

УДК 635.07.001.76

АДАПТАЦІЯ МЕТОДУ КУЛОНОМЕТРИЧНОГО ТИТРУВАННЯ ЩОДО ВИЗНАЧЕННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ ТА ДІЄТИЧНИХ ДОБАВОК

В. В. Євлаш

Доктор технічних наук, професор, завідувач кафедру
Кафедра загальної та харчової хімії*
Контактний тел.: (057) 349-45-66, 0934931146

В. Г. Міхайленко

кандидат технічних наук, доцент
Кафедра товарознавства, управління якістю та
екологічною безпекою*
Контактний тел.: (067) 270-85-91, (095) 018-48-46
E-mail: polvakin@mail.ru

В. О. Акмен

аспірант, старший викладач
Кафедра товарознавства в митній справі
*Харківський державний університет харчування та
торгівлі
Харків, вул.. Клочківська 333, Україна, 61202
Контактний тел.: (057) 349-45-60, 093-78-93-177
E-mail: kafedra224@mail.ru

У роботі наведено короткий аналіз найбільш відомих методів визначення антиоксидантної активності та запропоновано спосіб адаптації методу кулонометричного титрування для визначення антиоксидантної активності рослинної сировини та нових дієтичних добавок «Редгем», «Калгем», «Фітогем» як у фільтрованих так і нефільтрованих їх водних екстрактах

Ключові слова: Антиоксиданти, екстракти, кулонометричне титрування, дієтичні добавки, рослинна сировина

В работе приведен короткий анализ наиболее известных методов определения антиоксидантной активности и предложен способ адаптации метода кулонометрического титрования для определения антиоксидантной активности растительного сырья и новых диетических добавок «Редгем», «Калгем», «Фитогем» как в отфильтрованных так и в неотфильтрованных их водных экстрактах

Ключевые слова: Антиоксиданты, экстракты, кулонометрическое титрование, диетические добавки, растительное сырьё

This work shows short analysis of the most known methods of determination of antioxidant activity and offers the method of adaptation of method of coulometric titration to determine antioxidant activity of digister and new dietary additions of «Redgem», «Kalgem», «Fytogem» as in filtered so in unfiltered water extracts

Key words: Antioxidant, extracts, coulometric titration, dietary additions, digister

Вступ

Забруднення навколишнього середовища, надмірне споживання синтетичних ліків, харчових добавок і консервантів, до яких людина еволюційно непристосована, а також дефіцит в їжі рослинних компонентів сприяє пригнічванню природньо-запрограмованих функцій захисту організму. Це сприяє активізації окислювальних реакцій, результатом яких є накопичення в клітинах і тканинах людини вільних радикалів, які можуть бути причиною передчасного старіння організму, атеросклерозу, гіпертонії, ішемії, раку, алергії, катаракти та ін. [1].

Існує ряд речовин, які здатні блокувати і нейтралізувати вільні радикали та захистити людський організм від їх накопичення й шкідливої дії. Це

речовини, що володіють антиоксидантними властивостями (каротиноїди, аскорбінова кислота, лікопін, фітонциди, антоціани, токофероли, таніни, катехіни та ін.). Основним джерелом таких речовин є рослинна група товарів. Цим пояснюється підвищений інтерес щодо дослідження антиоксидантних властивостей продуктів рослинного походження для створення профілактичних і лікувальних антиоксидантних засобів природного походження, перевагою яких є їх м'яка дія на організм, відсутність або незначність прояву побічних ефектів [1]. У зв'язку з вищезазначеним актуальним є пошук методів для оцінки антиоксидантної активності рослинної сировини і дієтичних добавок з її використанням.

Аналіз існуючих методів дослідження

Для визначення антиоксидантної активності існує ряд методів, серед яких найчастіше використовуються хімічні і електрохімічні, що засновані на прямому або непрямому вимірюванні швидкості або повноти реакції антиоксидантів, що містяться в пробі з відповідними окисниками (вільний бром, інші галогени, радикал кисню, синтетичні довгоживучі радикали, комплекс Fe^{3+} і ін.).

Перед проведенням вимірювань проводиться екстрагування сировини. Екстрагент, що використовується для аналізу, повинен бути безпечним і доступним. Як правило, перевагу віддають водним екстрактам так як основні групи антиоксидантів є водорозчинними речовинами: полісахариди, пігменти, циклічні спирти, органічні кислоти, біофлавоноїди, дубильні речовини, мікроелементи, вітаміни [2].

