



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **76576** (13) **C2**
(51) **МПК (2006)**
G01N 21/77
G01N 21/78 (2006.01)
G01N 21/80 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ НІТРИТ-ІОНІВ У РОЗЧИНАХ

1

(21) 20040706241
(22) 27.07.2004
(24) 15.08.2006
(46) 15.08.2006, Бюл. № 8, 2006 р.
(72) Левицький Роман Мирославович, Гривул Теодор Миколайович, Стойка Ростислав Степанович
(73) ЛЬВІВСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ ІМЕНІ С. З. ГЖИЦЬКОГО
(56) SU 1793338, 27.12.1989
RU 2105296, 24.07.1996
US 4003706, 18.10.1977
RU 2009486, 29.01.1992
(57) 1.Спосіб визначення концентрації нітрит-іонів у розчинах, що включає використання двостадійної реакції Гріса із сульфаніловою кислотою та N-

2

1-нафтилетилендіамін дигідрохлоридом, фотометрування при довжині хвилі 540 ± 20 нм та розрахунок концентрації за калібрувальним графіком, який **відрізняється** тим, що в реакції використовують двокомпонентну буферну суміш з різною концентрацією компонентів на кожній стадії реакції, яку здійснюють за постійної температури, що дорівнює 25°C та розсіяним освітленням.
2. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що у реакційну суміш сульфанілову кислоту вносять у буферній суміші, забезпечуючи $\text{pH}=1,2$ для першої стадії реакції, а N-1-нафтилетилендіамін дигідрохлорид вносять у розчині одного з компонентів буферної суміші, забезпечуючи $\text{pH}=2,7$ для другої стадії реакції.

Винахід належить до аналітичної хімії, зокрема, до кількісного аналізу, а саме: до способів визначення концентрації нітрит-іонів у розчинах. Винахід може бути застосований у науково-дослідних установах, санітарних лабораторіях ветеринарної та гуманітарної медицини, а також в екологічних та агрохімічних лабораторіях з різними формами власності для вивчення метаболізму нітрат- і нітрит-іонів у розчинах та біологічних рідиницях і для встановлення ступеня забруднення цими іонами середовищ довкілля, кормів та продуктів харчування.

Відомий спосіб визначення концентрації нітрит-іонів у розчинах, який включає використання різних модифікацій реакції Гріса. У найчутливіших модифікаціях використовують диференційне pH для кожної зі стадій.

[Расследование, диагностика и лечение пищевых отравлений нитратами и нитритами [Методические указания. Министерство здравоохранения СССР]. - М., 1987. 19с

Скородинський З.П., Олійник З.Г., Гуфрій Д.Ф. та ін. Кількісне визначення нітратів і нітритів у біологічному матеріалі. /Вісник

сільськогосподарської науки, - 1987, №7. - С. 35-36.

Визначення нітритів у кормах. В кн.: Токсикологічний контроль кормів та кормових добавок (Методичні рекомендації). - К.: 1999. - С.42-46].

Найбільш близьким по суті до способу, що заявляється, є спосіб, що використовується у наборі детектування нітрит-іонів фірми "Promega" [Griess Reagent System/Technical bulletin № 229. Promega Corp., Madison, WI, USA].

Відомий спосіб включає поетапне додавання сульфанілової кислоти та N-(1-нафтил)етилендіамін дигідрохлориду. Спочатку до зразка додають розчин сульфанілової кислоти у фосфорній кислоті. Після цього планшет ставлять у темне місце на 5-10 хвилин. Потім додають водний розчин та N-(1-нафтил)етилендіамін дигідрохлориду, планшет знову ставлять у темне місце на 5-10 хвилин. Після цього зразки фотометрують при 540 ± 20 нм. Всі операції проводять при кімнатній температурі.

Недоліками даного способу є те, що при додаванні сульфанілової кислоти у фосфорній кислоті та N-(1-нафтил)етилендіамін дигідрохлориду у

(13) **C2**

(11) **76576**

(19) **UA**

водному розчині до досліджуваних розчинів з різним рН, обидва етапи реакції будуть проходити при різних, але не стабільних рН, що впливатиме на:

- 1) швидкість окремих етапів реакції;
- 2) інтенсивність забарвлення кольорового продукту;

тобто відбуватиметься зміщення піку поглинання, що знижуватиме чутливість реакції Гріса, а в кінцевому підсумку - точність вимірювання.

