



УКРАЇНА

(19) UA (11) 53153 (13) A

(51) 6 A61B5/00, C07B31/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ОКИСУ АЗОТУ В ТКАНИНІ ТА БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ

1

2

(21) 2002032337

(22) 25 03 2002

(24) 15 01 2003

(46) 15 02 2003, Бюл. № 1, 2003 р.

(72) Орлова Олена Анатоліївна, Комаревцева
Ірина Олександрівна, Комаревцев Віталій
Миколайович(73) Орлова Олена Анатоліївна, Комаревцева
Ірина Олександрівна, Комаревцев Віталій

Миколайович

(57) Спосіб визначення вмісту окису азоту в
тканині та біологічних рідинах, що полягає в
реєстрації нітрит- та нітрат-іонів шляхом
діазотування та відновлення, який відрізняється
тим, що одночасно визначаються нітрит-, нітрат-
іони та конвертація нітратів до нітритів з
використанням відновника - цинкового пилу

Винахід відноситься до області клінічної
діагностики, а саме - до біохімії

В зв'язку з широким спектром дії окису азоту
(NO) в нормі та при патологіях виник великий
інтерес до методів визначення NO та його
метаболітів - нітратів (NO₃) та нітритів (NO₂)

Всі методи визначення окису азоту можна
розділити на дві групи: методи виділення NO у
"режимі реального часу" та методи виділення
стійких метаболітів NO (NO₂/NO₃)

Методи 1 групи дозволяють зареєструвати
продукти NO в життєздатному біологічному
матеріалі: експлантатах тканини, біопсіях або
ізолюваних клітинах (лейкоцитах) [Wennmalm A,
Benthin G, Edlund A et al. Metabolism and excretion
of nitric oxide in humans: an experimental and clinical
study // Circ Res -1993 -N73 -P 1112 - 1127]

До таких методів відносяться електрохімічні,
хемілюмінесцентні (реакція NO з озоном)
[Moshage H, Kok B, Huizenga J R. Nitrite and nitrate
determinations in plasma: a critical evaluation // Clin
Chem - 1995 - N 41 - P 892 - 896],
спектрофотометричні (реакція NO з
оксигемоглобином) [Moshage H. Nitric oxide
determinations: much ado about NO - thing? // Clin
Chem - 1997 - N 43 - P 553 - 556]

Перевага цих методів заключається в тому,
що можливо визначення фактичного NO

Недодатки цих методів — технічна складність
та їх ефективність тільки для життєздатних
біологічних препаратів. Відповідно, ці методи не
підходять для біологічних рідин, позбавлених
клітин. Крім того, використання цих методів в
умовах in vivo достатньо ускладнено (за винятком

електрохімічних датчиків)

Спектрофотометричні методи 11 групи
дозволяють визначати метаболіти NO (NO₂/NO₃) в
гомогенаті, плазмі, сечі

Для визначення нітритів використовують
діазотування на основі реакції Гріса, але нітрати
при цьому не реєструються. Тому нітрати повинні
бути відновлені до нітритів, з подальшим
діазотуванням [Green L C, Wagner D A, Glogowski
J et al. Analysis of nitrate, nitrite and (¹⁵N) nitrate in
biological fluids // J Anal Biochem -1982 - N 126 -
P 131 - 138]. Таким чином, можна держати
сумарне значення (NO₂/NO₃) в пробі. Відновлення
нітратів до нітритів можна здійснити при обробці
проб азотнокислою редуктазою [Bones P N, Bones
C. Nitrate determination in biological fluids by an
enzymatic one-step assay with nitrate reductase //
Clin Chem -1995 -N 41 -P 904 - 907], на кадмії чи
підразині [Navarro-Gonzalez J A, Garcia-
Benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement
of nitrate in biological fluids // Clin Chemistry -1998 -N
44 - P 679 - 681]. Ферментативні методи -
дорогі, а використання підразину - дуже
трудомістка процедура та при підвищенні його дозі
зменшується процент перебігу NO₂ до NO₃, тобто
низьке відображення. А гранули кадмію
потребують спеціальної обробки та після аналізу
повинні бути регенеровані.

Метою винаходу є створення способу
визначення вмісту NO (NO₂/NO₃) як в гомогенаті
тканини, так і в біологічних рідинах із
використанням цинкового пилу в якості відновника.

Суть запропонованого способу полягає в тому,
що для визначення нітритів і нітратів в тканині та

(19) UA (11) 53153 (13) A

біологічній рідині береться їх діалізат, в якому проводиться діазотування за допомогою реактива Грися для нітратів та одночасне відновлення нітратів цинковим пилом і діазотування.

Апробація способу була проведена на білих щурах 16-ти тижневого віку. Після декаптації тварин виймалися нирки, з яких готувався гомогенат. Далі проводився діаліз, по закінченні якого відбиралися проби діалізату для проведення аналізу на нітрити (10мл) та нітрати (5мл). Але наперед у пробах було проведено випадіння білків 5 % розчином КОН та 5% розчином сульфату цинка в об'ємному співвідношенні 2 : 5.

У проби на нітрити (10мл) додавали 1мл реактиву Грися, пробі рки інтенсивно коливали при $t = 4^{\circ}\text{C}$. Через 15 хвилин в пробах розвивалося рожеве забарвлення. Вимірювання оптичної щільності проводилося на СФ - 46 при $\lambda = 540\text{nm}$.

У пробі на нітрати (5мл) додавали 0,3г реактиву "сухий відновник" (сульфат барію - 100г, сульфат марганцю - 10г, цинковий пил - 2г,

лимонна кислота - 75г, сульфанилова кислота - 4г, альфа-нафтиламін -2г) та 5мл оцтової кислоти. Реакцію проводили в аналогічних умовах протягом 10 хвилин. Потім проби центрифугували, відбирали супернатант, який фотометрирували проти "холостої" пробі.

Концентрації нітрит - та нітрат іонів розраховували за формулою

$$(\text{NO}_3) = (\text{NO}_2) = \frac{B * X_1}{A * X_2}$$

B - вміст нітрит іонів (нітрат іонів), розрахований по калібрувальним кривим, мкг,

A - маса зразку, г,

X_1 - загальний об'єм фільтрату, мл,

X_2 - об'єм фільтрату, взятий для аналізу, мл (10 або 5мл відповідно).

Вміст NO в нирковій тканині визначався як сума $(\text{NO}_2 + \text{NO}_3)$ мкг/г.

Аналогічно проводиться аналіз для біологічної рідини.