Зі всіх відомих методів визначення антиоксидантної активності (АА) можна виділити три основних типи, що засновані на: споживанні кисню; утворенні продуктів окислення; поглинанні або зв'язуванні вільних радикалів. У першому і в другому випадках АА визначається на основі інгібування ступеню, або швидкості поглинання реактивів чи утворення нових продуктів реакції. До основних методів відносять: 1. ORAC – oxygen radical absorbance capacity (киснева радикальна ємність спектральної поглинальної здатності); 2. TRAP – total radical trapping antioxidant parameter (повно- радикальний заманоючий антиокислювальний параметр); 3. FRAP – ferric reducing antioxidant power (залізозміншуюча окислювальна здатність); 4. TEAC – (Randox) – trolox equivalent antioxidant capacity (вмістність антиоксиданту тролокс- еквіваленту)); 5. ABTS – (2,2) – azinobis (3-ethyl-benzthiazoline)-6-sulfonic acid; 6. TBARS – thiobarbituric acid reactive substance (тіобарбитурова кислотна реактивна субстанція).

Як правило АА не може вимірюватися безпосередньо, зазвичай вимірюють вплив антиоксидантів на ступінь окислення. У цих методах антиоксидантна активність є функцією багатьох параметрів, зокрема часу, температури, природи речовини, концентрації антиоксиданту і інших сполук. Всі запропоновані методи, як правило, видають суперечливі дані, що не корелюють між собою [3, 4]. Крім того, недоліком більшості методів є застосування спеціального реактиву чималої вартості.

Найбільшого поширення, серед електрохімічних методів, набув кулонометричний метод (КМ) визначення антиоксидантів, який заснований на вимірюванні кількості електрики, що проходить через комірку при окисленні аналізованої речовини на поверхні з певним потенціалом. Кінець досліджень фіксують за моментом стрибка електричного струму. Авторами цього методу вперше введена характеристика «антиоксидантна здатність за бромом», яка виражається в одиницях кількості електрики (кулонах), витраченої на титрування 100г (100мл) досліджуваного об'єкту електрогенованим бромом. Значення бромістої антиоксидантної здатності відображає сумарний вміст антиоксидантів в досліджуваних зразках [5, 6].

Кулонометричний метод має ряд переваг: без урахування пробопідготовки, час окремого визначення займає до однієї години; реєстрація і обробка

результатів проходить у реальному часі; правильність і відтворюваність аналізу забезпечуються за рахунок точної реєстрації моменту стрибка струму; межа виявлення поліфенолів і флавоноїдів на рівні нано-, і пікограмів. Однак недоліком методу є залежність отриманих результатів від чистоти розчину між двома вимірювальними платиновими електродами, стрибок струму між якими є індикатором кінця титрування. Тобто амперометрична індикація в кулонометричному титруванні дозволяє проводити вимірювання лише за умови попередньої фільтрації дослідного екстракту, що не забезпечує повноту даних про антиоксидантну активність дослідного зразка.

Для експрес-оцінки антиоксидантних властивостей рослинних екстрактів часто використовується метод, запропонований І. Прилуцьким, заснований на зміні окислювально-відновного потенціалу в неактивованих неорганічних розчинах і складних біохімічних середовищах та потенціометричний метод запропонований вченими під керівництвом Брайниної Х.З. [7].

Однак слід зазначити, що методам кулонометрії, для дослідження антиоксидантних властивостей сировини, приділена недостатня увага, і вони ще мало використовуються в аналітичній практиці заводських, науково-дослідних та навчальних лабораторій. Тому дослідження спрямовані на пошук нових підходів та удосконалення існуючого методу кулонометричного титрування для визначення антиоксидантної активності порошкоподібних дієтичних добавок та рослинної сировини є актуальними.

Мета роботи полягала в адаптації методу кулонометричного титрування щодо визначення антиоксидантної активності рослинної сировини та порошкоподібних дієтичних добавок.

Виклад результатів досліджень

На підставі принципів, що запропоновані І. Прилуцьким нами проведено адаптацію методу кулонометричного титрування електрогенованим бромом, та запропоновано новий підхід до оцінки інтегральної антиоксидантної активності рослинної сировини і дієтичних добавок з використанням лікарської рослинної сировини.