Крім того, відомий спосіб не запобігає дії прямого світла на зразки під час додавання реагентів. Оскільки час, що затрачається на додавання реагентів у стандартний 96-луночний планшет, становить 15-30 хвилин, то дії прямого світла цілком достатньо, щоб результати, одержані з перших та останніх лунок, суттєво відрізнялися. При цьому зразки, що довше піддавалися дії світла будуть мати знижені показники нітритів, а ті, до яких реагенти додавалися в останню чергу, будуть мати завищені дані в порівнянні із середніми результатами.

Запропонований нами спосіб усуває недоліки прототипу і забезпечує високу чутливість та стабільність методу за рахунок використання буферної системи для створення диференційних дискретних рН і стабілізації зовнішніх фізичних факторів (освітлення та температура).

В основу винаходу покладено завдання розробити ефективний спосіб визначення нітрит-іонів у розчинах, який забезпечив би зменшення похибки вимірювання концентрації нітрит-іонів у зразках та був би зручним у застосуванні, забезпечуючи більш точні результати.

Технічний результат досягається шляхом використання двокомпонентної буферної суміші з різною концентрацією компонентів на кожній стадії реакції, яку здійснюють за постійної температури (25°C) та розсіяного освітлення. При цьому у реакційну суміш вносять сульфанілову кислоту у гліцин-HCl буферній системі з рН=1,2 на першій стадії реакції, а на другій - N-(1-нафтил) етилендіамін дигідрохлорид у розчині гліцину, доводячи рН реакційної суміші до 2,7. Внесення сульфанілової кислоти у буферній системі, а N-(1-нафтил) етилендіамін дигідрохлориду у розчині одного із компонентів даної системи дозволяє проводити обидві стадії реакції Гріса при відмінних, але стабільних і оптимальних для кожної зі стадій рН.

При проведенні патентно-інформаційного пошуку авторами і заявником знайдено технічне рішення, яке містить найбільшу кількість суттєвих ознак, спільних із заявленим способом /Інструкція до набору для виявлення нітритів фірми "Promega" [Griess Reagent System/Technical bulletin № 229. Promega Corp., Madison, WI, USA]: використання двостадійної реакції Гріса із сульфаніловою кислотою та N-(1-нафтил) етилендіамін дигідрохлоридом, фотометрування при 540±20 нм та розрахунок концентрації за калібрувальним графіком.

Однак, наявність зазначених спільних з прототипом ознак, недостатня для одержання технічного результату, який забезпечує заявлений спосіб. Технічних рішень, які б за сукупністю ознак повністю співпадали із заявленим способом, не виявлено. Це дозволяє зробити висновок про

відповідність заявленого технічного рішення критерію винаходу "новизна".

В патентній і науково-технічній літературі не знайдено технічних рішень, в яких були б описані відомості про ознаки, що відрізняють заявлений спосіб від прототипу і забезпечують досягнення технічного результату - в реакції використовують двокомпонентну буферну суміш з різною концентрацією компонентів на кожній стадії реакції, яку здійснюють за постійної температури (25°C) та розсіяного освітлення, при цьому в реакційну суміш сульфанілову кислоту вносять у буферній суміші, забезпечуючи рН=1,2 для першої стадії реакції, а N-(1-нафтил) етилендіамін дигідрохлорид - в розчині одного з компонентів буферної суміші, забезпечуючи рН=2,7 для другої стадії реакції.

Отже, заявлене технічне рішення не витікає явним чином з рівня техніки, що дозволяє зробити висновок про його відповідність критерію винаходу "винахідницький рівень".

Винахід може бути застосований у науково-дослідних установах, санітарних лабораторіях ветеринарної та гуманітарної медицини, а також в екологічних та агрохімічних лабораторіях з різними формами власності для вивчення метаболізму нітрат- і нітрит-іонів у розчинах та біологічних рідинах і для встановлення ступеня забруднення цими іонами середовищ довкілля, кормів та продуктів харчування, а тому він відповідає критерію винаходу "промислова придатність".

