



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013106281/15, 13.02.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.02.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 13.02.2013

(43) Дата публикации заявки: 20.08.2014 Бюл. № 23

(45) Опубликовано: 10.12.2014 Бюл. № 34

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **Исследование фармакологических свойств сабельника болотного экстракта сухого. Автореферат. Перечень данных [онлайн] 2009 [Найдено 10.12.2013] " найдено из Интернет: URL: <http://medical-diss.com/medicina/issledovanie-farmakologicheskikh-svoystv-sabelnika-bolotnogo-ekstrakta-suhogo> .Модельные системы перекисного окисления липидов и их применение для (см. прод.)**

Адрес для переписки:

302019, г.Орел, ул. Генерала Родина, 69, ФГБОУ
ВПО "Орел ГАУ", РФ

(72) Автор(ы):

**Ярован Наталья Ивановна (RU),
Комиссарова Наталья Анатольевна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Орловский государственный аграрный университет" (ФГБОУ ВПО Орел ГАУ) (RU)(54) СПОСОБ ОЦЕНКИ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ИЗ САБЕЛЬНИКА БОЛОТНОГО (*Comarum palustre* L.)

(57) Реферат:

Изобретение относится к способу оценки антиоксидантной активности растительного сырья из сабельника болотного (*Comarum palustre* L.). Способ оценки антиоксидантной активности растительного сырья из сабельника болотного (*Comarum palustre* L.) заключается в определении антиоксидантной активности в водных настоях сабельника болотного по снижению уровня свободно-радикального окисления, который определяют по уровню малонового диальдегида

(МДА) методом взаимодействия с тиобарбитуровой кислотой в модельной системе перекисного окисления липидов, представленной полученными из лецитина липосомами. Вышеописанный способ снижает трудоемкость определения антиоксидантной активности и упрощает обработку полученных результатов, снижает стоимость проведения анализа, повышает точность определения. 1 табл.

(56) (продолжение):

оценки антиоксидантного действия лекарственных препаратов. Автореферат. Перечень данных [он-лайн] 2001 [Найдено 10.12.2013] " найдено из Интернет: URL: <http://medical-diss.com/medicina/modelnye-sistemy-perekisnogo-okisleniya-lipidov-i-ih-primenenie-dlya-otsenki-antioksidantnogo-deystviya-lekarstvennyh-pre> . RU 2255559 C2, 10.07.2005



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 535 139**⁽¹³⁾ **C2**

(51) Int. Cl.
A61K 36/73 (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2013106281/15, 13.02.2013

(24) Effective date for property rights:
13.02.2013

Priority:

(22) Date of filing: 13.02.2013

(43) Application published: 20.08.2014 Bull. № 23

(45) Date of publication: 10.12.2014 Bull. № 34

Mail address:

302019, g.Orel, ul. Generala Rodina, 69, FGBOU
VPO "Orel GAU", RF

(72) Inventor(s):

Jarovan Natal'ja Ivanovna (RU),
Komissarova Natal'ja Anatol'evna (RU)

(73) Proprietor(s):

Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego
professional'nogo obrazovanija "Orlovskij
gosudarstvennyj agrarnyj universitet" (FGBOU
VPO Orel GAU) (RU)

(54) **METHOD OF ESTIMATING ANTIOXIDANT ACTIVITY OF VEGETABLE RAW MATERIAL FROM SWAMP CINQUEFOIL (Comarum palustre L.)**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to method of estimating antioxidant activity of vegetable raw material from swamp cinquefoil (Comarum palustre L.). Method of estimating antioxidant activity of vegetable raw material from swamp cinquefoil (Comarum palustre L.) consists in determination of antioxidant activity in water tinctures of swamp cinquefoil by reduction of the level of free-radical oxidation, which is determined by

the level of malonic dialdehyde (MDA) by method of interaction with thiobarbituric acid in model system of lipid peroxidation, represented by liposomes obtained from lecithin.

EFFECT: method reduces labour intensiveness of antioxidant activity determination and simplifies processing of obtained results, reduces cost of carrying out analysis, and increases determination accuracy.

1 tbl

R U 2 5 3 5 1 3 9 C 2

R U 2 5 3 5 1 3 9 C 2

Изобретение относится к ветеринарии и может быть использовано для оценки антиоксидантной активности сабельника болотного (*Comarum palustre* L.), в частности для разработки способов лечения окислительного стресса у животных и птиц.

