

Міністерство освіти і науки України

Харківський національний університет
імені В. Н. Каразіна
Хімічний факультет

**IX Всеукраїнська наукова
конференція студентів та аспірантів
"Хімічні Каразінські читання - 2017"
(ХКЧ'17)**

Тези доповідей

18–20 квітня 2017 року

Харків
2017

**НОВИЙ КІНЕТИКО-ФОТОМЕТРИЧНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ
АКТИВНОСТІ ХОЛІНЕСТЕРАЗИ З ВИКОРИСТАННЯМ
N-ФЕНЕТИДИНУ**

Блажесевський М.Є., Ковальська О.В.

Національний фармацевтичний університет, Харків

olenkovalskaya@mail.ru

Відомий в теперішній час прямий метод визначення активності сироваткової холінестерази (ChE) - УФ-метод Kalow - характеризується вузьким концентраційним інтервалом лінійності, що обумовлено заважаючим впливом компонентів плазми чи сироватки, а застосування класичного непрямого гідроксаматного методу Хестрина, в якому визначення активності ХЕ здійснюють за непрореагованою частиною субстрата ензимної реакції - ацетилхоліну (ACh) - в клінічній практиці зараз велими обмежене. Це обумовлено, перш за все, порівняно невисокою точністю методу та складністю виконання аналізу [1-3].

Нами запропоновано здійснювати оцінювання активності холінестераз за залишком ацетилхоліну в ензимній реакції з використанням системи двох спряжених реакцій: пергідролізу ацетилхоліну (реакція з надлишком гідроген пероксиду) та індукованої нею реакції пероксикислотного окиснення індикаторної речовини п-фенетидину (ПФ), утвореною надацетатною кислотою в середовищі фосфатного буферу при pH 8,3. Швидкість індикаторної реакції вимірюють за тангенсом кута нахилу лінійної ділянки кінетичної кривої залежності світлопоглинання від часу (A-t) за довжини хвилі 358 нм (Рис.).

Використовуваний як індикаторна речовина п-фенетидин, – не токсичний та водночас достатньо стійкий у розчинах при зберіганні в присутності кисню повітря та застосуванні; у порівнянні з іншими відомими аналогічними реагентами такими, як бензидин чи о-діанізидин, – дозволяє створити безпечні умови праці та отримувати більш достовірні результати.

Як стандарт використовують очищений препарат ензиму холінестерази сироватки коня К.Ф. 3.1.1.8 (VI клас) з питомою активністю 28 АО/мг (за сертифікатом). Розчин робочого стандартного зразка (РСЗ): точну наважку порошку холінестерази (80 мг) розчиняють у 20,0 мл двічі дистильованої води при помірному нагріванні. Розчин випробуваного зразка: точну наважку порошку холінестерази (80 мг) розчиняють у 20,0 мл двічі дистильованої води при помірному нагріванні. Розчин гідроген пероксиду виготовляють з 50% розчину о.с.ч. шляхом відповідного розбавлення двічі дистильованою водою. Світлопоглинання вимірюють на спектрофотометрі СФ-26 ($\lambda=358$ нм, $l=1$ см).

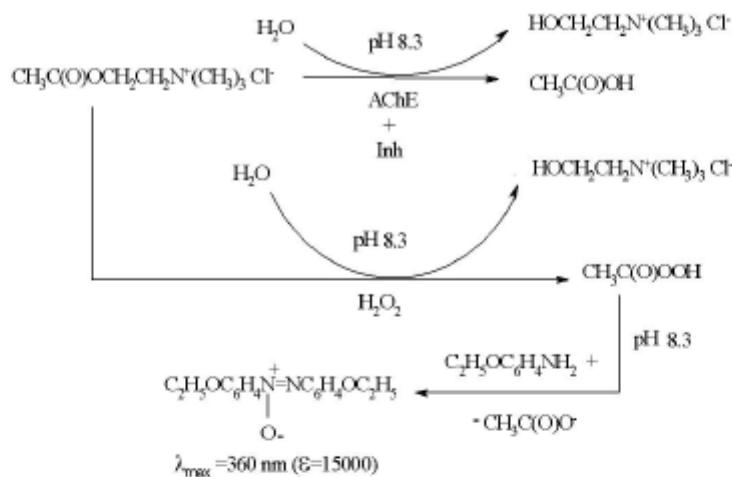


Рис.1. Схема визначення активності холінестераз за реакціями пергідролізу та пероксикислотного окиснення з використанням як індикаторної речовини п-фенетидину

Лінійна залежність умової швидкості реакції (tga) від концентрації ферменту спостерігається в інтервалі концентрацій 0,12–0,36 мг/мл. Питому активність випробуваного зразка ензиму (U) розраховували за формулою: $U = C \times 16,6 \times 20 \times 0,35 = 27,9 \text{ AO}/\text{мг}$; де C – усереднене значення вмісту ензиму у розчині, знайдене за градуювальним графіком, у мг/мл; 16,6 – загальний об'єм розчину, мл; 20 – коефіцієнт розбавлення; 0,35 – перерахунок питомої активності ензиму у міжнародні одиниці. Під час виконання аналізу модельних розчинів відомого складу $RSD < 2,0\%$ ($n=5-7$; $P=0.95$), правильність $0,4\%$.

