



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **107506** (13) **C2**
(51) МПК (2015.01)
G01N 33/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2013 02626	(72) Винахідник(и):	Хомич Галина Панасівна (UA), Вікуль Світлана Іванівна (UA), Капельянец Леонід Вікторович (UA), Осипова Лариса Анатоліївна (UA), Лозовська Тетяна Сергіївна (UA)
(22) Дата подання заявки:	04.03.2013	(73) Власник(и):	ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	12.01.2015	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 0101129 A2, 04.01.2001 Физиологические и биохимические методы анализа растений: Практикум/Калинингр. У- т, Авт-сост. Г.Н. Чупахина.- Калининград, 2000.- С. 27-28
(41) Публікація відомостей про заяву:	10.09.2014, Бюл.№ 17		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	12.01.2015, Бюл.№ 1		

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ОБ'ЄКТІВ ПРИРОДНОГО ПОХОДЖЕННЯ

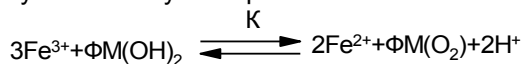
(57) Реферат:

Винахід належить до харчової промисловості, зокрема до способу визначення біологічної активності об'єктів природного походження, наприклад, ягоди шовковиці, чорниці, чорної смородини тощо. Заявлено спосіб визначення біологічної активності об'єктів природного походження, наприклад ягід шовковиці, чорниці, чорної смородини, який включає підготовку контрольного і дослідного зразків, визначення зміни оптичної густини контрольного і дослідного зразків і наступне визначення біологічної активності об'єкта по визначеній формулі. Запропонований спосіб забезпечує високу достовірність показника біологічної активності рослинної сировини.

UA 107506 C2

Винахід належить до харчової промисловості, зокрема до способу визначення біологічної активності об'єктів природного походження, наприклад, ягоди шовковиці, чорниці, чорної смородини тощо.

Відомий спосіб визначення біологічної активності фітомеланінів (ФМ) із відходів рослинної сировини (див. Жеребин Ю.Л., Литвина Т.М. Биологически активные фитомеланины из отходов растительного сырья", Научно-технический информационный сборник статей "Передовой производственный опыт в медицинской промышленности, рекомендуемый для внедрения", выпуск 1, Москва, 1991 г.), який передбачає отримання фітомеланінів із відходів рослинної сировини (стулки бавовни, жом цукрового буряка, лузга насіння соняшника) і використання очищених препаратів фітомеланінів для визначення біологічної активності. Очищені препарати фітомеланінів (0,25 мг) у фосфатному буфері (рН 7,2) прискорювали перенесення електрону у системі $\text{NAD} \cdot \text{H}_2$ ($0,72 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) – $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($3,65 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) в 2,5-3,0 рази. Процес відновлення Fe^{3+} описується наступним рівнянням з константою рівноваги $\lg K=4,0-4,1$ при 25°C :



де $\text{FM}(\text{OH})_2$ і $\text{FM}(\text{O}_2)$ - відновлена (фенольна) та окислена (хіноїдна) форми ФМ відповідно.

Але, даний спосіб передбачає визначення біологічної активності в отриманих очищених препаратах фітомеланінів, а не в сировині, яка використовується, як джерело для отримання фітомеланінів.

Найбільш близьким до заявленого способу є спосіб визначення біологічної активності у соках (див. Жеребин Ю.Л., Викуль С.И. Новый метод оценки биологической ценности соков, Информационный листок № 019-94, Одесса, 1994 г.).

Для проведення визначення спочатку аналізують контрольний зразок, а потім дослідний. У випадку контрольного зразку в суху колбу відбирають 3 мл розчину фероціаніду калію ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), 6 мл буферного розчину з рН 7, 1 мл дистильованої води і 1 мл відновленого нікотинамідаденіндинуклеотиду ($\text{NAD} \cdot \text{H}_2$). Зміну оптичної щільності контрольного зразка внаслідок прямого окиснення $\text{NAD} \cdot \text{H}_2$ фероціанідом калію знаходять при $\lambda=325 \text{ нм}$ за формулою:

$$\Delta A^K = A_0^K - A_{180}^K,$$

де: ΔA^K - зміна оптичної густини контрольного зразка в результаті прямого окислювання $\text{NAD} \cdot \text{H}_2$ фероціанідом калію;

A_0^K - вихідна оптична густина контрольного зразка;

A_{180}^K - оптична густина контрольного зразка через 180 с.

