобретение относится к области физико-химических методов анализа, в частности к анализу растворов на предмет количественного определения антиоксидантной активности веществ.

Известен способ спектрофотометрического определения антиоксидантной активности (АОА) основанный на способности ингибирования стабильного свободного радикала дифенилпикрилгидразила (ДФПГ) веществами с АО свойствами [Tuanjai N., Supalax S., Thawatchai T., Wittaya N. New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems // J. Food Research International. 04/2011; 44(3): 798-806]. Сущность способа заключается в измерении снижения оптической плотности раствора ДФПГ в результате реакции с антиоксидантом при длине волны 528 нм. Значения АОА рассчитываются по концентрации анализируемого вещества, необходимого для реагирования с 50% ДФПГ.

Недостаток данного способа заключается в том, что результаты измерений выражаются не в стандартизированных единицах, а в относительных, точнее в эквивалентах галловой кислоты. Значения зависят от эталонного вещества, что не позволяет сравнивать АОА веществ, свойства которых определены в сравнении с разными эталонными веществами. Также к недостаткам данного метода можно отнести ограничения при исследовании окрашенных объектов.

Известен способ электронно-парамагнитной резонансной спектроскопии (ЭПР-спектроскопии) количественного определения АОА растворимого и молотого кофе [Brezová V., Šlebodová A., Staško F. Coffee as a source of antioxidants: An EPR study // J. Food Chemistry. 114 (2009) 859-868], основанный на использовании в качестве окислителей ряда стабильных свободных радикалов, в т.ч. ДФПГ, ЭПР-спектры которых, после смешения с веществами, обладающими АОА, снижают свою интенсивность. Количественную оценку АОА исследуемых образцов приводят в эквивалентах тролокса.

Недостаток способа заключается в том, что количественные значения АОА представляются в относительных единицах (эквивалентах тролокса), что не позволяет сравнить результат со значениями других методов. Также исходя из результатов данного способа, нельзя описать механизм протекания реакций между свободным радикалом и веществом, обладающим АОА.

Наиболее близким решением служит способ определения АОА растительных экстрактов и соков [Sanna D., Delogu G., Mulas M., Schirra M., Fadda A. Determination of free radical scavenging activity of plant extracts through DPPH assay: an EPR and UV-Vis study // J. Food Analytical Methods. 5 (2012) 759-766], заключающийся в том, что раствор ДФПГ смешивают с образцами (растительные экстракты, соки) обладающими АОА. Количественную оценку АОА проводят по изменению интенсивности ЭПР-спектров раствора ДФПГ, установленных до и после взаимодействия с анализируемыми образцами.

К недостаткам способа относится выражение значения АОА в относительных единицах ЕС50, то есть концентрации экстракта, необходимой для снижения начальной концентрации ДФПГ на 50%. Результаты данного способа не несут информацию о возможных механизмах протекания реакции между свободным радикалом и анализируемым веществом.

Задача настоящего изобретения состоит в преодолении недостатков известных способов и в создании нового способа, позволяющего повысить точность и экспрессность определения, а также позволяющего количественно в стандартизированных единицах установить антиоксидантную активность определяемого вещества в исследуемом образце и механизм взаимодействия АО со свободными радикалами ДФПГ.

Задача решается тем, что в способе определения антиоксидантной активности веществ методом ЭПР-спектроскопии спиртовой раствор стабильного радикала ДФПГ смешивают с раствором, содержащим вещество, обладающее антиоксидантной активностью (АОА), оценку антиоксидантной активности проводят по уменьшению числа парамагнитных центров стабильного радикала, рассчитанных из ЭПР-спектров до реакции и после полного прохождения химической реакции между радикалом и анализируемым веществом, в качестве меры антиоксидантной активности вещества используют моль эквиваленты в литре, полученные из разности количества

парамагнитных частиц радикала до и после взаимодействия с АО, а значение АОА рассчитывают по формуле:

$$AOA = \frac{(n_{s1} - n_{s2}) * C_{DPPH}}{n_{s1}}$$

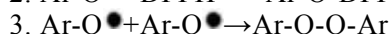
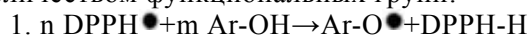
где АОА - антиоксидантная активность, М-экв;

C_{DPPH} - концентрация ДФПГ в исходном растворе, М;

n_{s1} - начальное количество парамагнитных частиц ДФПГ, ед.

n_{s2} - количество парамагнитных частиц ДФПГ после взаимодействия с анализируемым веществом, ед.

