



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 109813

(13) C2

(51) МПК

G01N 33/04 (2006.01)

G01N 21/93 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2013 13100

(22) Дата подання заявки: 11.11.2013

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: 12.10.2015

(41) Публікація відомостей
про заявку: 12.05.2015, Бюл.№ 9

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: 12.10.2015, Бюл.№ 19

(72) Винахідник(и):

Кулик Михайло Федорович (UA),
Обертюх Юрій Володимирович (UA),
Яківчук Катерина Сергіївна (UA),
Кулик Ярослава Михайлівна (UA),
Безносюк Олена Юріївна (UA)

(73) Власник(и):

ІНСТИТУТ КОРМІВ ТА СІЛЬСЬКОГО
ГОСПОДАРСТВА ПОДІЛЛЯ НААН,
пр. Юності, 16, м. Вінниця, 21100 (UA)

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

RU 2293984 C1, 20.02.2007

RU 2093817 C1, 20.10.1997

RU 2101706 C1, 10.01.1998

CS 9001468 A3, 17.06.1992

US 3567374 A, 02.03.1971

US 4040787 A, 09.08.1977

US 3511611 A, 12.05.1970

EP 0163367 A2, 04.12.1985

Anton S. Kinetic determination of urea in
serum by stopped-flow spectrophotometry / S.
Anton, M.C. Gutierrez, A. Gomez-Hens, D.
Perez-Bendito // Analytica Chimica Acta. –
1990. – Vol. 230. – P. 145–150

Evans R.T. Manual and automated methods
for measuring urea based on a modification of
its reaction with diacetyl monoxime and
thiosemicarbazide / R.T. Evans // Journal of
Clinical Pathology. – 1968. – Vol. 21(4). – P.
527–529

SU 1751675 A1, 30.07.1992

SU 1774262 A1, 07.11.1992

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ СЕЧОВИНИ В МОЛОЦІ

(57) Реферат:

Винахід належить до галузі сільського господарства.

Винахід стосується способу визначення вмісту сечовини в молоці, що базується на кольоровій реакції молока з 1 %-ним спиртовим розчином діметилгліоксиму і 0,025 %-ним розчином тіосемікарбазиду в 5 %-ній за об'ємом сірчаній кислоті, і подальшому кількісному визначенні вмісту сечовини в молоці за калібрувальним графіком.

UA 109813 C2

Винахід належить до сільського господарства, зокрема, біохімії тварин і клінічної медицини, стосується шляхів забезпечення корів білкововмісними кормами без негативного впливу на здоров'я тварин.

На сьогодні аналіз сечовини в молоці в ряді країн широко використовується як показник засвоєння протеїну кормів у лактуючих корів, а також для оцінки ефективності рубцевого травлення. Визначення сечовини в молоці доцільно використовувати також для контролю передозування у випадках збагачення кормів сечовиною (карбамідом). У ветеринарній практиці визначення сечовини в молоці використовується як діагностичний тест ниркової недостатності лактуючих тварин. У процесі молочнокислого бродіння рівень сечовини поступово знижується до нульових значень, таким чином визначення сечовини в кисломолочних продуктах використовується як показник технологічної ефективності процесу бродіння.

Відомі різні способи визначення вмісту сечовини в коров'ячому і жіночому молоці, зокрема: фотометричне визначення сечовини та її похідних [5], визначення сечовини і креатиніну в біологічних рідинах [4], визначення сечовини в біологічних рідинах і набір реактивів для його здійснення [3], кількісне визначення сечовини в лікарських формах із ліпофільною основою [1], кількісне визначення сечовини в молоці та молочних продуктах [2].

Американські дослідники використовують уреазний метод визначення сечовини в молоці, який базується на ферментативному гідролізі сечовини під дією комерційного препарату уреазу та визначенні утвореного в результаті цієї реакції аміаку. Проте цей метод вимагає чіткої стандартизації активності ферменту уреазу [2].

