



УКРАЇНА

(19) UA (11) 18361 (13) U
(51) МПК (2006)
G01N 33/48МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ КАЛЬЦІЮ В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ

1

2

(21) u200603774

(22) 06.04.2006

(24) 15.11.2006

(46) 15.11.2006, Бюл. № 11, 2006 р.

(72) Стадник Андрій Максимович, Стадник Ольга
Андріївна(73) ЛЬВІВСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ВЕ-
ТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ ІМЕНІ
С.З.ГЖИЦЬКОГО(57) Спосіб визначення концентрації кальцію в
біологічних рідинах, що включає розведення біо-
логічної рідини дистильованою водою, створення в
пробах високолузної реакції (рН-12-13) додан-

ням 0,5N розчину їдкого натру, внесення препара-
ту, що викликає забарвлення досліджуваних проб,
з наступним колориметруванням та аналізом одержаних результатів в порівнянні з нормою рівня кальцію в біологічних рідинах для різних видів та вікових груп, який відрізняється тим, що в проби з досліджуваною рідиною додатково вносять по 0,7-0,8 мл ацетону, а як препарат, що викликає забарвлення проб, використовують препарат кальціон у формі 0,02 % водного розчину, який вносять в проби по 1,4-1,6 мл, обережно перемішують і колориметрують при довжині хвилі 510 нм в кюветах товщиною 10 мм.

Корисна модель відноситься до галузі біології, зокрема біологічної хімії, а саме, до визначення рівня кальцію в біологічних рідинах (сироватці або плазмі крові, сечі, слині, молоці та інших).

Спосіб може бути застосований в біохімічних і клінічних лабораторіях установ з різними формами власності, які досліджують біологічні рідини на забезпеченість їх кальцієм з діагностичними та терапевтичними цілями.

В сучасних лабораторних дослідження визначення кальцію в біологічному матеріалі здійснюють найчастіше методом фотометрії в розчинах із застосуванням кольорових комплексоутворюючих реагентів.

Для фотометричного вимірювання концентрації кальцію в розчині запропоновано багато способів з використанням комплексоутворюючих реагентів: мурексиду [А.В. Каракашов, Е.В. Вичев Микрометоды в клинической лаборатории // "Спектрофотометрическое определение кальция"// изд. "Медицина и физкультура"; София. - 1968. - С.148-149]; орто-крезолфталейнкомплексону (о-КФК) В.В. Меньшиков, Л.Н. Делекторская, З.М. Андрева, А.С. Анкирская, И.С. Балаховский, Д.В. Белокреницкий, С.Д. Воробаева и другие в кн: "Лабораторные методы исследования в клинике". Справочник. Унифицированный метод по цветной реакции крезолфталейнкомплексону. М.: "Медицина." - 1987. - С.265]; метиленового синього [Титов В.Н. ж. "Клиническая лабораторная диагностика" - 1996. - №2 - С.23-26], а також реактивів групи Арсеназо: Арсеназо I, Арсеназо III, 4-нітразо С, карбоназо та інших [А.И. Овсянников, С.А. Коньков, В.К. Туркало "Измерение содержания кальция в биологических жидкостях комплексом Арсеназо III" ж. "Клиническая лабораторная диагностика" - №1 - 1999г. - С.16-18]. Недоліком відомих способів є складність їх виконання, дефіцитність реактивів, а також недостатня об'єктивність і точність в зв'язку з короткотривалим забарвленням комплексів, що утворюються перерахованими вище реагентами з кальцієм.

Відомий також спосіб визначення кальцію у сироватці крові шляхом прямого комплексометричного титрування з індикатором флуорексином [Е. Вичев, А. Каракашов. ж. "Вопросы медицинской химии" - №6 - 1960г.]. Спосіб базується на здатності індикатора флуорексону утворювати з кальцієм сироватки крові у високо лузному середовищі (рН-13) сполуку, що флуоресцює. При титруванні комплексом III (ЕДГА) кальцій звільнюється з цього комплексу, при цьому утворюється вільний індикатор рожево фіолетового кольору. При титруванні Трилоном Б в точці еквівалентності відзначається різке згасання флуорисценції.

Недоліком способу є складність виконання способу та нечіткість рожево-фіолетового забарвлення проб, що швидко зникає, оскільки перехід рожевого забарвлення у фіолетове важко спостерігається.

(19) UA (11) 18361 (13) U

Найбільш близьким по суті до способу що заявляється є колориметричний спосіб визначення кальцію в сироватці крові [3. Словак, Я. Семенкова. ж. "Лабораторное дело" - №1. - 1974р. - С.19-22].

Спосіб базується на реакції кальцію сироватки крові з гліюксаль-біс (2-оксианілом) внаслідок якої в лужному середовищі утворюється комплекс червоного кольору, який визначають фотометрично.