Отже, запропоновано принципово новий метод визначення активності ензиму холінестерази, котрий дозволяє отримувати достовірні результати та створює безпечні умови праці під час виконання аналізу.

- [1] Старостина В.К. Диагностическое значение и методы анализа / В.К. Старостина, С.А. Дегтева // Поликлиника.– 2010. - №3. – С.26-29.
- [2] Бовтюшко В.Г.Оценка методов медико-биологического контроля активности холинестераз крови / В. Г. Бовтюшко, Б.А. Маркин, В.Э. Фельд // РЖХ. – 1994, Т. 38. - № 2. – С. 96-99.
- [3] Решетникова М.А. Методы определения активности ацетилхолинестераз в сыворотке крови [Электронный ресурс]: материалы VI Международная студенческая электронная научная конференция ["Студенческий научный форум 2014"], (Курськ, 15 февраля – 31 марта 2014г.) /Курский государственный мед. унив. – Курск.

| | | | |
|-------------------|--|----------------------|---------------|
| Дутка В. С. | 193, 196 | Коваленко С. М. | 114 |
| Дяченко А. Г. | 156 | Коваленко С. Н. | 117 |
| Егорова А. В. | 83 | Ковалик А. А. | 63 |
| Едаменко Д. В. | 108 | Коваль Ю. С. | 65 |
| Ельцов С. В. | 143 | Ковалська О. В. | 47 |
| Ершов С. Н. | 155 | Ковалський Я. П. | 31 |
| Ефимов П. В. | 159 | Ковалъчик Г. | 27 |
| Євтухов В. О. | 55 | Коверга В. А. | 152, 194, 199 |
| Єрмоленко Г. Ю. | 154 | Козлов Д. А. | 162 |
| Єфімова Н. В. | 201 | Колесник Я. В. | 152 |
| Желавський О. С. | 103 | Колісник О. В. | 67 |
| Жикол О. А. | 108 | Коломойцев А. О. | 123 |
| Жлуденко М. Г. | 156 | Колосов М. А. | 125 |
| Жук І. С. | 117 | Коновалова О. Ю. | 59 |
| Жук Т. С. | 127 | Кордан В. | 27 |
| Загорулько С. П. | 104 | Кордубайло М. В. | 114 |
| Залізна К. В. | 106 | Корміліцина А. О. | 164 |
| Запорожець О. А. | 57 | Кот А. Г. | 15 |
| Зародюк А. В. | 102 | Котляр В. Н. | 123 |
| Звягин Е. Н. | 93 | Кравець М. І. | 116 |
| Звягін Є. М. | 103 | Кравцева А. В. | 165 |
| Зимогляд А. Г. | 57 | Красноп'йорова А. П. | 201 |
| Зульфігаров А. О. | 20 | Крутіценко А. Г. | 69 |
| Іванов В. В. | 73, 180 | Кузеванова І. С. | 20 |
| Іванченко А. Г. | 108 | Лавров И. В. | 117 |
| Ідрисси А. | 194, 199, 178 | Лагута А. Н. | 143 |
| Іщенко А. А. | 110 | Лазарева Я. І. | 22 |
| Іщенко О. В. | 156 | Лебедь А. В. | 197 |
| Калинин Д. В. | 59 | Левицький В. Є. | 158, 173 |
| Калугин О. Н. | 137, 144, 150, 152 178, 178, 178, 199 | Левковець В. І. | 24 |
| Камнєва Н. Н. | 42 | Левковець С. І. | 24 |
| Камнєва Н. М. | 154 | Лега Д. О. | 98 |
| Каракуркі Г. В. | 16 | Лелюшок С. О. | 61 |
| Каратеев А. М. | 15, 29 | Леоненко И. И. | 83 |
| Катрук Д. С. | 158 | Лесик І. В. | 119 |
| Кийко С. М. | 190 | Липсон В. В. | 121 |
| Киосе Т. А. | 35 | Лисецкий Л. Н. | 117 |
| Киселёва А. В. | 159 | Лисний В. А. | 167 |
| Кітік А. А. | 187 | Литвин Р. З. | 124 |
| Клименко І. М. | 164 | Літвінчук М. Б. | 120 |
| Клименко Л. Ю. | 89 | Лыга Р. И. | 188 |
| Кловак В. О. | 61 | Мазан В. В. | 187 |
| Ключанюк О. Р. | 160 | Макогон В. М. | 169 |
| Кобилінська Н. Г. | 65 | Максимів Н. І. | 169 |
| | | Мальцев Г. В. | 83 |