Сущность заявляемого способа заключается в том, что спиртовой раствор ДФПГ имеет длительный стабильный сигнал в виде ЭПР-спектра, из которого можно выразить количество парамагнитных частиц. Число парамагнитных частиц свободного радикала ДФПГ снижается после добавления вещества обладающего АОА в результате протекания химических реакций в соответствии с концентрацией и количеством функциональных групп:



где DPPH^{\bullet} - стабильный радикал ДФПГ,

Ar-OH - вещество с антиоксидантными свойствами,

Ar-O^{\bullet} - промежуточный радикальный продукт взаимодействия АО с ДФПГ,

DPPH-H - восстановленная форма ДФПГ,

Ar-O-DPPH - молекулярный продукт взаимодействия АО с ДФПГ,

Ar-O-O-Ar - молекулярный продукт рекомбинации радикалов АО.

Определение антиоксидантной активности проводят по разности количества парамагнитных частиц стабильного свободного радикала, измеряемых до и после полного прохождения химических реакций (1-2) между свободным радикалом и анализируемым веществом. Определение проводят после завершения химической реакции, которое сопровождается снижением количества парамагнитных частиц свободного радикала после добавления анализируемого вещества. АОА в этом случае рассчитывают по формуле:

$$AOA = \frac{(n_{s1} - n_{s2}) * C_{DPPH}}{n_{s1}}$$

где АОА - антиоксидантная активность, М-экв;

C_{DPPH} - концентрация ДФПГ в исходном растворе, М;

n_{s1} - начальное количество парамагнитных частиц ДФПГ, ед.;

n_{s2} - количество парамагнитных частиц ДФПГ после взаимодействия с анализируемым веществом, ед.

В качестве реагентов могут быть использованы стабильные катион радикалы, например 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ). В качестве веществ, обладающих АОА, могут быть использованы индивидуальные антиоксиданты, биодобавки, соки, лекарственные экстракты, экстракты различных сортов чая и кофе.

В качестве протонных растворителей могут быть использованы метиловый и этиловый спирты. Также может быть использована смесь растворителей.

Емкость для измерений должна быть изготовлена из кварца или стекла. Указанные отличия существенны. В предложенном способе измеряется на прямую содержание свободного радикала в виде количества парамагнитных частиц. Использование в качестве единиц измерения антиоксидантной активности моль эквивалентов в литре позволяет сравнивать результаты, полученные различными методами. Концентрация исходного раствора стабильного радикала значительно больше концентрации вещества обладающего АОА в исследуемом образце, поэтому химическая реакция протекает быстро, что увеличивает экспрессность метода. Прямой расчет парамагнитных частиц позволяет устанавливать механизм взаимодействия радикала ДФПГ с АО.

В настоящее время из патентной и научно-технической литературы неизвестен способ определения антиоксидантной активности в заявляемой совокупности признаков.

На фиг. 1 представлена зависимость поглощаемой мощности переменного поля от напряженности внешнего магнитного поля. ЭПР-спектры ДФПГ: 1 - до

взаимодействия с аскорбиновой кислотой; 2 - после взаимодействия с аскорбиновой кислотой.

На фиг. 2 представлена зависимость поглощаемой мощности переменного поля от напряженности внешнего магнитного поля. ЭПР-спектры ДФПГ: 3 - до взаимодействия с пирокатехином; 4 - после взаимодействия с пирокатехином.

На фиг. 3 представлена зависимость поглощаемой мощности переменного поля от напряженности внешнего магнитного поля. ЭПР-спектры ДФПГ: 5 - до взаимодействия с зеленым чаем; 6 - после взаимодействия с зеленым чаем.

На фиг. 4 представлена зависимость поглощаемой мощности переменного поля от напряженности внешнего магнитного поля. ЭПР-спектры ДФПГ: 7 - до взаимодействия с черным чаем; 8 - после взаимодействия с черным чаем.

Способ иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1

Навеску ДФПГ растворили в этаноле с итоговой концентрацией 0,001М. Получили ЭПР-спектр приготовленного раствора ДФПГ. После математической обработки ЭПР-спектра получили значения количества парамагнитных частиц ($n_{s1}=1,95*10^{16}$ ед.) и концентрации свободного радикала ДФПГ ($C_{DPPH}=1,03*10^{-3}$ М).