Для визначення дослідного зразку соку в суху пробірку відбирають 3 мл фероціаніду калію; 5 мл буферного розчину рН 7; 1 мл розчину $\text{NAD} \cdot \text{H}_2$; 1 мл досліджуваного соку. Суміш швидко перемішують і знімають оптичну щільність на фотоколориметрі. Досліджуваним зразком є суміш 9 мл дистильованої води і 1 мл досліджуваного соку. Знаходять зміну оптичної щільності системи у присутності соку при $\lambda=325 \text{ нм}$ за формулою:

$$\Delta A^{\text{CIK}} = A_0^{\text{CIK}} - A_{180}^{\text{CIK}},$$

де: ΔA^{CIK} - зміна оптичної густини дослідного зразка (соку) в результаті прямого окислювання $\text{NAD} \cdot \text{H}_2$ фероціанідом калію;

A_0^{CIK} - вихідна оптична густина дослідного зразка (соку);

A_{180}^{CIK} - оптична густина дослідного зразка (соку) через 180 с.

Біологічну активність соків знаходять за формулою:

$$\eta = \frac{\Delta A^{\text{CIK}} - \Delta A^K}{180}.$$

Даний спосіб обрано прототипом.

Прототип і винахід, що заявляється мають спільні ознаки:

- підготовка контрольного зразка;
- підготовка дослідного зразка;
- визначення зміни оптичної густини контрольного зразка;
- визначення зміни оптичної густини дослідного зразка;
- визначення біологічної активності об'єкта природного походження по формулі.

При визначенні біологічної активності соку за прототипом використовують критерій оцінки біологічної активності соку та сировини, заснований на каталізі перенесення електрона продуктом у системі "никотинамідаденіндинуклеотид відновлений ($\text{NAD} \cdot \text{H}_2$) - фероціанід калію $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ".

5 NAD^+ є коферментом так званих піридинзалежних дегідрогеназ - ферментів, що відносяться до класу оксидоредуктаз, що здійснюють перенесення відновлених еквівалентів від різних субстратів у дихальний ланцюг або до відновлених реакцій біосинтезу.

10 Найважливіша біологічна функція NAD^+ - окисленість або відновлюваність, а також його концентрація в клітині відіграють провідну роль у регуляції швидкості й напрямку реакції проміжного обміну.

У клітині переважають процеси, механізм яких складається в окислюванні $\text{NAD} \cdot \text{H}_2$ до NAD і цей механізм перенесення електронів від окислюючого субстрату до кисню складає головне джерело енергії для росту і розвитку організму.

15 В організмі концентраційне співвідношення $\text{NAD}/\text{NAD} \cdot \text{H}_2$ являє собою одну з найважливіших ланок внутрішньоклітинної регуляції енергетичного обміну і розглядається як одна із програм регенерації аденозинтрифосфорної кислоти в клітині. Причому збільшення концентрації NAD створює передумови для активації енергетичного гомеостазу.

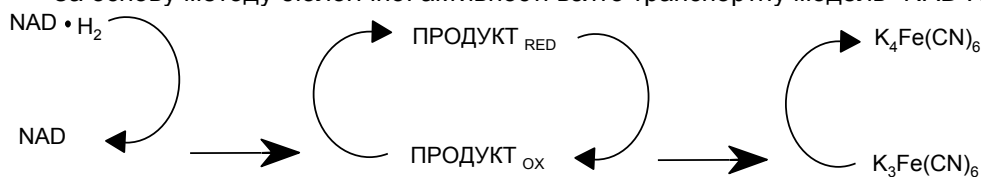
Одним з найважливіших аспектів дії енергетичного гомеостазу є зміна концентраційного відношення $\text{NAD} / \text{NAD} \cdot \text{H}_2$ точніше, редокс-потенціал системи.

20 Будь-яке відхилення від фізіологічного контролю, наприклад, голодування, супроводжується зниженням співвідношення $\text{NAD} / \text{NAD} \cdot \text{H}_2$.

Таким чином, переходи від $\text{NAD} \rightarrow \text{NADH}_2$ істотні для редокс-властивостей клітин і регулюють внутрішньоклітинні метаболічні процеси.

