



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **76883** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
G01N 30/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2012 05480	(72) Винахідник(и):	Куцан Олександр Тихонович (UA), Лаптева Катерина Анатоліївна (UA)
(22) Дата подання заявки:	03.05.2012	(73) Власник(и):	НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ", вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	25.01.2013		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.01.2013, Бюл.№ 2		

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ДЕЛЬТА-АМІНОЛЕВУЛІНОВОЇ КИСЛОТИ В СИРОВАТЦІ КРОВІ КУРЕЙ-НЕСУЧОК

(57) Реферат:

Спосіб визначення дельта-амінолевулінової кислоти в сироватці крові курей-несучок включає передколонкову дериватизацію 1-фтор-2,4-динітробензолом. Після здійснюють градієнтне елюювання та ідентифікацію методом обернено-фазової вискоєфективної рідинної хроматографії.

UA 76883 U

Корисна модель належить до аналітичної хімії, а саме до визначення дельта-амінолевулінової кислоти в сироватці крові тварин.

Дельта-амінолевулінова кислота (δ-АЛК), один із проміжних продуктів синтезу гему, попередник порфобіліногену, є біологічним маркером при отруєннях тварин сполуками важких металів, в тому числі плумбумом.

Існує спосіб визначення дельта-амінолевулінової кислоти в сечі [Mauzerall, D. The occurrence and determination of δ-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine [Text] / D. Mauzerall, Granick, S // J. Biol. Chem.-1956. - № 219. - P. 435-46.] Спосіб ґрунтується на розподілі порфобіліногену та дельта-амінолевулінової кислоти за допомогою адсорбції на колонках з іонообмінною смолою та колориметричному визначенні забарвленого в червоний колір АЛК-піролу. Але даний спосіб займає багато часу, недостатньо чутливий та специфічний.

Існує спосіб, який передбачає конденсацію δ-АЛК сечі з етилацетоацетатом та утворення АЛК-піролу, який реагує з п-диметилбензальдегідом, внаслідок чого утворюється забарвлений продукт, який визначають спектрофотометрично за довжини хвилі 555 нм [Tomokuni, K. Simple method for determination of urinary delta-aminolevulinic acid as an index of lead exposure [Text] / K. Tomokuni, M. Ogata // Clin. Chem.-1972. - Vol. 18. - P. 1534-6].

Недоліком цих способів є те, що їх не можна застосувати для визначення концентрації 5-АЛК в сироватці крові, оскільки її концентрація знаходиться на рівні, який ускладнює застосування аналітичних методів, що базуються на застосуванні спектрофотометричного детектування. Тому для покращення виявлення та хроматографічного розділення необхідно проводити дериватизацію амінокислоти, внаслідок чого буде утворена нова сполука з більш високим молярним коефіцієнтом поглинання в УФ-діапазоні. Дельта-амінолевулінова кислота належить до сполук амінокислотної природи, в зв'язку з чим, для її ідентифікації доцільно використовувати реактиви на вільну аміногрупу.

Найбільш близьким до запропонованого способу є спосіб визначення дельта-амінолевулінової кислоти в сечі методом вискоєфективної хроматографії [Ogata, M. Quantitative determination of urinary delta-aminolevulinic acid as an index of lead exposure by high-performance liquid chromatography [Text] / M. Ogata, T. Taguchi // Industrial Health.-1986, Vol. 24. - P. 259-264]. Спосіб передбачає взаємодію 8-АЛК з метилацетоацетатом та утворення АЛК-піролу, яке визначають методом вискоєфективної рідинної хроматографії. Умови хроматографування: колонка стальна "Reposil Pur Aqua" C18 150 × 4,0 мм, 5,0 мкм; швидкість рухомої фази 1,2 мл/хв; температура термостату колонки 25 °С; довжина хвилі детектування 260 нм, елюент: фосфатний буфер-ацетонітрил. Недоліком цього способу є недостатня чутливість та селективність.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб визначення дельта-амінолевулінової кислоти в сироватці крові курей-несучок, що включає дериватизацію, елюювання, ідентифікацію, згідно з корисною моделлю, здійснюють передколонкову дериватизацію 1-фтор-2,4-динітробензолом, градієнтне елюювання та ідентифікацію методом обернено-фазової вискоєфективної рідинної хроматографії зі спектрофотометричним детектуванням, щоб забезпечити ефективність способу.