Далее в 1 мл приготовленного раствора ДФПГ внесли $1*10^{-4}$ М спиртового раствора аскорбиновой кислоты. Получили ЭПР-спектр приготовленной смеси. Установившееся значение количества парамагнитных частиц после протекания реакции между свободным радикалом ДФПГ и аскорбиновой кислотой составляет $n_{s2}=1,38*10^{16}$ ед.

ЭПР-спектры свободного радикала ДФПГ до и после взаимодействия с аскорбиновой кислотой приведены на фиг. 1.

Антиоксидантную активность аскорбиновой кислоты рассчитывали по формуле:

$$AOA = \frac{(n_{s1} - n_{s2}) * C_{DPPH}}{n_{s1}}$$

где АОА - антиоксидантная активность аскорбиновой кислоты, М-экв;

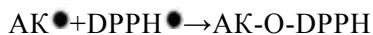
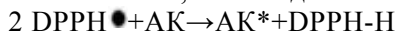
C_{DPPH} - концентрация свободного радикала ДФПГ в исходном растворе, М;

n_{s1} - начальное количество парамагнитных частиц свободного радикала ДФПГ;

n_{s2} - количество парамагнитных частиц свободного радикала ДФПГ после

взаимодействия с аскорбиновой кислотой.

Расчет показал, что с учетом разбавления АОА аскорбиновой кислоты равна $3,01*10^{-4}$ М-экв, что свидетельствует протеканию предполагаемых реакций (1 и 2):



где АК - аскорбиновая кислота,

$AK \bullet$ - промежуточный радикальный продукт окисления аскорбиновой кислоты.

Получившееся значение АОА объясняется наличием двух функциональных групп в молекуле аскорбиновой кислоты, которые нейтрализуют две молекулы свободного радикала ДФПГ, а также протеканием реакции между продуктом окисления аскорбиновой кислоты и одной молекулой свободного радикала ДФПГ с образованием стабильного молекулярного продукта.

Пример 2

Навеску ДФПГ растворили в этаноле с итоговой концентрацией 0,001М. Получили ЭПР-спектр приготовленного раствора ДФПГ. После математической обработки ЭПР-спектра получили значения количества парамагнитных частиц ($n_{s1}=1,85*10^{16}$ ед.) и концентрации свободного радикала ДФПГ ($C_{DPPH}=0,98*10^{-3}$ М).

Далее в 1 мл приготовленного раствора ДФПГ внесли $1*10^{-4}$ М водного раствора пирокатехина. Получили ЭПР-спектр приготовленной смеси. Установившееся значение количества парамагнитных частиц после протекания реакции между свободным радикалом ДФПГ и пирокатехином составляет $n_{s2}=1,09*10^{16}$ ед.

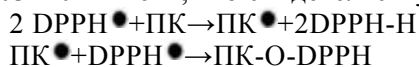
ЭПР-спектры свободного радикала ДФПГ до и после взаимодействия пирокатехином приведены на фиг. 2.

Антиоксидантную активность пирокатехина рассчитывали по формуле:

$$AOA = \frac{(n_{s1} - n_{s2}) * C_{DPPH}}{n_{s1}}$$

где АОА - антиоксидантная активность пирокатехина, М-экв;
 C_{DPPH} - концентрация свободного радикала ДФПГ в исходном растворе, М;
 n_{s1} - начальное количество парамагнитных частиц свободного радикала ДФПГ;
 n_{s2} - количество парамагнитных частиц свободного радикала ДФПГ после взаимодействия с пирокатехином.

Расчет показал, что с учетом разбавления значение АОА пирокатехина составляет $4,03 \cdot 10^{-4}$ М-экв, что свидетельствует о протекании предполагаемых реакций (1 и 2):



где PK - пирокатехин,

$PK \bullet$ - промежуточный радикальный продукт окисления пирокатехина.

Получившееся значение АОА объясняется наличием двух функциональных групп в молекуле пирокатехина, которые нейтрализуют две молекулы ДФПГ, а также протеканием реакции между продуктом окисления пирокатехина и двумя молекулами ДФПГ с образованием стабильных молекулярных продуктов.

Пример 3

Чайный пакетик Greenfield® (зеленый чай с мелиссой) заливали 100 мл кипятка, настаивали 6-8 мин. Пакетик вынимали, раствор доводили дистиллированной водой до метки (100 мл).