25 Здатність різних біологічно активних компонентів сировини викликати не ензиматичне окислювання $\text{NAD} \cdot \text{H}_2$ до NAD й одночасно відновлювати Fe^+ до Fe^{2+} показує, що ці речовини можуть підвищувати загальну неспецифічну опірність організму.

За основу методу біологічної активності взято транспортну модель $-\text{NAD} \cdot \text{H}_2 - \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$.



30 Але спосіб оцінки біологічної активності за прототипом передбачає підготовку соків шляхом розведення дистильованою водою у співвідношенні 1:10. Даним способом не можна визначити біологічну активність рослинної сировини, наприклад, ягід шовковиці чорної, чорниці, чорної смородини тощо.

35 В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб визначення біологічної активності об'єктів природного походження, в якому шляхом зміни технології приготування дослідного зразка, а також умов проведення процесу, забезпечити високу достовірність показника біологічної активності рослинної сировини.

40 Поставлена задача вирішена в способі визначення біологічної активності об'єктів природного походження, що передбачає підготовку контрольного і дослідного зразків, визначення зміни оптичної густини контрольного і дослідного зразків і наступне визначення біологічної активності об'єкта по формулі тим, що наважку рослинного матеріалу розтирають в присутності кварцового піску та фосфатного буферного розчину при pH 6,8-7,4, переносять за допомогою буферного розчину у мірну колбу при ступені розведення 1:(50-200), настоюють з буферним розчином 8-12 хв і фільтрують, а підготовлену витяжку розводять у дистильованій воді у співвідношенні 1:(10-100) і додають до суміші буфера і фероціаніду калію, вносять розчин $\text{NAD} \cdot \text{H}_2$ і розраховують біологічну активність по відношенню зміни швидкості окислювання $\text{NAD} \cdot \text{H}_2 / \text{NAD}$ в контрольному та дослідному зразках із урахуванням розведення, а швидкість окиснення визначають, вимірюючи оптичну густину розчинів дослідного та контрольного зразків за довжиною хвилі 325 нм і товщини поглинаючого шару 10 мм (за $t=120$ с) за формулою:

$$\text{Б.а.} = \frac{(A_0^D - A_{120}^D) \cdot V \cdot K}{(A_0^K - A_{120}^K) \cdot m}, \text{ ум. од. акт.}$$

50 де: A_0^D - вихідна оптична густина дослідного зразка;

A_{120}^D - оптична густина дослідного зразка через 120 с;

A_0^K - вихідна оптична густина контрольного зразка;

A_{120}^K - оптична густина контрольного зразка через 120 с;

V - місткість мірної колби, мл;

K - ступінь розведення витяжки у дистильованій воді;

5 m - наважка сировини, г.

Умови здійснення способу (вид буферу, тривалість настоювання, а також наявність або відсутність операції розтирання рослинного матеріалу з кварцовим піском) підібрані експериментально. Так, нами встановлено, що:

10 а) відсутність операції розтирання рослинного матеріалу без кварцового піску дає більш низькі показники біологічної активності;

б) розтирання рослинного матеріалу в присутності цитратного буфера з рН 2,7 дає більш низькі показники біологічної активності рослинної сировини.

Дані наведені в таблиці.

15 Спосіб здійснюється наступним чином. Попередньо готується витяжка з рослинної сировини шляхом розтирання її з кварцовим піском та фосфатним буферним розчином (рН від 6,8 до 7,4), перенесенням за допомогою буферного розчину розтертої наважки у мірну колбу (ступінь розведення від 50 до 200), ретельного перемішування і настоювання від 8 до 12 хв. і фільтрування. Підготовлена витяжка з рослинної сировини проходить етап розведення дистильованою водою у співвідношенні від 10 до 100 раз і додається в систему буфер -

20 фероціанід калію, а потім вноситься розчин $\text{NAD}\cdot\text{H}_2$. Визначення зміни оптичної густини в контрольній та дослідній (розведена витяжка з рослинної сировини) системах відрізняється тим, що вимірюється вихідна оптична густина контрольного або дослідного зразків та їх оптична густина при довжині хвилі 325 нм і товщині поглинального шару 10 мм через 120 с. Визначають біологічну активність по відношенню зміни швидкості окислювання $\text{NAD}\cdot\text{H}_2$ / NAD в

25 контрольному та дослідному зразках із урахуванням розведення за формулою:

$$\text{Б.а.} = \frac{(A_0^D - A_{120}^D) \cdot V \cdot K}{(A_0^K - A_{120}^K) \cdot m},$$

де: $(A_0^D - A_{120}^D)$ - зміна оптичної густини дослідного зразка (витяжки сировини) в результаті прямого окислювання $\text{NAD}\cdot\text{H}_2$ фероціанідом калію; $(A_0^K - A_{120}^K)$ - зміна оптичної густини контрольного зразка в результаті прямого окислювання $\text{NAD}\cdot\text{H}_2$ фероціанідом калію;

30 V - місткість мірної колби, мл;

K - ступінь розведення витяжки у дистильованій воді;

m - наважка сировини, г.

