



УКРАЇНА

(19) UA (11) 58110 (13) A
(51) 7 A61K35/16МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ КАРБОНІЛЬНИХ СПОЛУК В БІЛКАХ СИРОВАТКИ КРОВІ

1

2

(21) 2002107890

(22) 04 10 2002

(24) 15 07 2003

(46) 15 07 2003, Бюл. №7, 2003 р.

(72) Шевчук Сергій Вікторович, Пентюк Олександр
Олексійович, Мусін Рафаель Альбертович, Заїчко
Наталія Валентинівна(73) УКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-
ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ РЕАБІЛІТАЦІЇ ІНВАЛІДІВ(57) Спосіб визначення карбонільних сполук у
білках сироватки крові, що включає додавання до
проби білка розчину 2,4-динітро-фенілгідрозину на
розчині соляної кислоти і трихлороцтової кислоти,
центрифугування, промивання трихлороцтовою
кислотою, фотометрію, який відрізняється тим,
що визначення гідрозинів карбонільних сполук
проводять по аці-формі в лужному середовищі 5%
NaOH

Запропонований спосіб відноситься до медицини, зокрема лабораторної техніки. Способи визначення карбонільних сполук у білках сироватки крові відомі (див. Refsgaard H H F, Tsai L, Stadtman E R \ Modification of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products Biochemistry - 2000 - V 97, N 2, P 611-616). Згідно цього способу до проби білка додають 10mM розчину 2,4-динітрофенілгідрозину на 2N розчині соляної кислоти, суміш витримують протягом 10 хвилин при кімнатній температурі, потім додають трихлороцтову кислоту, центрифугують, промивають осад трихлороцтовою кислотою і суспендують його в суміші етанол-етилацетат (1:1 об.). Забарвлені жовті гідрозини $[E=22000 \text{ л/(М см)}]$ карбонільних сполук білків фотометрують при довжині хвилі 370nm, відносно контролю на реактиви, де пробу білка обробляють таким же чином, але не додають розчин 2,4-динітрофенілгідрозину. Недоліком способу являється опалесценція внаслідок денатурації білка, яка дає завищені результати його вмісту і недостатня чутливість методу.

В основу винаходу способу визначення карбонільних сполук поставлена задача розробки

такого способу, який підвищує точність визначення і збільшує його чутливість.

Така задача забезпечується тим, що визначення гідрозинів карбонільних сполук проводять по аці-формі в лужному середовищі 5% NaOH. Як показали наші дослідження, застосування способу, що попереджує опалесценцію, сприяє підвищенню точності визначення карбонільних сполук і збільшенню чутливості.

До 0,1мл проби сироватки крові поступово додають 0,5мл 0,5 N розчину HCl, 0,2мл 0,2% розчину 2,4-динітрофенілгідрозину на 0,8 N HCl. Суміш інкубують 10 хвилин при 20° і осаджують білки 0,3мл 10% CCl_3COOH . Потім проводять центрифугування на протязі 10 хвилин при 3000 обертів за хвилину. Отриманий осад білків промивають 1,0мл 5% CCl_3COOH , вдруге центрифугують 10 хвилин при 3000об/хв і знову промивають його 1,0мл 5% CCl_3COOH . Після відокремлення осаду білків додають 1мл 0,9% розчину NaCl та 1мл 5% розчину NaOH і через 20 хвилин фотометрують при 490nm у кюветі 0,5см.

Порівняльні дані, отримані по способу-прототипу і запропонованому способу, представлені в табл 1.

(19) UA (11) 58110 (13) A

Таблиця 1

Вміст карбонільних сполук в білках сироватки крові

N проби	Оптична густина		C, мкг пірувата/мг білка	
	$\Delta D1$	$\Delta D2$	C1	C2
279	0,025	0,043	0,62	0,221
310	0,092	0,033	2,30	0,169
311	0,163	0,056	3,57	0,250
381	0,158	0,048	3,93	0,237
373	0,164	0,049	4,04	0,247
487	0,124	0,047	2,82	0,219
504	0,122	0,043	3,10	0,223
БСА Олайн	*0,055		*18,8	
БСА Ставрополь	*0,035		*8,9	
БСА Lachema	*0,041		*7,4	
желатина	*0,054		*21,3	
казеїн	*0,079		*51,5	

Примітка

 $\Delta D1$ -оптична густина по американському методу, $\Delta D2$ -оптична густина по запропонованому методу,

C1-концентрація карбонільних груп по американському методу,

C2-концентрація карбонільних груп по запропонованому методу,

*-результати при вмісті білка в пробі 300-1100мкг

Як видно з таблиці, відомий спосіб з сумішшю етанол-етилацетат давав опалесцюючі розчини, в результаті чого вміст карбонільних груп у білках був завищеним, тоді як при використанні запропонованого способу з переведенням пдразонів в аці-форму в лужному середовищі отримували

повністю прозорі взірці, а загальний вміст карбонільних груп був нижчим

Таким чином запропонований спосіб визначення карбонільних сполук у білках має переваги перед відомим за рахунок вищої точності і більшої чутливості