Спосіб надає можливості отримати дані з точністю $\pm 4,0\%$. Недоліком способу є те, що забарвлення в досліджуваних пробах швидко змінюється і зникає, тому вимірювання необхідно проводити терміново між 5-ю і 15-ю хвилинами після внесення гліюксаль-біс(2-оксиніла). В зв'язку з цим, за цим способом рекомендується обробляти серії не більше 10 проб. Крім того, препарат гліюксаль-біс(2-оксиніл), що забезпечує забарвлення досліджуваних проб дуже нестійкий і зберігається не більше 10 днів після виготовлення.

Заявлений нами спосіб усуває недоліки прототипу і забезпечує чутливість 0,1-10мкг кальцію в пробі, при цьому специфічне рожево-фіолетове забарвлення проб в процесі визначення кальцію триває до 1 години, що надає можливість дослідження великих партій біологічних рідин при малих кількостях досліджуваного матеріалу.

В основу корисної моделі покладено завдання створити ефективний і точний спосіб визначення кальцію в біологічних рідинах тваринного організму (крові, плазмі, сироватці, спинномозковій рідині, сечі, молоці та інших), економічно вигідний, зручний для застосування.

Технічний результат досягають тим, що в проби досліджуваних біологічних рідин додатково вносять ацетон (0,7-0,8мл), в якості препарату, що викликає специфічне забарвлення проб, використовують кальціон у формі 0,02% водного розчину, який додають у кожную пробу по 1,4-1,6мл, обережно перемішують і колориметрують при довжині хвилі 510нм в кюветах товщиною шару 10мм.

Кальцион-1,7',1',7"-Дисазонафталін-8,8',1",8"-тетраокси-3,6,3',6',3",6"-гексасульфокислота (пентанатрієва сіль) $\text{Ca}_{30}\text{H}_{15}\text{O}_{22}\text{N}_4\text{S}_6\text{Na}_5[\text{IPEA}]$.

Реактив являє собою дисазофарбник. Випускається у вигляді чорного з фіолетовим відтінком порошку із вмістом води (в т.ч. кристалізаційної води) до 15% і хлористого натрію до 4-8%. Він добре розчиняється у воді і практично не розчиняється в ацетоні, бензолі, хлороформі, чотирехлористому вуглеці, етиловому і ізоаміловому спиртах. При зберіганні в скляній тарі реактив не змінюється. Його водні розчини стійкі не менше трьох місяців.

Кольорова реакція кальціона з кальцієм специфічна (від синього до рожевого) розвивається миттєво в лужному середовищі (оптимальна pH 12-13), при цьому найбільша контрастність виникає в присутності ацетону. Суть цієї реакції полягає в утворенні продукту взаємодії, в якому співвідношення реагуючих речовин $\text{Ca}:\text{HR}$ складає 1:1. Жоден інший катіон (в т.ч. Ba, Sz, Mg та багато інших) аналогічної зміни реакції не дає.

Відмітними властивостями кальціону як реактиву для визначення кальцію є достатньо висока специфічність і чутливість реакції забарвлення та

її швидкий розвиток, велика контрастність і чіткість переходу забарвлень при фотометричному визначенні. При цьому додавання ацетону у досліджувані проби підвищує чутливість реакції і контрастність зміни забарвлення.

Забарвлення розчинів біологічних рідин, що досліджуються, стійке біля 1 години, а надалі поступово послаблюється. Чутливість реакції 0,1мкг кальцію в 1мл розчину. Отже, заявлений спосіб є специфічним, чітким, високочутливим, зручним у застосуванні.

При проведенні патентно-інформаційного пошуку заявником і авторами виявлено технічне рішення, що містить найбільшу кількість суттєвих ознак, спільних із заявленим рішенням: розведення біологічної рідини, дистильованою водою, створення в пробах високолужної реакції (pH-12-13) додаванням 0,5N розчину їдкого натру, внесення препарату, що викликає специфічне забарвлення досліджуваних проб з наступним колориметруванням та аналіз одержаних результатів в порівнянні з нормою рівня кальцію в біологічних рідинах для різних видів та вікових груп [3. Словак, Л. Семенкова. ж.: "Лабораторное дело" - 1974. - №1 - С.19-22]. Однак наявність зазначених, спільних з прототипом ознак - недостатня для одержання технічного результату, який забезпечує заявлений спосіб.

Технічних рішень, які б за сукупністю ознак повністю б співпадали із заявленим рішенням - не виявлено.

Це дозволяє зробити висновок про відповідність заявленого технічного рішення критерію винаходу (корисної моделі) - "новизна".