Приклад 1

35 Для визначення біологічної активності брали наважки (1 г) ягід шовковиці чорної, додавали 0,5 г кварцового піску і розтирали з фосфатним буферним розчином (рН 7,0) і переносили за допомогою буферного розчину у мірні колби місткістю 100 мл, ретельно перемішували і зразок витримували протягом 10 хв, а потім фільтрували. Отриманий фільтрат розводили у дистильованій воді у співвідношенні 1:9 і додавали 1 мл в систему буфер (5 мл) - фероціанід калію (3 мл), а потім вносили розчин $\text{NAD}\cdot\text{H}_2$ (1 мл). Визначали оптичну густина контрольного зразку (без витяжки, але при додаванні в систему 6 мл буферного розчину) та дослідного зразку, вимірюючи оптичну густина за довжиною хвилі 325 нм і товщини поглинаючого шару 10 мм у вихідних зразках та через 120 с

40 При використанні фосфатного буферу (рН 7,0) зміна оптичної густини контрольного зразка в результаті прямого окислювання $\text{NAD}\cdot\text{H}_2$ фероціанідом калію ($\Delta K^K = A_0^K - A_{120}^K$) склала 0,02 од., а зміна оптичної густини дослідного зразка (витяжки шовковиці чорної) в результаті прямого окислювання $\text{NAD}\cdot\text{H}_2$ фероціанідом калію ($\Delta K^D = A_0^D - A_{120}^D$) склала 0,049 од. Визначаємо біологічну активність по відношенню зміни швидкості окислювання $\text{NAD}\cdot\text{H}_2$ / NAD в контрольному та дослідному зразках із урахуванням розведення за формулою:

$$\text{Б.а.} = \frac{0,049 \cdot 100 \cdot V \cdot 10}{0,020 \cdot 0,958} = 2557,4, \text{ ум. од. акт.}$$

50 де: 0,049 - зміна оптичної густини дослідного зразка (витяжки сировини) в результаті прямого окислювання $\text{NAD}\cdot\text{H}_2$ фероціанідом калію;

0,020 - зміна оптичної густини контрольного зразка в результаті прямого окислювання NAD·H₂ фероціанідом калію; 100 - місткість мірної колби, мл; 10 - ступінь розведення витяжки у дистильованій воді; 0,958 - наважка сировини, г.

Результати розрахованої біологічної активності шовковиці чорної наведені в таблиці.

5 Приклад 2

Проводили визначення біологічної активності чорниці, як наведено в прикладі 1, ягоди (1,047 г) розтирали в присутності фосфатного буферного розчину (pH 6,8) при тривалості екстрагування 10 хв. При використанні фосфатного буферу (pH 6,8) зміна оптичної густини контрольного зразка в результаті прямого окислювання NAD·H₂ фероціанідом калію (ΔA^K) складала 0,02 од., а зміна оптичної густини дослідного зразка (витяжки чорниці) в результаті прямого окислювання NAD·H₂ фероціанідом калію (ΔA^D) складала 0,044 од. Результати розрахунку біологічної активності чорниці наведені в таблиці.

10 Приклад 3

Проводили визначення біологічної активності чорної смородини, як наведено в прикладі 1, ягоди (наважка 0,901 г) розтирали в присутності фосфатного буферного розчину (pH 7,4) при тривалості екстрагування 10 хв.

При використанні фосфатного буферу (pH 7,4) зміна оптичної густини контрольного зразка в результаті прямого окислювання NAD·H₂ фероціанідом калію (ΔA^K) складала 0,02 од., а зміна оптичної густини дослідного зразка (витяжки чорної смородини) в результаті прямого окислювання NAD·H₂ фероціанідом калію (ΔA^K) складала 0,036 од.

Результати розрахунку біологічної активності чорної смородини наведені в таблиці.

