



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 112608

(13) U

(51) МПК

G01N 33/02 (2006.01)

G01N 33/12 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 06092	(72) Винахідник(и): Шостя Анатолій Михайлович (UA), Канюка Олена Юріївна (UA), Зінов'єв Сергій Георгійович (UA), Цибенко Володимир Григорович (UA)
(22) Дата подання заявки: 06.06.2016	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 26.12.2016	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.12.2016, Бюл.№ 24	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ СВИНАРСТВА І АГРОПРОМИСЛОВОГО ВИРОБНИЦТВА НААН, вул. Шведська могила, 1, м. Полтава, 36013 (UA)

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ГІСТИДИНВІСНИХ ДИПЕПТИДІВ У М'ЯСІ ТА М'ЯСНИХ ПРОДУКТАХ

(57) Реферат:

Спосіб визначення вмісту гістидинвісних дипептидів (ГВД) у м'ясі та м'ясних продуктах. Після процедури екстракції ГВД розчином хлорної кислоти проби не піддають процедурі випарювання. Після додавання розчину натрію карбонату суміш не витримують протягом 10 хв., а дуже швидко переносять в кювету та проводять вимірювання екстинкції до максимального її значення, що значно скорочує час проведення дослідження.

UA 112608 U

Корисна модель належить до галузі лабораторної практики, а саме до визначення якості продукції тваринництва, і може бути застосована для покращення біологічної та екологічної безпеки.

Серед азотвмісних компонентів, що визначаються в м'язових екстрактах, виділяють комплекс гістидинвмісних дипептидів (ГВД). У найбільшій кількості в м'язовій тканині сільськогосподарських тварин зазначені сполуки представлені карнозином (β -аланіл-L-гістидином) і анзерином (P-аланілметілгістидином) [1].

Не останню роль відіграють зазначені дипептиди в живому організмі. Карнозин здатний взаємодіяти з проміжними продуктами перекисного окислення ліпідів, знижуючи утворення перекисів; утворювати з супероксид-аніоном кисню комплекс з переносом заряду, знижуючи його активну концентрацію; ефективно нейтралізувати гідроксид-радикал, що перешкоджає пошкодженню мембранних ліпідів і білків в умовах окисного стресу. Анзерин гальмує накопичення кінцевого продукту перекисного окислення ліпідів - малонового діальдегіду. У середовищі з карнозином і анзерином максимальний рівень накопичення малонового діальдегіду знижується на 10-50 % [2]. Карнозин має значний потенціал як природний антиоксидант [3, 4]. У м'язовій тканині його міститься значно більше, ніж вітамінів С і Е [2].

Гістидинвмісні дипептиди знайдені виключно в тканинах тварин. Встановлено тканинну специфічність у розміщенні і накопиченні зазначених дипептидів. ГВД належать до класу біомаркерів, що використовуються для ідентифікації різних видів м'яса. Наприклад, наявність карнозину і анзериносу досить специфічна в м'язах вівці, великої рогатої худоби, коней, кенгуру, курки, качки та індички. Вдалося встановити фальсифікат сирової свинини під телятину, базуючись на даних про вміст гістидинвмісних дипептидів у цих видах м'яса [5]. Також визнається вміст карнозину в продуктах харчування на предмет їх тваринного походження [6].

Гістидинвмісні дипептиди проявляють стимулюючу дію на травні залози, а також приймають участь у формуванні специфічного смаку і аромату м'яса [1, 7]. Відзначається їх високе збереження в процесі технологічної переробки м'ясної продукції. Вміст ГВД рекомендують використовувати для оцінки якості м'ясних виробів і визначення частки м'яса в ковбасному фарші [8].

В основу корисної моделі поставлена задача розробити методику визначення гістидинвмісних дипептидів у невеликій кількості біоматеріалу та створити алгоритм розрахунку вмісту ГВД в пробі.

Поставлена задача вирішується тим, що дає змогу об'єктивно визначати вміст гістидинвмісних дипептидів в невеликій кількості біоматеріалу, що аналізуються.

Аналогами запропонованого нами способу є хроматографічні методи визначення дипептидів шляхом на папері та у тонкому шарі.

Прототипом нашого способу є метод визначення карнозину в безбілковому екстракті по діазореакції [9].

Суть корисної моделі пояснює креслення.

На кресленні - інформаційна матриця побудови робочого графіку та розрахунку вмісту ГВД у пробі.

У запропонованому нами способі для екстракції гістидинвмісних дипептидів використовують водний розчин хлорної кислоти який потім осаджується у вигляді нерозчинної солі, з подальшим центрифугуванням, в отриманому супернатанті за допомогою кольорової реакції з діазореактивом утворюється забарвлена сполука, кількість якої прямо пропорційна вмісту ГВД у досліджуваному розчині. Розрахунки вмісту ГВД у дослідженій пробі проводять з використанням вбудованої в EXEL функції "ПРЕДСКАЗ".