Установлено, что ряд патологических состояний в организме животных и птиц сопровождается усилением свободно-радикального окисления липидов и снижением антиоксидантной защиты. Это состояние рассматривают как окислительный стресс. Показателем уровня свободно-радикального окисления липидов при окислительном стрессе принято считать уровень малонового диальдегида (МДА). МДА относится к карбольшим соединениям, являющихся одной из основных групп продуктов перекисного окисления липидов как в живых организмах, так и *in vitro* (Зайцев В.Г. Модельные системы перекисного окисления липидов и их применение для оценки антиоксидантного действия лекарственных препаратов: дисс. ... канд. биол. наук. Волгоград, 2001). - [1]

В связи со снижением антиоксидантной защиты у животных и птиц при окислительном стрессе требуется введение дополнительных антиоксидантов, лучше природного происхождения. Поэтому в последнее время ведется поиск растений для производства природных антиоксидантных препаратов.

В отличие от синтетических лекарственных препаратов препараты из растительного сырья обладают малой токсичностью и лучшей переносимостью. Поэтому актуальной задачей является создание антиоксидантного препарата из растительного сырья, обладающего антиоксидантным действием, и разработка способов оценки антиоксидантной активности растительного сырья. Таким сырьем может являться сырье из сабельника болотного (*Comarum palustre* L.), обладающего различным фармакологическим действием, в том числе и антиоксидантным.

Сабельник болотный (*Comarum palustre* L.) как лекарственное растение используется издавна и представляет большой интерес для ветеринарной медицины. Однако несмотря на широкое использование сабельника болотного (*Comarum palustre* L.) в медицине (Титович Л.В. Терапевтическая эффективность препаративных форм сабельника болотного при стронгилятозах желудочно-кишечного тракта молодняка жвачных // Международный вестник ветеринарии. - 2011. - №1. - С.40-44) - [2], для применения в ветеринарии антиоксидантных препаратов на его основе не разработано.

Для разработки и создания антиоксидантного препарата из сырья сабельника болотного (*Comarum palustre* L.) необходимо произвести оценку его антиоксидантного действия. Антиоксидантная активность не может измеряться напрямую, обычно измеряют влияние антиоксидантов на степень окисления (Яшин Я.И., Яшин А.Я. Проблема определения содержания антиоксидантов / Я.И. Яшин, А.Я. Яшин // Компетентность. - 2009. - №8 - С.50-53). - [3]

Известен электрохимический способ оценки антиоксидантной активности растительного сырья, в частности сабельника болотного (*Comarum palustre* L.), заключающийся в кулонометрическом титровании растительных вытяжек электрогенерированным бромом, который получают электрохимическим окислением брома на платиновом электроде в кислых средах. Электрогенерированный бром вступает в радикальные и окислительно-восстановительные реакции, а также реакции электрофильного замещения и присоединения по кратным связям с соединениями, обладающими антиоксидантными свойствами. Для количественной оценки антиоксидантной активности введена антиоксидантная бромная способность, выраженная в единицах количества электричества, затраченного на титрование 100 мл или 100 г препарата электрогенерированным бромом (Абдуллин И.Ф. Экспрессная оценка антиоксидантной активности растительного сырья / И.Ф. Абдуллин, Н.Н.

Чернышева, Е.Н. Турова, Е.Н. Офицеров, Г.К. Будников, Р.Ш. Хазиев // II Всероссийская конференция Химия и технология растительных веществ. - 2002. - С.77-78). - [4]

Недостатками данного способа оценки антиоксидантной активности растительного сырья является трудоемкость, необходимость специального дорогостоящего оборудования, сложного в эксплуатации, дорогостоящих реагентов (платиновые электроды), что, вместе с определенной сложностью интерпретации получаемых результатов, делает этот метод мало подходящим для широкомасштабных скрининговых экспериментов. Кроме того, бром и йод могут окислить не только антиоксиданты, но и другие соединения [3]. Это исказит истинные результаты по определению антиоксидантной активности, то есть уменьшит точность ее определения.

Задачей предлагаемого способа является снижение трудоемкости определения антиоксидантной активности и упрощение обработки полученных результатов, снижение стоимости проведения анализа, повышение точности определения.

Поставленная задача решается благодаря тому, что в известном способе определения антиоксидантной активности сабельника болотного (*Comarum palustre L.*), заключающемся в определении антиоксидантной активности в водных настоях сабельника болотного (*Comarum palustre L.*) по снижению уровня свободно-радикального окисления, согласно изобретению уровень свободно-радикального окисления определяют по уровню малонового диальдегида (МДА) методом взаимодействия с тиобарбитуровой кислотой в модельной системе перекисного окисления липидов, представленной полученными из лецитина липосомами.

Данная система не включает в себя дорогостоящих реактивов, что позволяет проводить широкомасштабные скрининговые исследования и повышает точность определения.

Реализация способа состоит в следующем:

Готовят 2 модельные системы перекисного окисления липидов: контрольную (1) - без добавления сабельника болотного (*Comarum palustre L.*) и опытную (2) - с добавлением сабельника болотного (*Comarum palustre L.*). В модельных системах перекисного окисления липидов исследуют уровень свободно-радикального окисления липидов по показателю МДА.

