



УКРАЇНА

(19) UA (11) 52136 (13) U  
(51) МПК (2009)  
G01N 33/68

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ

1

(21) u201003158

(22) 19.03.2010

(24) 10.08.2010

(46) 10.08.2010, Бюл. № 15, 2010 р.

(72) ЗАЙЧКО НАТАЛІЯ ВАЛЕНТИНІВНА, ПЕНТЮК  
НАТАЛІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА, МЕЛЬНИК АНДРІЙ  
ВОЛОДИМИРОВИЧ

(73) НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ РЕАБІЛІ-  
ТАЦІЇ ІНВАЛІДІВ (НАВЧАЛЬНО-НАУКОВО-  
ЛІКУВАЛЬНИЙ КОМПЛЕКС) ВІННИЦЬКОГО НА-  
ЦІОНАЛЬНОГО МЕДИЧНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМ.  
М.І. ПИРОГОВА

(57) Спосіб визначення вмісту гідроген сульфід у  
сироватці крові, що передбачає додавання 0,1 мл

2

проб сироватки крові до 0,5 мл 1 % розчину ацета-  
ту цинку для зв'язування гідроген сульфід у, дода-  
вання 2,5 мл дистильованої води, який **відрізня-**  
**ється** тим, що до утвореної суміші далі додають  
0,5 мл свіжого 50 мМ водного розчину пара-  
фенілендіаміну гідрохлориду, 0,4 мл 30 мМ розчи-  
ну  $\text{FeCl}_3$  в 1,2 М  $\text{HCl}$ , проби інкубують 5 хв. при 18-  
25 °С, білок осаджують 1 мл 20 % трихлороцтової  
кислоти, проби центрифугують, вимірюють оптич-  
ну щільність надосадової рідини при довжині хвилі  
590 нм проти контрольної проби, яка містить  
0,1 мл 7,5 % розчину альбуміну.

Корисна модель належить до медицини, зок-  
рема до біохімії, і може бути використана для ви-  
значення вмісту гідроген сульфід (біологічно-  
активної сполуки, вазодилатора та антиагреган-  
та) в сироватці крові людини та експерименталь-  
них тварин.

Відомий спосіб визначення вмісту гідроген су-  
льфід у плазмі крові тварин спектрофотометрич-  
ним методом за утворенням барвника метилено-  
вого синього передбачає внесення 0,1 мл  
сироватки крові пробірку з 0,5 мл 1 % розчину аце-  
тату цинку та 2,5 мл дистильованої води, дода-  
вання 0,5 мл 20 мМ розчину N,N-диметил-пара-  
фенілендіаміну в 7,2 М  $\text{HCl}$ , 0,4 мл 30 мМ розчину  
 $\text{FeCl}_3$  в 1,2 М  $\text{HCl}$ , інкубацією 20 хв. при 18-25 °С,  
осадження білка 1 мл 10 % трихлороцтової кисло-  
ти (ТХО), центрифугування, вимірювання оптичної  
щільності надосадової рідини при довжині хвилі  
670 нм [див. Dombkowski R. Hydrogen sulfide as an  
endogenous regulator of vascular smooth muscle  
tone in trout / R. Dombkowski, M. Russell, K. Olson  
// Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. - 2004.  
- Vol. 286. - P. 678-685].

Недоліком відомого способу є недостатня  
аналітична чутливість та відтворюваність методу  
при визначенні вмісту гідроген сульфід у сирова-  
тці крові людини. Іншим недоліком відомого спо-  
собу є те, що частина утворених забарвлених  
продуктів зв'язується білками плазми крові і після  
центрифугування переходить в осад, що зумовлює  
втрати гідроген сульфід при визначенні. В той же

час дослідження механізмів формування патологі-  
чних станів, які можуть супроводжуватись пору-  
шеннями продукції гідроген сульфід (в тому числі  
і захворювання серцево-судинної системи), та  
розробка підходів до їх фармакологічної корекції  
потребують точної оцінки вмісту гідроген сульфід у  
сироватці крові людини чи експериментальних  
тварин.

В основу корисної моделі «Спосіб визначення  
вмісту гідроген сульфід у сироватці крові» поста-  
влене завдання розробити чутливий та відтворю-  
ваний спосіб визначення вмісту гідроген сульфід у  
сироватці крові людини та експериментальних  
тварин.

Це завдання забезпечується тим, що вміст гід-  
роген сульфід у сироватці крові визначають спек-  
трофотометричним методом за утворенням тіоні-  
нового барвника в реакції з пара-фенілендіаміном  
в присутності іонів заліза (III), а для врахування  
втрат забарвлених продуктів з білками сироватки  
крові в контрольну пробу вносять аналогічну кіль-  
кість білка у вигляді водного розчину бічачого  
сироваткового альбуміну (Sigma, США).