Прилади і реактиви, що використовуються у запропонованому способі: ваги 4 класу точності, центрифуга на 5000 обертів, рН-метр, фотоелектроколориметр КФК-ЗМП, кювети з довжиною оптичного шляху 10 мм, гомогенізатор лабораторний (або порцелянова ступка з товчачиком), колба мірна на 100 см³, мірна пробірка на 10 см³, центрифужні пробірки, великі цукрові пробірки, лід, кислота сульфанілова хімічно чиста (C₆H₇NO₃S), кислота хлороводнева концентрована хімічно чиста (HCl), кислота хлорна (HClO₄) молярною концентрацією 0,5 моль/дм³ (ХЧ), свіжоприготовлений розчин натрію нітриту (NaNO₂) з масовою часткою 5 %, розчин калію гідроокису (KOH) з масовою часткою 33 %, розчин натрію карбонату (Na₂CO₃) з масовою часткою 10 %, дистильована вода. Дозволяється використовувати інші засоби вимірювальної техніки, допоміжне обладнання, реактиви та матеріали, які за характеристиками і якістю не гірше зазначених.

Приготування реактивів.

Розчин сульфаної кислоти - 0,9 г сульфанілової кислоти розчиняють в 9 см³ концентрованої HCl і доводять об'єм дистильованою водою до 100 см. Отриманий розчин

необхідно тримати на холоді. Розчин діазотованої сульфанілової кислоти - у мірну колбу об'ємом 100 см³, яка поставлена в льодяну баню, наливають 6 см³ розчину сульфанілової кислоти, доливають 6 см³ свіжоприготованого розчину NaNO₂, ретельно перемішують і залишають на 5 хв.; після чого доливають ще 24 см³ розчину NaN₃ масовою часткою 5 % і через 5 хв. доводять об'єм водою до 100 см³. Щоразу готують свіжий розчин. Термін зберігання на льоду 5-6 годин. Реактив вважається правильно приготованим за відсутності утворення бурого газу при додаванні до сульфанілової кислоти натрію нітриту.

Виконання цього способу проводять таким чином.

Зразок м'яса або м'ясопродукту звільнити від жиру, сполучної тканини і подрібнити, після чого відібрати наважку масою 1 г. Отриману наважку ретельно гомогенізувати з 5 см³ HClO₄ (допускається ретельне розтирання зразка у порцеляновій ступці з 5 см³ HClO₄).

Отриманий гомогенат перенести в центрифужну пробірку і центрифугувати 20 хвилин при 5000 об./хв. Надосадову рідину злити в центрифужну пробірку.

До осаду додати і ретельно перемішати ще 1 см³ HClO₄. Центрифугувати 10 хвилин 5000 об./хв. Надосадову рідину долити до першої частини.

До отриманої надосадової рідини додати по краплях КОН, довести рН до 7,0-8,0 (але не нижче 7,0), при цьому випаде білий осад нерозчинного калію перхлорату (KClO₄).

Отриману суміш перенести знову в центрифужні пробірки і центрифугувати 5 хвилин при 3000 об./хв.

Супернатант перелити в великі (цукрові) пробірки. Довести обсяг до 10 см³ дистильованою водою.

Додатково приготувати 1 пробірку з холостий пробою - 10 см³ дистильованої води.

Додати в кожен пробірку по 3 см³ діазореактиву і залишити на 5 хвилин.

Потім додати 3 см³ Na₂CO₃ і дуже швидко поставити кювету в ФЕК і спостерігати за екстинкцією до максимального значення. Вимірювання проводити при довжині хвилі 490 нм проти холостої проби.

Розрахунок вмісту гістидинвмісних дипептидів проводять за попередньо побудованим графіком по гістидину. Для цього необхідно розчинити у воді 0,0027 г гістидину і довести до об'єму 200 см³. Потім в 10 пробірок необхідно додати речовини в кількостях, зазначених в таблиці 1.

Таблиця 1

Склад робочих розчинів гістидину

Об'єм розчину гістидину, см ³	Об'єм води, см ³	Вміст гістидину, мкг	Вміст гістидину, мкмоль
0,5	9,5	5	0,032
1,0	9,0	10	0,064
1,5	8,5	15	0,097
2,0	8,0	20	0,129
2,5	7,5	25	0,161
3,0	7,0	30	0,193
3,5	6,5	35	0,225
4,0	6,0	40	0,258
4,5	5,5	45	0,290
5,0	5,0	50	0,322

Потім проводять фарбування розчину за описаною вище методикою. За отриманими результатами екстинкції будують графік. Орієнтовно робочий графік може виглядати наступним чином (креслення).

Розрахунки проводять з використанням вбудованої в EXCEL функції "ПРЕДСКАЗ". Вона обчислює або пророкує майбутнє значення за існуючими значеннями.

Отримане значення - це значення Y, відповідне заданому значенню X. Значення X і Y - відомі. Нове значення обчислюється з використанням лінійної регресії. Показник R² побудованого калібрувального графіка повинен бути більшим або дорівнювати 0,95. У нашому випадку, не зважаючи на те, що одна з "точок" випала, він дорівнює 0,9792.