В патентній і науково-технічній інформації не знайдено технічних рішень, в яких були б описані відомості про ознаки, що відрізняють заявлений спосіб від прототипу і забезпечують досягнення технічного результату: в проби з досліджуваною біологічною рідиною вносять ацетон (0,7-0,8мл), а в якості препарату, що викликає специфічне забарвлення проб використовують кальціон у формі 0,02% водного розчину, який додають в пробу по 1,4-1,6мл, бережно перемішують і колориметрують при довжині хвилі 510нм в кюветах товщиною шару 10мм.

Отже заявлене технічне рішення не впливає явним чином з рівня техніки, що дозволяє зробити висновок про його відповідність критерію винаходу (корисної моделі) - "винахідницький рівень".

Заявлений спосіб відноситься до галузі біології, зокрема біологічної хімії, а саме, до визначення рівня кальцію в біологічних рідинах (сироватці або плазмі крові, сечі, слині, молоці та інших)

Спосіб може бути застосований в біохімічних і клінічних лабораторіях, установ з різними формами власності, які досліджують біологічні рідини на наявність і забезпеченість їх кальцієм з діагностичними та терапевтичними цілями, а тому відповідає критерію винаходу (корисної моделі) - "промислова придатність".

Таким чином, заявлене технічне рішення є новим промислово придатним, має винахідницький рівень, тобто відповідає усім умовам патентноспроможності корисної моделі відповідно до ст.7 розділу II Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі.", №1771-III, 2000р.

Досліджувану біологічну рідину розводять бідистильованою водою.

Так для сироватки крові: 0,05мл сироватки крові вносять в пробірку з 2,2мл бідистильованої водою, двічі промивають піпетку.

Додаванням 0,5N розчину їдкого натру створюють висок лужну реакцію досліджуваної біологічної рідини (рН=12,5).

Для сироватки крові: в пробірку додають 0,5мл 0,5N розчину NOH і ретельно перемішують вміст пробірки.

Для створення найбільшої контрастності реакції вносять ацетон одночасно з розчином кальцію. Для сироватки крові: в пробірку додають 0,75мл ацетону і одночасно 1,5мл 0,02% розчину кальцію, який готують завчасно. Розчин кальцію зберігається протягом 3-х місяців.

Через 5 хвилин після додавання розчину кальцію і обережного перемішування проби колориметрують при довжині хвилі 510нм проти контролю (стандарт) в кюветах при товщині шару 10мм.

Стандарт; 100мг% розчин вуглекислого кальцію (2,497г на 1л води)

Оцінку результатів вимірювання здійснюють за оптичною щільністю проби і контролю-стандарту.

Приклад конкретного виконання способу

Ефективність заявленого способу та його переваги перед прототипом підтверджена прикладом конкретного виконання способу.

В умовах лабораторії кафедри внутрішніх хвороб тварин Львівської національної академії ветеринарної медицини імені С.З. Гжицького та центральної обласної клінічної лабораторії проведено ряд серій клінічних дослідів по визначенню концентрації кальцію в сироватці крові великої рогатої худоби, зокрема корів і телят НДГ "Комарнівське" Львівської області, а також жінок-донорів м.Львів.

Сироватку крові досліджували паралельно за

відомим способом (прототип) та новим способом з використанням кальцію.

В дослідях було встановлено, що вміст кальцію в сироватці крові знаходиться в межах: у здорових корів - 9,5-11,6мг% (2,4-2,9ммМ/л); телят - 10,0-12,5мг% (2,5-3,12ммМ/л); жінок-донорів - 9,0-11,6мг% (2,25-2,9ммМ/л). У хворих остеодинтрофією корів - 8,8мг% (2,2ммМ/л), бугайців - 7,61(1,91ммМ/л); та з перебігом субклінічної форми хвороби - 8,35мг% (2,09ммМ/л).

Порівняльне визначення кальцію за відомим способом з гліоксаль-біс(2-оксианілом) дає співпадаючі наслідки. Однак незручність відомого способу полягає у короткотривалому забарвленні проб (від 5 до 10 хвилин), що утруднює визначення великих партій дослідного матеріалу.

Таблиця 1

Порівняльні властивості способів визначення кальцію в біологічних рідинах.

Показники	Прототип	Новий спосіб
Комплексоутворюючий реагент	реактив ГБОА гліоксаль-біс(2-оксианіл)	0,02% водний розчин кальцію з додаванням ацетону
Тривалість забарвлення дослідних проб	5-10 хвилин	до 1 години
Чутливість реакції	±4,0%	0,1мкг кальцію в досліджуваних пробах

Заявлений нами спосіб визначення кальцію з допомогою кальцію специфічний, високочутливий, вимагає в 10 разів меншу кількість матеріалу для дослідження і дозволяє досліджувати великі партії біологічних рідин.