Застосування способу. Для визначення вмісту  
гідроген сульфід у сироватці крові в пробірку з 0,5  
мл 1 % водного розчину ацетату цинку (для зв'язу-  
вання гідроген сульфід) додають 0,1 мл сирова-  
тки крові (на цьому етапі проби можна зберігати не  
менше 3-х годин), потім вносять 2,5 мл дистильо-  
ваної води. Проби ретельно перемішують і дода-  
ють 0,5 мл 50 мМ свіжого водного розчину пара-

(13) U

(11) 52136

(19) UA

фенілендіаміну гідрохлориду, 0,4 мл 30 мМ розчину  $\text{FeCl}_3$  в 1,2 М  $\text{HCl}$ . Проводять інкубацію 5 хв. при 18-25 °С, осаджують білки 1 мл 20 % ТХО, центрифугують 10 хв. при 3000 об/хв. Оптичну щільність надосадової рідини вимірюють при 590 нм проти контрольної проби, в яку замість сироватки крові додають 0,1 мл 7,5 % розчину альбуміну. Як стандарт використовують водні розчини  $\text{Na}_2\text{S}$  х  $9\text{H}_2\text{O}$ .

Конкретний приклад застосування способу. В пробірки з 0,5 мл 1 % свіжого розчину ацетату цинку додають по 0,1 мл проб сироватки крові людини чи експериментальних тварин, 2,5 мл дистильованої води (всі проби дублюють). Проби ретельно перемішують і додають 0,5 мл 50 мМ свіжого водного розчину пара-фенілендіаміну гідрохлориду, 0,4 мл 30 мМ розчину  $\text{FeCl}_3$  в 1,2 М  $\text{HCl}$ . Проводять інкубацію 5 хв. при 18-25 °С, додають 1 мл 20 % ТХО, центрифугують 10 хв. при

3000 об/хв. Оптичну щільність надосадової рідини вимірюють при 590 нм в кюветі на 1,0 см проти контрольної проби, в якій замість сироватки крові використовують 0,1 мл 7,5 % розчину альбуміну.

Вміст гідроген сульфід у розраховували за формулою:  $C_d = (E_d/E_{ct}) \times C_{ct}$  мкмоль/л, де  $C_d$  - концентрація гідроген сульфід у сироватці крові,  $E_d$  - оптична щільність дослідної проби,  $E_{ct}$  - оптична щільність стандартної проби,  $C_{ct}$  - концентрація гідроген сульфід у стандартній пробі. Стандартом слугували водні розчини  $\text{Na}_2\text{S}$  х  $9\text{H}_2\text{O}$  з концентрацією 31,2-3120 мкмоль/л.

Результати наведені в таблицях 1, 2.

Таким чином, запропонований спосіб визначення вмісту гідроген сульфід у сироватці крові людини за утворенням тіонінового барвника має вищу аналітичну чутливість та кращу відтворюваність, ніж його відомий прототип, а також дозволяє скоротити час проведення аналізу.

Таблиця 1

Показники оптичної щільності проб з різним вмістом гідроген сульфід, визначеними за реакціями з НК-диметил-пара-фенілендіаміном (прототип) та пара-фенілендіаміном

Вміст гідроген сульфід у стандартному розчині, мкмоль/л	Оптична щільність, $\Delta E$ (% - коефіцієнт варіації)	
	Реакція з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном	Реакція з пара-фенілендіаміном
15,6	0,003±0,0008 (23,8 %)	0,007±0,0010 (13,7 %)
31,2	0,006±0,0008 (12,2 %)	0,013±0,0008 (6,12 %)
62,4	0,013±0,0010 (8,39 %)	0,024±0,0015 (6,09 %)
156,0	0,035±0,0029 (8,35 %)	0,056±0,0031 (5,46 %)
312,0	0,072±0,0042 (5,80 %)	0,110±0,0055 (4,98 %)
624,0	0,131±0,0132 (10,1 %)	0,215±0,0125 (5,81 %)
1248,0	0,212±0,0271 (12,8 %)	0,400±0,0257 (6,42 %)

Примітки: 1.  $\Delta E$  - різниця між оптичною щільністю дослідної та контрольної проб; 2. результати вимірювань представлені як середні величини з 4 паралельних проб ( $M \pm \sigma$ )

Таблиця 2

Конкретні приклади застосування способу визначення вмісту гідроген сульфід у сироватках крові людини та тварин у порівнянні з прототипом

№	Проби сироватки крові (та стандарту)	Реакція з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном		Реакція з пара-фенілендіаміном	
		$\Delta E_1$	мкмоль/л	$\Delta E_2$	мкмоль/л
1	Стандарт	0,068	312	0,127	312
2	Донор 1	0,002	0	0,030	73,7
3	Донор 2	0,006	0	0,028	68,8
4	Донор 3	0,005	0	0,034	83,5
5	Донор 4	0,010	45,8	0,041	100,7
6	Щурі	0,012	55,0	0,056	137,6
7	Щур 2	0,015	68,8	0,062	152,3
8	Щур 3	0,012	55,0	0,048	117,9
9	Кролик 1	0,011	50,5	0,032	78,6
10	Кролик 2	0,009	41,2	0,034	83,5
11	Кролик 3	0,012	55,0	0,038	93,3

Примітка.  $\Delta E$  - різниця між оптичною щільністю дослідної та контрольної проб.