За прототип нами взятий відомий спосіб кількісного визначення сечовини в молоці та молочних продуктах з утворенням кольорової сполуки, який включає взаємодію продукту з аналітичним реагентом (1 %-ний спиртовий розчин диметилглюксиму і 0,025 %-ний розчин тіосемикарбазиду в 25 %-ній сірчаній кислоті), який додають в пробу, кип'ятять протягом 15 хвилин, охолоджують, фільтрують, отриманий кольоровий фільтрат колориметрують при 530 нм, а концентрацію сечовини визначають за калібрувальним графіком [2].

Проте існуючий спосіб визначення сечовини в молоці не дозволяє отримати стійкий яскравий червоно-пурпуровий колір реакції з молоком, а лише пурпурово-жовтий, який з часом у пробірках із чистою сечовиною змінюється з підвищенням в рази показників екстензії.

В основу винаходу поставлена задача вдосконалення способу визначення сечовини в молоці, який за рахунок використання як складової аналітичного реагенту розчину тіосемикарбазиду в 5 %-ній сірчаній кислоті, забезпечив би стійкий в часі яскравий червоно-пурпуровий колір реакції, а це, своєю чергою, дасть можливість більш точно визначити концентрацію сечовини, а також більш повне уявлення про якісний склад молока та змогу краще забезпечити корів білкововмісними кормами без негативного впливу на здоров'я тварин при об'єктивній оцінці забезпеченості раціону протеїном корів різного рівня продуктивності.

Поставлена задача вирішується тим, що у спосіб визначення кількісного вмісту сечовини в молоці, що включає взаємодію молока з аналітичними реагентами при кип'ятінні, згідно з винаходом, до 0,3 мл молока додають 3 мл дистильованої води і послідовно 0,3 мл 1 %-ого спиртового розчину диметилглюксиму та 3 мл 0,025 %-ого розчину тіосемикарбазиду в 5 %-ній за об'ємом сірчаній кислоті, суміш кип'ятять на водяній бані протягом 15 хвилин, охолоджують, фільтрують і колориметрують отриманий фільтрат яскравого червоно-пурпурового кольору при 530 нм та визначають концентрацію сечовини за калібрувальним графіком, побудованим з розведеннями 10^{-3} моль або 60 мг/мл розчину сечовини.

Інша відзнака способу, що пропонується, в тому, що молоко консервують етиловим спиртом у співвідношенні 1:2. Це дає можливість запобігати прокисанню молока.

Суть винаходу пояснюється такими прикладами:

Реактиви: 1 %-ний спиртовий розчин диметилглюксиму; 0,025 %-ний розчин тіосемикарбазиду в 5 %-ній (за об'ємом) сірчаній кислоті; 1 ммольний розчин сечовини (60 мг/л) для побудови калібрувального графіку. Обладнання: водяна баня (близько 100 °C); фотоелектроколориметр КФК-3 або UNICO.

Для аналізу вмісту сечовини в цільному молоці береться 0,3 мл проби молока (у 3-х паралелях) та додається 3,0 мл дистильованої води і послідовно по 0,3 мл спиртового розчину диметилглюксиму та 3 мл розчину тіосемикарбазиду в 5 %-ній за об'ємом сірчаній кислоті. Проби інкубують у кип'ячій водяній бані протягом 15 хвилин. По закінченні кип'ятіння проби охолоджують і фільтрують крізь паперовий фільтр. Прозорий фільтрат яскравого червоно-пурпурового кольору колориметрується при 530 нм у 10-мм кюветі. Для перерахунку оптичної щільності в ммоль/л або мг% сечовини будується калібрувальна крива з розведенням 1-ммольного розчину сечовини.

Оскільки для визначення вмісту сечовини відібране від корів молоко в умовах молочних ферм і молочних комплексів необхідно доставляти в лабораторію непрокислим, його можна консервувати етиловим спиртом. До 5 мл молока додається 10 мл спирту, перемішується, а потім фільтрується крізь паперовий фільтр для відділення жиру і денатурованих білків молока.