15 Приклад 4

Проводили визначення біологічної активності шовковиці чорної, як наведено в прикладі 1, але ягоди (наважка 1,048 г) розтирали в присутності цитратного буферного розчину (pH 2,7) при тривалості екстрагування 10.

При використанні цитратного буферу (pH 2,7) зміна оптичної густини контрольного зразка в результаті прямого окислювання NAD·H₂ фероціанідом калію ($\Delta K^K = A_0^K - A_{120}^K$) складала 0,02 од., а зміна оптичної густини дослідної зразка (витяжки шовковиці чорної) в результаті прямого окислювання NAD·H₂ фероціанідом калію ($\Delta K^K = A_0^K - A_{120}^K$) складала 10 хв витримки - 0,033 од.

Результати розрахованої біологічної активності шовковиці чорної наведені в таблиці.

Приклади 5, 6 здійснювали аналогічно прикладу 4, але брали різні види сировини. Дані наведені в таблиці.

20 Приклад 7

Проводили визначення біологічної активності шовковиці чорної, як наведено в прикладі 1, ягоди (наважка 1,0 г) розтирали в присутності фосфатного буферного розчину (pH 7,0) без додавання кварцового піску при тривалості екстрагування 10 хв.

При використанні фосфатного буферу (pH 7,0) зміна оптичної густини контрольного зразка в результаті прямого окислювання NAD·H₂ фероціанідом калію (ΔA^K) складала 0,02 од., а зміна оптичної густини дослідного зразка (витяжки чорної смородини) в результаті прямого окислювання NAD·H₂ фероціанідом калію (ΔA^D) складала 0,044 од.

Результати розрахунку біологічної активності шовковиці чорної наведені в таблиці.

Приклади 8, 9 здійснювали аналогічно прикладу 7, але брали різні види сировини. Дані наведені в таблиці.

Таблиця

Результати біологічної активності ягід, ум. од. акт.

№ п/п	Назва зразка	Тривалість витримки, хв	pH	Біологічна активність (ум. од. акт.)
З фосфатним буфером і кварцовим піском				
1.	Шовковиця чорна	10	7,0	2557,4
2.	Чорниця	10	6,8	2101,2
3.	Чорна смородина	10	7,4	1997,8
З цитратним буфером і кварцовим піском				
4.	Шовковиця чорна	10	2,7	1574,4
5.	Чорниця	10	2,7	1984,1
6.	Чорна смородина	10	2,7	1318,2
З фосфатним буфером без кварцового піску				
7.	Шовковиця чорна	10	7,0	2199,4
8.	Чорниця	10	6,8	2020,2
9.	Чорна смородина	10	7,4	1629,1

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 Спосіб визначення біологічної активності об'єктів природного походження, що передбачає підготовку контрольного і дослідного зразків, визначення зміни оптичної густини контрольного і дослідного зразків і наступне визначення біологічної активності об'єкта по формулі, який **відрізняється** тим, що наважку рослинного матеріалу розтирають в присутності кварцового піску та фосфатного буферного розчину при pH 6,8-7,4, переносять за допомогою буферного розчину у мірну колбу при ступені розведення 1:(50-200), настоюють з буферним розчином 8-12 хвилин і фільтрують, а підготовлену витяжку розводять у дистильованій воді у співвідношенні 1:(10-100) і додають до суміші буфера і фероціаніду калію, вносять розчин NAD·H₂ і розраховують біологічну активність по відношенню зміни швидкості окислювання NAD·H₂/NAD в контрольному та дослідному зразках із урахуванням розведення, а швидкість окиснення визначають, вимірюючи оптичну густину розчинів дослідного та контрольного зразків за довжиною хвилі 325 нм і товщини поглинаючого шару 10 мм (за τ=120 с) за формулою:

$$Б.а. = \frac{(A_0^D - A_{120}^D) \cdot V \cdot K}{(A_0^K - A_{120}^K) \cdot m}, \text{ ум. од. акт.}$$

де: A_0^D - вихідна оптична густина дослідного зразка,

A_{120}^D - оптична густина дослідного зразка через 120 с,

20 A_0^K - вихідна оптична густина контрольного зразка,

A_{120}^K - оптична густина контрольного зразка через 120 с,

V - місткість мірної колби, мл,

K - ступінь розведення витяжки у дистильованій воді,

m - наважка сировини, г.

25

Комп'ютерна верстка В. Мацело

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