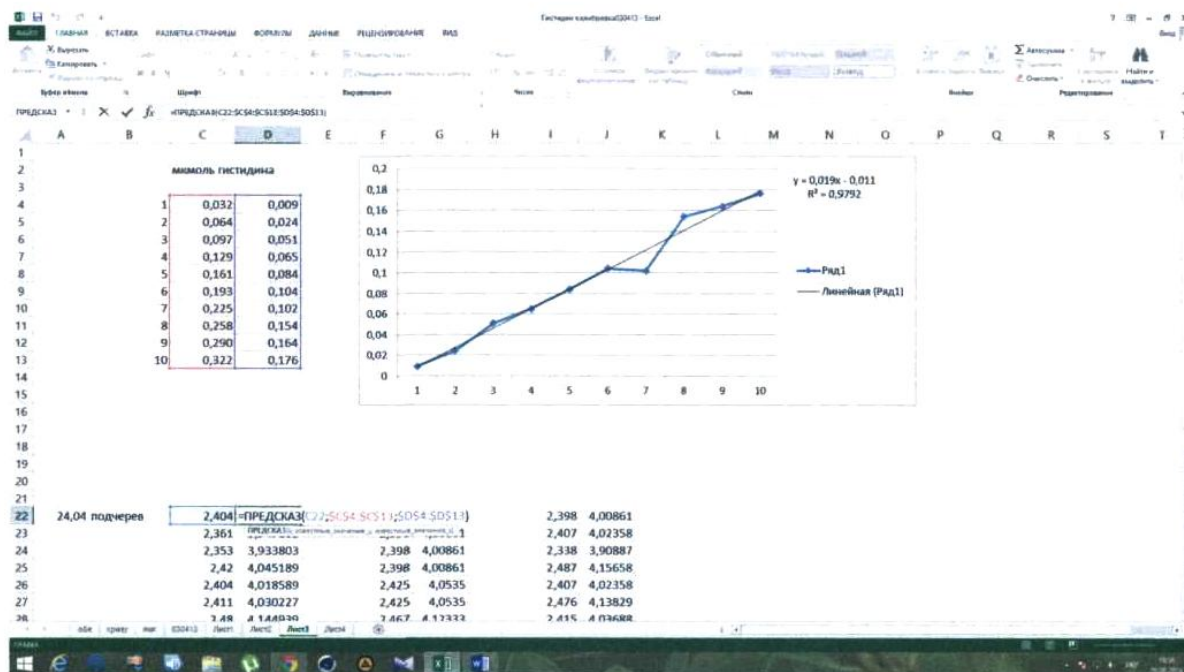
Приклад використання описаної функції для розрахунку вмісту ГСД в підчеревному м'язі свиней показаний на кресленні. Так, отримана екстинкція досліджуваного зразка 2,353, згідно з розрахунками, це 3,93 мкмоль гістидинвмісних дипептидів.

Джерела інформації:

1. Лисицын А. Теория и практика переработки мяса /А.Лисицын. - М: ВНИИМП, 2006. -391 с.
2. Болдырев А. Гистидин-содержащие дипептиды возбудимых тканей /А. Болдырев. -М.: Биоинформсервис, 2004. - С. 26-41.
3. Бабижаев М.А. На-ацетилкарнозин - природный гистидин, содержащий дипептид как антиоксидант для офтальмологического применения [Электронный ресурс] /М.А. Бабижаев, В.К. Ермакова, Ю.А. Семилетов, А.М. Деев - Режим доступа: www.ethosrussia.ru/pdf/articleIO.pdf (03.03.2013).
4. Беляев М.С. Карнозин как фактор эндоэкологической защиты организма от повреждений, вызванных окислительным стрессом: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16, 03.00.04 /Михаил Сергеевич Беляев. - М., 2008. -23 с.
5. Qinchum R. Monoclonal antibody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of mammalian meat in meat and feed products: thesis ... master of science /Qinchum Rao. - Florida, 2004. - 70 p.
6. Аналитическая характеристика карнозина /Д.А. Фадеева [и др.] //Научные ведомости. Серия Медицина. Фармация. - 2010. - № 22 (93). - Выпуск 12. - С. 179-184.
7. Физико-химические и биохимические основы технологии мяса и мясопродуктов. Справочник. -М.: Пищевая промышленность, 1973. - С. 60-99.
8. Храмов В.А. Определение карнозина в мясе и мясных продуктах /В.А. Храмов, Е.Ю. Турина //Мясная индустрия. - 2007. - № 7 (июль). - С. 65-66.
9. Антипова Л.В. Методы исследования мяса и мясных продуктов /Л.В. Антипова, И.А. Глотова, И.А. Рогов. - М.: Колос, 2001. - 376 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 25 Спосіб визначення вмісту гістидинвмісних дипептидів (ГВД) у м'ясі та м'ясних продуктах, який **відрізняється** тим, що після процедури екстракції ГВД розчином хлорної кислоти проби не піддають процедурі випарювання; після додавання розчину натрію карбонату суміш не витримують протягом 10 хв., а дуже швидко переносять в кювету та проводять вимірювання екстинкції до максимального її значення, що значно скорочує час проведення дослідження.



Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601