Дослідження антиоксидантної активності проводили у водних екстрактах дієтичних добавок «Редгем», «Калгем», «Фітогем» (являють собою порошок, отриманий на основі крові ВРХ з додаванням рослинної сировини) та у водних екстрактах лікарської рослинної сировини: календули, крапиви та шипшини. Для приготування екстрактів наважку відповідного зразка масою 5 г поміщували у колбу та заливали дистильованою водою $t 25 \pm 2^\circ C$ об'ємом 200мл. Екстракцію проводили при постійному перемішуванні на магнітному змішувачі протягом 30 хв. Після цього частину екстракту фільтрували для видалення зважених часток, іншу частину фільтруванню не піддавали, а залишали для подальших досліджень у вигляді суспензії (нефільтрований екстракт зі зваженими часточками сировини). Для визначення антиоксидантної активності брали 5 мл одного з отриманих екстрактів і вносили в кулонометричну комірку адаптованої установки. Кулонометрична комірка являє собою набір електродів (ро-

бочий анод-графітовий, допоміжний електрод, капіляр Лугіна; електрод порівняння (хлорсрібний); вимірювальний електрод).

Для ініціювання процесу електрогенерації ми пропускали струм через систему. Під впливом струму на аноді виділяється вільний бром, який вступає у реакцію з речовинами, що мають антиоксидантну активність та поступово нейтралізує їх. На відміну від методу кулонометрії з амперометричною індикацією, ми використовували потенціометричну індикацію для реєстрації завершення експерименту. В той момент, коли в системі з'явився вільний бром (тобто антиоксиданти у розчині вже відсутні), відбувався стрибок потенціалу, який ми і фіксували.

Для наочності та вірності визначення моменту різкого збільшення потенціалу будували графічна залежність, де за віссю «Х» відкладається час вимірювань, хв, а за віссю «У» – значення, що були зняті на іонометрі, Вт.

Розрахунки проводили виходячи з того, що кількість речовин з антиоксидантною активністю прямо пропорційна часу, який витрачено на титрування та струму (який є постійним) і зворотно пропорційна кількості проби взятої для дослідження. При цьому розраховували кількість електрики (Кл відносно до 100г продукту), що пройшла скрізь розчин водного екстракту під час титрування електрогенерованим бромом до моменту стрибка потенціалу.

На рис. 1. наведено адаптовану схему установки для вимірювання антиоксидантної активності суспензій рослинної сировини та дієтичних добавок «Редгем», «Калгем», «Фітогем».

Розрахунок антиоксидантної активності 100г дослідної сировини проводили за формулою:

$$Q = \frac{I\tau}{M} \times 100$$

де: I – кількість електрики, що проходить через ланцюг за 1 с, Кл/с;

τ – час, який пройшов від початку досліду до моменту стрибка потенціалу, с;

M – маса наважки дослідної сировини, г;

Q – антиоксидантна активність 100 г дослідної сировини, Кл.

В таблиці 1 наведено результати визначення антиоксидантної активності дієтичних дабавок та лікарської рослинної сировини.

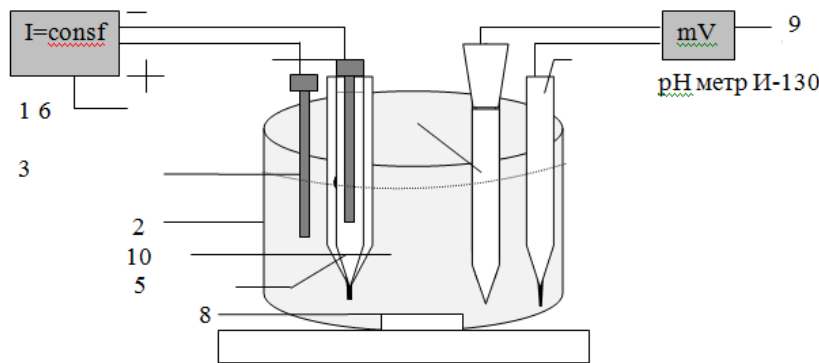


Рис. 1. Принципова схема установки для визначення антиоксидантної активності суспензій : 1 – джерело живлення з силою струму 1мА; 2 – лабораторний стакан; 3 – робочий анод-графітовий; 4 – допоміжний електрод; 5 – капіляр Лугіна; 6 – електрод порівняння (хлорсрібний); 7 – вимірювальний електрод; 8 – магнітна мішалка; 9 – електронний мілівольтметр (рН метр И-130); 10 – суспензія дієтичної добавки у водному розчині (H2SO4 + KBr)