Спосіб виконується таким чином. Для приготування розчину порівняння точну наважку 10 мг 8-АЛК вносять до мірної колби ємністю 100 мл, додають 80 мл 1 % розчину натрію тетраборату, перемішують до повного розчинення, доводять об'єм цим же розчинником до мітки та перемішують. До мірної колби ємністю 10 мл вносять 100 мкл розчину, додають 1,0 мл 3 % розчину 1-фтор-2,4-динітробензолу та 1,0 мл 1 % розчину натрію тетраборату, пробірку закривають, витримують у термостаті за температури 50 °С протягом 30 хв, потім додають 3 мл суміші діоксан-вода (1:1), кількісно переносять вміст пробірки до мірної колби ємністю 10 мл, доводять сумішшю розчинників до мітки та перемішують. Отриманий розчин фільтрують через фторопластовий фільтр з розміром пор не більше 0,5 мкм.

Хроматографічний аналіз ДНФ-похідного АЛК, отриманого після дериватизації, проводять з використанням колонки сталеної "Reposil Pur Aqua" C18 150 × 2,0 мм, 3,0 мкм для обернено-фазової вискоєфективної рідинної хроматографії. Градієнтне елюювання здійснюють шляхом змішування двох елюентів: рухома фаза "А" - 50 мл ацетонітрилу вносять до мірної колби ємністю 1000 мл, доводять об'єм фосфатним буферним розчином (рН 3,0) до мітки; рухома фаза "В" - 800 мл ацетонітрилу вносять до мірної колби ємністю 1000 мл та доводять об'єм фосфатним буферним розчином (рН 3,0) до мітки. Швидкість рухомої фази 0,4 мл/хв. Температура термостату колонки 35 °С. Детектування проводять з використанням спектрофотометричного детектору за довжини хвилі 360 нм. Ідентифікацію проводять за часом утримання піків.

Кількісний вміст дельта-амінолевулінової кислоти (X_i , мг/мл) розраховують за формулою:

$$X_i = \frac{S_i \times m_{oi} \times 0,1 \times 0,1 \times 10 \times 1000 \times P}{S_{oi} \times V \times 100 \times 100 \times 10 \times 100} = \frac{S_i \times m_{oi} \times P}{S_{oi} \times V \times 100000}$$

S_i - середнє значення площ піків ДНФ - похідного дельта-амінолевулінової кислоти, розраховане з хроматограм досліджуваного розчину;

S_{oi} - середнє значення площ піків ДНФ - похідного дельта-амінолевулінової кислоти, розраховане з хроматограм розчину стандартного зразка дельта-амінолевулінової кислоти;

m_{oi} - маса наважки стандартного зразка дельта-амінолевулінової кислоти, г;

V - об'єм досліджуваного зразка, мл;

P_i - вміст основної речовини у стандартному зразку дельта-амінолевулінової кислоти, %.

Приклад.

Для кількісного визначення дельта-амінолевулінової кислоти 1,0 мл сироватки крові курей-несучок вносили до пробірки ємністю 10 мл, додаючи 1,0 мл 3 % розчину 1-фтор-2,4-динітробензолу, 1,0 мл 1 % розчину натрію тетраборату, пробірку закривали, перемішували та витримували в термостаті за температури 50 °C протягом 30 хв. Потім додавали 3,0 мл суміші діоксан-вода (1:1). Вміст пробірки кількісно переносили до мірної колби ємністю 10,0 мл і доводили об'єм розчину до мітки сумішшю діоксан-вода (1:1) та перемішували. Отриманий розчин фільтрували через фторопластовий фільтр з розміром пор не більше 0,5 мкм. Хроматографування проводили на рідинному хроматографі з УФ-детектором в наступних умовах: колонка стальна "Reposil Pur Aqua" C18 150 × 2,0 мм, 3,0 мкм; швидкість рухомої фази 0,4 мл/хв; температура термостату колонки 35 °C; довжина хвилі детектування 360 нм; елюент: буферний розчин-ацетонітрил. Детектування проводили з використанням спектрофотометричного детектору за довжини хвилі 360 нм. Ідентифікацію проводили за часом утримання піків.

Для реагенту 1-фтор-2,4-динітробензолу, за даних умов хроматографування, характерна наявність піку з часом утримання 35,5 хв. Час утримання піку ДНФ-похідного амінокислоти становить 42,5 хв.

Таким чином спосіб визначення дельта-амінолевулінової кислоти методом обернено-фазової вискоєфективної рідинної хроматографії, що пропонується, є точним та селективним і може використовуватися як біологічний маркер для ранньої діагностики отруєнь курей - несучок сполуками плумбуму в лабораторіях ветеринарної медицини.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення дельта-амінолевулінової кислоти в сироватці крові курей-несучок, що включає дериватизацію, елюювання, ідентифікацію, який **відрізняється** тим, що здійснюють передколонкову дериватизацію 1-фтор-2,4-динітробензолом, градієнтне елюювання та ідентифікацію методом обернено-фазової вискоєфективної рідинної хроматографії зі спектрофотометричним детектуванням.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

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