Навеску ДФПГ растворили в метаноле с итоговой концентрацией 0,001М. Полученный раствор измерили на ЭПР-спектрометре. После математической обработки ЭПР-спектра получили значения количества спинов ($n_{s1}=1,90 \cdot 10^{16}$ ед.) и концентрации ДФПГ ($C_{DPPH}=1,00 \cdot 10^{-3}$ М).

Далее в 1 мл раствора ДФПГ внесли водный раствор зеленого чая. Полученный раствор измерили на ЭПР-спектрометре. Установившееся значение количества спинов после протекания реакции между ДФПГ и зеленым чаем составляет $n_{s2}=1,15 \cdot 10^{16}$ ед.

Спектры ДФПГ до и после взаимодействия с зеленым чаем, полученные на ЭПР-спектрометре, приведены на фиг. 3.

Антирадикальную активность зеленого чая рассчитывали по формуле:

$$AOA = \frac{(n_{s1} - n_{s2}) * C_{DPPH}}{n_{s1}}$$

где АОА - антиоксидантная активность зеленого чая, М-экв;

C_{DPPH} - концентрация стабильного радикала ДФПГ в исходном растворе, М;

n_{s1} - начальное количество парамагнитных частиц ДФПГ;

n_{s2} - количество парамагнитных частиц ДФПГ после взаимодействия с зеленым чаем.

Расчет показал, что с учетом разбавления АОА зеленого чая составляет $3,97 \cdot 10^{-4}$ М-экв.

Пример 4

Чайный пакетик Принцесса Нури® (черный чай классический) заливали 100 мл кипятка, настаивали 6-8 мин. Пакетик вынимали, раствор доводили дистиллированной водой до метки (100 мл).

Навеску ДФПГ растворили в метаноле с итоговой концентрацией 0,001М. Полученный раствор измерили на ЭПР-спектрометре. После математической обработки ЭПР-спектра получили значения количества спинов ($n_{s1}=1,85 \cdot 10^{16}$ ед.) и концентрации ДФПГ ($C_{DPPH}=0,98 \cdot 10^{-3}$ М).

Далее в 1 мл раствора ДФПГ внесли водный раствора черного чая. Полученный раствор измерили на ЭПР-спектрометре. Установившееся значение количества спинов после протекания реакции между ДФПГ и черным чаем составляет $n_{s2}=0,97 \cdot 10^{16}$ ед.

Спектры ДФПГ до и после взаимодействия с зеленым чаем полученные на ЭПР-спектрометре приведены на фиг. 4.

Антиоксидантную активность черного чая рассчитывали по формуле:

$$AOA = \frac{(n_{s1} - n_{s2}) * C_{DPPH}}{n_{s1}}$$

где АОА - антиоксидантная активность черного чая, М-экв;

C_{DPPH} - концентрация стабильного радикала ДФПГ в исходном растворе, М;

n_{s1} - начальное количество спинов ДФПГ;

n_{s2} - количество спинов ДФПГ после взаимодействия с черным чаем.

Расчет показал, что с учетом разбавления АОА черного чая равна $4,53 \cdot 10^{-4}$ М-экв.

Таким образом, технический результат заключается в повышении точности, сокращении измерительных стадий, что приводит к повышению экспрессности определения, введения универсальных единиц измерения, возможности установления механизма реакции взаимодействия АО со свободным радикалом ДФПГ.

Формула изобретения

Способ определения антиоксидантной активности веществ методом ЭПР-спектроскопии, заключающийся в том, что спиртовой раствор стабильного радикала ДФПГ смешивают с раствором, содержащим вещество, обладающее антиоксидантной активностью (АОА), количественную оценку АОА проводят из ЭПР-спектров спиртового раствора ДФПГ, отличающийся тем, что оценку антиоксидантной активности проводят по уменьшению числа парамагнитных центров стабильного радикала, рассчитанных из ЭПР-спектров до реакции и после полного прохождения химической реакции между радикалом и анализируемым веществом, в качестве меры антиоксидантной активности вещества используют моль эквиваленты в литре, полученные из разности количества парамагнитных частиц радикала до и после взаимодействия с АО, а значение АОА рассчитывают по формуле:

