

Определение малонового диальдегида в эритроцитах

Принцип метода основан на образовании окрашенного комплекса при взаимодействии малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой.

Необходимая аппаратура:

- водяная баня;
- центрифуга;
- спектрофотометр.

Необходимые реактивы:

- **20,0% раствор трихлоруксусной кислоты** (к 20,0 г $\text{CCl}_3\text{CO}_2\text{H}$ [м.в.163,39] добавить 80,0 мл дистиллированной воды);
- **0,5% раствор тиобарбитуровой кислоты** ($\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ м.в.144,1). Готовится непосредственно перед употреблением (100,0 мг растворить в 19,9 мл подогретой дистиллированной воды – такой объём хватает на 18 проб);
- **0,9% раствор хлорида натрия** (к 0,9 г NaCl [м.в.58,44] добавить 99,1 мл дистиллированной воды).

Ход определения 0,1 мл дважды отмытых в физиологическом растворе эритроцитов вносят в центрифужную пробирку к 2,0 мл дистиллированной воды, встряхивают и к полученному гемолизату добавляют пока 1,0 мл раствора трихлоруксусной кислоты, а затем столько же тиобарбитуровой. После чего исследуемую пробу помещают на 10 минут в кипящую водяную баню, хорошо прикрыв отверстие пробирки фольгой, а по окончании – центрифугируют в течение 10 минут при 3000 оборотах. В полученной надосадочной жидкости измеряют оптическую плотность при длине волны 540 нм против контрольной пробы, состоящей из 2,1 мл дистиллированной воды и по 1,0 мл раствора трихлоруксусной и тиобарбитуровой кислот, который также, как исследуемые образцы, необходимо поместить в водяную баню.

Реактивы и действия	Исследуемая проба (мл)	Контроль (мл)
Отмытые эритроциты	0,1	-
Дистиллированная вода	2,0	2,1
Трихлоруксусная кислота	1,0	1,0
Тиобарбитуровая кислота	1,0	1,0
	Поместить на 10 минут в кипящую водяную баню	
	Центрифугировать 10 минут при 3000 оборотах	-
	Определить оптическую плотность при 540 нм	

Расчёт

$$C \text{ (мкмоль/л)} = \frac{\text{Показания оптической плотности пробы} \cdot 10^6 \cdot 4 \text{ (мл)}}{1,56 \cdot 10^5 \cdot 0,1 \text{ (мл)}}$$

т.е. показания оптической плотности умножают на 256,41

где: 4 мл – объем водной фазы;

0,1 мл – объем эритроцитарной массы;

10^6 – коэффициент перевода «моль/л» в «мкмоль/л»;

$1,56 \cdot 10^5$ – коэффициент молярной экстинкции.