5 Фільтрат може зберігатися тривалий час до проведення аналізу. Для визначення вмісту сечовини в фільтраті береться проба об'ємом 0,9 мл і 2,4 мл дистильованої води та проводиться аналіз, як описано вище.

Верхньою межею концентрації сечовини в молоці є 30 мг%. Менш, ніж 15 мг% вмісту сечовини свідчить про недостатнє забезпечення протеїном корів в складі раціону. Оптимальний

10 вміст сечовини 20-30 мг %, менше 15 - низький, максимальна межа норми - 60 мг %.

Винахід може бути рекомендовано для використання у сільському господарстві, зокрема біохімії тварин і клінічній медицині.

Запропонований нами спосіб визначення вмісту сечовини в молоці є достатньо простим, реактиви - доступними, тому може бути використаним у будь-якій лабораторії, оснащений

15 сучасним фотоелектроколориметром.

Джерела інформації, взяті до уваги при описі винаходу

1. Спосіб кількісного визначення сечовини в лікарських формах з ліпофільною основою. Патент Український № 30617, А61N33/00/ Федущак Н.К., Ващенко К.Ф., Чолій Л.Ф., Зайченко О.І.; «Львівський державний медичний університет» - № 98031509. Заявка 25.03.1998; Опублік.

20 15.12.2000.

2. Способ количественного определения мочевины в молоке и молочных продуктах. Патент Российской Федерации № 2293984, G01N33/04/ Храмов В.А., Горлов И.Ф., Лютикова М.В.; «Государственное учреждение Волгоградский научно-исследовательский технологический институт мясо-молочного скотоводства и переработки продукции животноводства

25 Россельхозакадемии (ГУ ВНИТИ ММС и ППЖ Россельхозакадемии)» - № 2005122344/13. Заявка: 14.07.2005; Опублік. 20.02.2007.

3. Способ определения мочевины в биологических жидкостях и набор реактивов для его осуществления. Патент Российской Федерации № 2122740, G01N33/84/ Радионов Ю.В., Язвонская С.С.; «Общество с ограниченной ответственностью «Импакт»» - № 95121678/14.

30 Заявка 21.12.1995; Опубл. 27.11.1998.

4. Способ определения мочевины и креатинина в биологических жидкостях. Патент Российской Федерации № 2101706, G01 N33/50/ Моренкова С.А., Лопухин Ю.М.; «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины Минздрава РФ» - № 95107349/14.

35 Заявка 05.05.1995; Опублік. 0.01.1998.

5. Способ фотометрического определения мочевины и ее производных. Патент Российской Федерации № 2093817, G01 N21/78/ Бедняк А.Е., Павлова В.М., Гриднев Ю.С., Яцевич О.В.; «Хабаровский государственный медицинский институт» - № 93015129/25. Заявка: 23.03.1993; Опублік.

20.10.1997.

40 ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб визначення вмісту сечовини в молоці, що включає взаємодію молока з аналітичними реагентами при кип'ятінні, який **відрізняється** тим, що до 0,3 мл молока додають 3 мл дистильованої води і послідовно 0,3 мл 1 %-ого спиртового розчину диметилглюксиму та 3 мл

45 0,025 %-ого розчину тіосемикарбазиду в 5 %-ній за об'ємом сірчаній кислоті, суміш кип'ятять на водяній бані протягом 15 хвилин, охолоджують, фільтрують і колориметрують отриманий фільтрат яскравого червоно-пурпурового кольору при 530 нм та визначають концентрацію сечовини за калібрувальним графіком, побудованим з розведеннями 10^{-3} моль або 60 мг/мл розчину сечовини.

50 2. Спосіб визначення вмісту сечовини в молоці за п. 1, який **відрізняється** тим, що молоко попередньо консервують етиловим спиртом у співвідношенні 1:2.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601