$$AOA = \frac{(n_{s1} - n_{s2}) * C_{ДФПГ}}{n_{s1}}$$

где

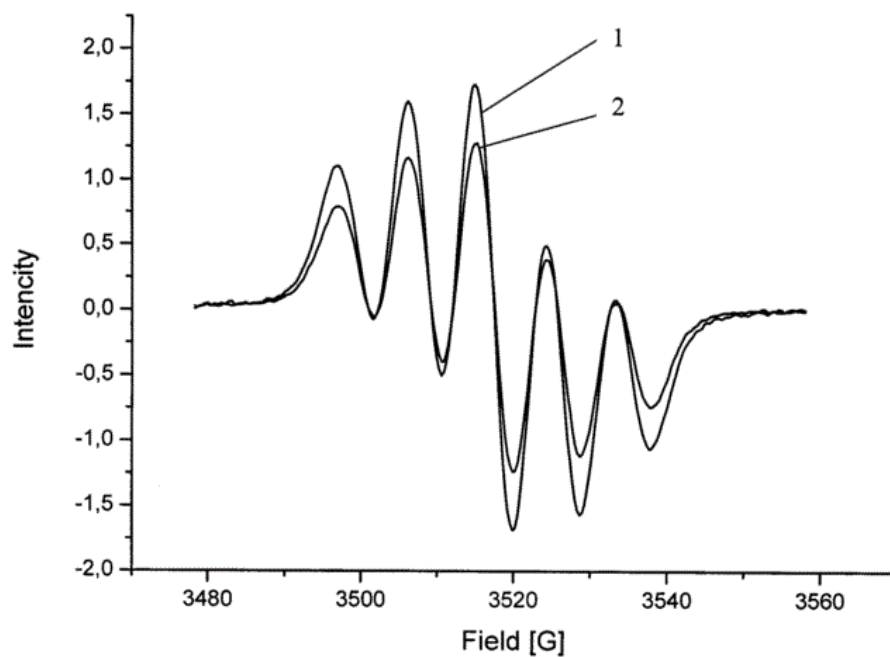
АОА - антиоксидантная активность, М-экв;

$C_{ДФПГ}$ - концентрация ДФПГ в исходном растворе, М;

n_{s1} - начальное количество парамагнитных частиц ДФПГ, ед.;

n_{s2} - количество парамагнитных частиц ДФПГ после взаимодействия с анализируемым веществом, ед.

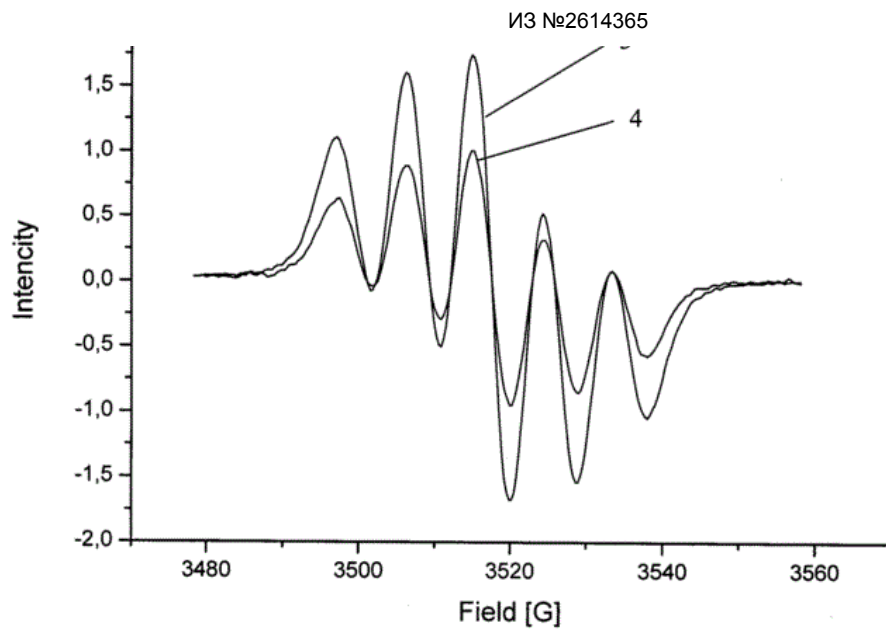
Спектры ДФПГ до и после
взаимодействия с
аскорбиновой кислотой
полученные на ЭПР –
спектрометре