Таким чином, заявлене технічне рішення є новим, промислово придатним, має достатній технічний рівень, тобто відповідає всім вимогам патентоспроможності винаходу згідно ст.7 розділу II Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі" № 1771-III, 2000 р.

Заявлений спосіб здійснюють наступним чином:

1. Приготування гліцин-HCl буферу з рН 1,2 з використанням 0,2 М гліцину та 6,3 М HCl;
2. Приготування 1,0% розчину сульфанілової кислоти в гліцин-HCl буфері (рН 1,2)
3. Приготування 0,1% NED в 0,19 М розчині гліцину.
4. Внесення досліджуваного розчину в реакційні посудини, що розміщені в захищеному від прямого світла місці з постійною температурою (25°C).
5. Проведення діазотизації - першої стадії реакції Гріса (оптимум рН 1,0-1,5) шляхом додавання 1% сульфанілової кислоти в гліцин-HCl буфері з рН 1,2 з 10 хвилинною експозицією.
6. Проведення „coupling” - другої стадії реакції Гріса (оптимум рН 2,0-2,7) шляхом додавання 0,1% NED в 0,19 М розчині гліцину з 10 хвилинною експозицією (забарвлення стійке впродовж 90 хвилин).
7. Вимірювання поглинання при 540 нм ± 20 нм.
8. Розрахунок концентрації нітриту за калібрувальним графіком.

Лінійна залежність екстинції від концентрації нітрит-іонів спостерігається в межах від 5,0-100,0 мкмоль/л фотометрованого розчину.

Приклад конкретного виконання

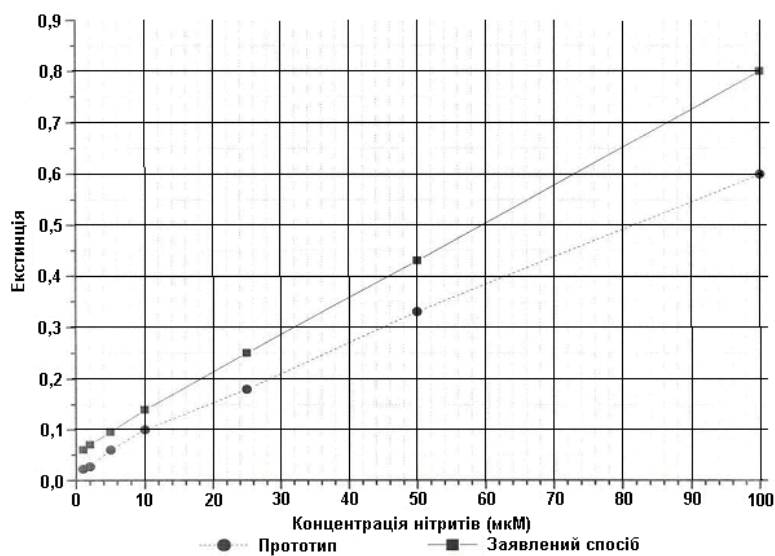
Ефективність заявленого способу, його переваги перед прототипом, підтверджені прикладами

конкретного виконання способу. В умовах лабораторії Львівської національної академії ветеринарної медицини імені С.З. Гжицького проведено дослідження стандартних розчинів нітритів (1, 2, 5, 10, 25, 50 та 100 мкМ) заявленим способом.

Результати вимірювання екстинції забарвленого розчину з використанням водних розчинів нітриту (1, 2, 5, 10, 25, 50 та 100 мкМ) одержані з використанням прототипу та одержані за заявленим способом представлені на фіг. 1.

Аналіз наведених кривих свідчить про те, що запропонований спосіб є чутливішим за прототип, а екстинція при цьому зростає прямо пропорційно до концентрації нітритів з більшою лінійністю, ніж у відомому способі.

Отже, заявлений спосіб дозволяє отримувати дані з точністю до 0,2 мкМ при мінімальній концентрації нітритів 0,5 мкМ, що дозволяє застосовувати даний метод і для визначення метаболізму нітритів у біологічних об'єктах.



Фіг.1.

Величина екстинції забарвлених розчинів залежно від концентрації нітритів.