Таблица 1

Антиоксидантна активність дієтичних добавок та лікарської рослинної сировини

Зразки	Бромна АОА,	
	Кл / 100 г продукту (n=3, p=0,95) у фільтрованих екстрактах	у суспензіях
Порошок з шипшини d = (60...100) ' 10-6 м	3420	4360
Порошок з шипши d = (30...60) ' 10-6 м	3540	4680
Порошок з календули d = (30...60) ' 10-6 м	2320	3040
Порошок з календули d = (20...30) ' 10-6 м	2580	3240
Порошок з кропиви d = (30...60) ' 10-6 м	2180	2750
Порошок з кропиви d = (20...30) ' 10-6 м	2540	3120
Дієтична добавка «Редгем»	1120	1210
Дієтична добавка «Фітогем»	990	1100
Дієтична добавка «Калгем»	980	1090

Як видно з таблиці 1 показник антиоксидантної активності у зразках суспензій дієтичних добавок на 10-15%, а у зразках рослинної сировини на 25-30% вищий за показник отриманий у тих же зразках після фільтрації. До того ж з таблиці видно, що на показник антиоксидантної активності впливає також ступінь дисперстності досліджуемого зразка.

Розроблена установка дозволяє визначати антиоксидантну активність не лише у фільтрованих екстрактах, а й у суспензіях і забезпечує меншу похибку при вимірюваннях у паралельних пробах так як достовірність отриманих результатів не залежить від електропровідності дослідного екстракту, яка

визначається відсутністю зважених часток між електродами. Додатковою перевагою нової установки є можливість використання в якості робочих електродів для електрогенерації броду графіту замість платини, що дозволяє значно здешевити установку та проводити визначення антиоксидантної активності у лабораторних умовах навіть на практичних заняттях зі студентами.

Адаптований метод відрізняється експресністю (швидкістю), простотою і дозволяє, як і відомий метод амперометричного титрування, визначити антиоксиданти кількісно.

Висновки

Таким чином проведено адаптацію методу кулонометричного титрування для визначення антиоксидантної активності рослинної сировини та нових дієтичних добавок «Редгем», «Калгем», «Фітогем» як у фільтрованих так і нефільтрованих їх водних екстрактах.

Література

1. Владимиров, Ю.А. . Свободные радикалы в живых системах [Текст] / Ю.А. Владимиров, О.А.Азизова, А.И.Деев и др.// Итоги науки и техники. Серия. Биофизика. – 1991. – Т. 29. – С. 15–50.
2. Ушанова, В.М. Влияние степени измельчения сырья на процесс экстракции [Текст] / В.М. Ушанова, С.В. Ушанова, С.М. Репях // Изв. Вузов Лесной журнал. – 1998. – № 1. – С. 101-105.
3. Макарова, М.Н. Обзор методов оценки антирадикальной активности природных соединений [Текст] / М.Н. Макарова, В.Г. Макаров // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения : материалы IX международного съезда «Фитофарм – 2005», 22-25 июня. Санкт-Петербург, Россия. – 2005. – С. 102–116.
4. T. Sathish Kumara, S. Shanmugama, T. Palvannan. Evaluation of Antioxidant Properties of *Elaeocarpus ganitrus* Roxb. Leaves B. and M. Bharathi Kumara // Iranian Journal of Pharmaceutical Research. – 2008. – 7 (3): 211-215. Received: May 2007. Accepted: November 2007. [Электронный ресурс] – Режим доступа : www.SID.ir <<http://www.SID.ir> – Загол. з екрану.
5. Хасанов, В.В. Методы исследования антиоксидантов [Текст] / В.В. Хасанов, Г.А. Рыжова, Е.Р. Мальцева // Химия растительного сырья. – 2004. – № 3. – 45с.
6. Экспрессная оценка антиоксидантной активности растительного сырья [Текст] / И.Ф.Абдуллин, Н.Н.Чернышева, Е.Н.Турова, Е.Н.Офицеров и др. // II Всероссийская конференция Химия и технология растительных веществ : Казань, 24-27 июня 2002 г., [Электронный ресурс] – Режим доступа : Ildar.FAbdullin@ksu.ru – Загол. з екрану.
7. Прилуцкий, В.И. Окислительно-восстановительный потенциал для характеристики противокислительной активности различных напитков и витаминных компонентов [Текст] / В.И. Прилуцкий // Электрохим. активация в медицине, сел. хозяйстве, пром-сти : I Междунар. симпозиум. – М., 1997. – 120 с.