Фиг.1

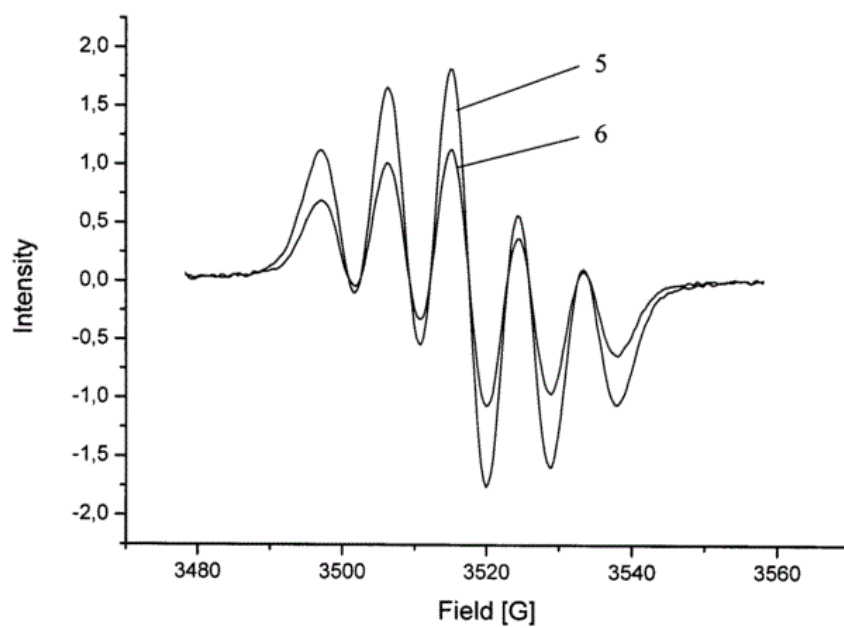
Спектры ДФПГ до и после
взаимодействия с
пирокатехином полученные
на ЭПР – спектрометре

2,0 }



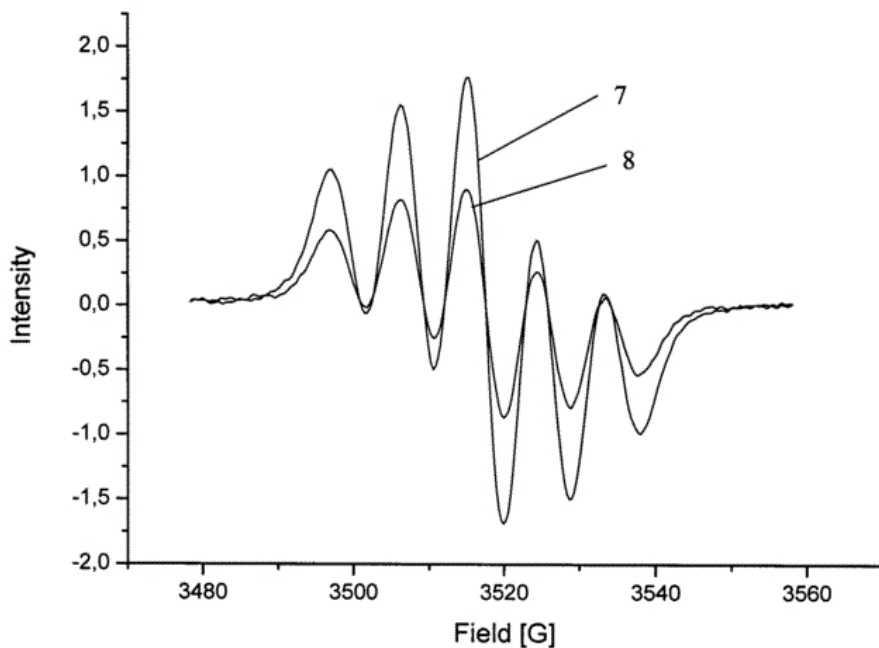
Фиг.2

Спектры ДФПГ до и после
взаимодействия с зеленым чаем
полученные на ЭПР –
спектрометре



Фиг.3

Спектры ДФПГ до и после
взаимодействия с черным чаем
полученные на ЭПР –
спектрометре



Фиг.4

ИЗВЕЩЕНИЯ

ММ4А Досрочное прекращение действия патента из-за неуплаты в установленный срок пошлины за поддержание патента в силе

Дата прекращения действия патента: **01.01.2018**

Дата внесения записи в Государственный реестр: **19.10.2018**

Дата публикации и номер бюллетеня: [19.10.2018](#) Бюл. №29