Определение МДА в используемой модельной системе дает высокую точность, так как МДА не взаимодействует с химическими веществами, не обладающими антиоксидантной активностью. Метод является не трудоемким и не дорогостоящим, поскольку стоимость фотоколориметра КФК-2 (стоимость оборудования составляет 18500 руб. (по данным www.Pro-partner.ru)) намного ниже стоимости потенциостата (стоимость оборудования 55000-130000 рублей (по данным www.Elins.su)).

Пример. Экспериментальные исследования проводились в химических лабораториях ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный Университет» и в инновационном научно-исследовательском испытательном центре ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный Университет».

Объектами исследований являлось растительное сырье из сабельника болотного.

1 этап. Готовились 2 модельные системы перекисного окисления липидов по одной и той же схеме:

1 - контрольная (система без добавления сабельника болотного)

2 - опытная (с добавлением сабельника болотного)

Приготовление липосом. Для приготовления 10% раствора лецитина вводили лецитина в 5 мл 96%-го спирта, нагревали до 30-40°C и интенсивно перемешивали до однородного состояния. Липосомы готовили инъекционным способом: в 5 мл дистиллированной

воды при постоянном интенсивном помешивании шприцом с тонкой иглой быстро впрыскивали 0,25 мл раствора 10%-го раствора лецитина.

Окисление липосом. В приготовленные суспензии липосом контрольной (1) и опытной (2) модельных систем (обеих систем) впрыскивали 0,125 мл 3 мМ перекись водорода (H₂O₂) и нагревали при температуре 37°C в течение 6 часов. Далее 2 суток выдерживали при комнатной температуре.

2 этап. Определение концентрации МДА в модельной системе. В контрольную модельную систему (1): к 0,5 мл суспензии липосом добавляли 0,5 мл 0,92 М раствора трихлоруксусной кислоты и 1 мл 49 мМ 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК). Нагревали 15 минут на кипящей водяной бане. После чего исследовали полученные растворы на фотоколориметре при длине волны 532 нм против дистиллированной воды.

В опытную модельную систему (2); к 0,5 мл суспензии липосом добавляли 0,0035 мл настоя, затем 0,5 мл 0,92 М раствора трихлоруксусной кислоты и 1 мл 49 мМ 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК). Нагревали 15 минут на кипящей водяной бане. После чего исследовали полученные растворы на фотоколориметре при длине волны 532 нм против дистиллированной воды.

В модельных системах (контрольной и опытной) перекисного окисления липидов исследовали уровень свободно-радикального окисления липидов по показателю МДА, МДА определяли по реакции с ТБК. Уровень МДА в контрольной модельной системе перекисного окисления липидов без добавления сабельника болотного (*Comarum palustre* L.) составил - 1,06 ед. опт. пл., а в опытной модельной системе перекисного окисления липидов с добавлением сабельника болотного (*Comarum palustre* L.) уровень МДА составил - 0,7775 ед. опт. пл.

Таблица		
Уровень МДА в модельных системах перекисного окисления липидов при использовании сабельника болотного (<i>Comarum palustre</i> L.) и без него		
Исследуемые показатели	Модельная система перекисного окисления липидов с добавлением сабельника болотного (<i>Comarum palustre</i> L.)	Модельная система перекисного окисления липидов без добавления сабельника болотного (<i>Comarum palustre</i> L.)
Уровень МДА, ед. опт. пл.	0,7775	1,06

Как видно из таблицы, уровень МДА с использованием сабельника болотного (*Comarum palustre* L.) снижается на 0,2825 ед. опт. пл. (26,65%), что указывает на снижение уровня свободно-радикального окисления (по уровню МДА) в модельной системе перекисного окисления липидов при введении препарата из сабельника болотного (*Comarum palustre* L.). Полученные результаты показали снижение стоимости проведения анализа антиоксидантной активности сабельника болотного (*Comarum palustre* L.), увеличение точности, а также снижение трудоемкости исследования, что упрощает получение конечных результатов. Таким образом, использование предлагаемого способа определения антиоксидантной активности сабельника болотного (*Comarum palustre* L.) позволяет подтвердить антиоксидантные свойства растительного сырья из сабельника болотного (*Comarum palustre* L.) и предложить его использование в ветеринарии в качестве антиоксидантного препарата.

Формула изобретения

Способ оценки антиоксидантной активности растительного сырья из сабельника болотного (*Comarum palustre* L.), заключающийся в определении антиоксидантной активности в водных настоях сабельника болотного (*Comarum palustre* L.) по снижению уровня свободно-радикального окисления, отличающийся тем, что уровень свободно-радикального окисления определяются по уровню малонового диальдегида (МДА)

методом взаимодействия с тиобарбитуровой кислотой в модельной системе перекисного окисления липидов, представленной полученными из лецитина липосомами.

5

10

15

20

25

30

35

40

45