



УКРАЇНА

(19) UA (11) 19536 (13) U
(51) МПК (2006)
G01N 33/483
G01N 33/50

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ КАТІОНІВ В СЛИНІ ТА ШЛУНКОВОМУ СОКУ

1

(21) u200607400

(22) 03.07.2006

(24) 15.12.2006

(46) 15.12.2006, Бюл. № 12, 2006 р.

(72) Маркіна Марина Володимирівна, Качанов Сергій Олександрович, Вяткін Олександр Костянтинович, Руденко Анатолій Іванович, Хоменко Олена Миколаївна, Крекнін Олександр Федорович
(73) ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО "ДНІПРОПЕТРОВСЬКИЙ РЕГІОНАЛЬНИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ТЕХНІЧНИЙ ЦЕНТР СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ ТА СЕРТИФІКАЦІЇ"

(57) 1. Спосіб визначення катіонів в слині та в шлунковому соку, який включає підготовку проби, її дослідження та оцінку результатів, який **відрізняється** тим, що пробу слини, шлункового соку центрифугують, фільтрують; фільтрат об'єднують з буферним розчином, а потім досліджувану рідину вводять в капіляр приладу, на вхід якого подають високу напругу позитивної полярності, проводять електрофоретичне виділення катіонів; виявлені катіони надходять на фотометричний детектор, реєструються на електрофореграмі у відповідній послідовності у вигляді піків над ізолінією, кількість виявленого катіона в пробі визна-

2

чають шляхом вимірювання площі піка відповідного катіона та зіставленням з калібрувальним графіком.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що пробу досліджуваної рідини центрифугують протягом 5 хвилин зі швидкістю 6000 об/хв, об'єднують з буферним розчином у співвідношенні 1:1.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що для дослідження відбирають дозатором суміш досліджуваної рідини з буферним розчином у кількості 300 мкл та вводять у капіляр приладу під тиском 30 мБар протягом 5 с.

4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що для проведення капілярного електрофорезу подають напругу 10 кВ позитивної полярності протягом 20хв.

5. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що фотометричний детектор, фіксуючий вихід катіонів, працює на довжині хвилі 253,7 нм.

6. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що для ідентифікації профілю катіонів перший буферний розчин формують у вигляді суміші бензімідазолу, винної кислоти, 18-краун-6 та води дистильованої, взятих у співвідношенні 3,0:1,0:2,0:4,0 (см³).

Корисна модель відноситься до медицини, зокрема до клініко-лабораторних методів дослідження, і може бути використаним для визначення вмісту катіонів (калію, натрію, магнію, кальцію) в слині та шлунковому соку.

Слина являє собою суміш секретів слинних залоз, складна та постійна по біохімічному складу. В її детермінуванні беруть участь білки, ліпіди, вуглеводи, стероїди, іони багатьох хімічних елементів, в том числі K, Na, Ca, Mg та інші [1,2]. Щодня у людини виділяється до 2л слини.

Шлунковий сік - секрет шлункових залоз і клітин епітелію слизової оболонки шлунку, містить ферменти (пепсин, желатиназу та ін.), соляну кислоту, гастронукопротеїни, мінеральні речовини. Протягом доби виділяється 2,0-2,5л шлункового соку. Слина та шлунковий сік мають важливе зна-

чення в системі харчування та життєдіяльності організму [3]. В той час як дослідження кислото- і пепсиноутворюючої функції залоз шлунку проводяться давно і широко використовуються, то дослідженням слини приділяється недостатньо уваги.

Тільки за останні роки зацікавленість дослідженнями слини збільшилась. Це пов'язано з різноманітними її функціями, властивостями та роллю у життєдіяльності організму. Відомо, що склад слини та шлункового соку корелюють із складом інших рідин організму, тому результати досліджень їх складу мають діагностичне значення [4].

Засіб збирання слини простий, не інвазивний, безпечний для пацієнта. Він може виконуватись багаторазово, в любий час протягом доби. Саме тому дослідження слини може бути в певній мірі

U
(13)
19536
(11)
UA
(19)

альтернативою інвазивним методам та дослідженням, наприклад, крові. Збирання шлункового соку відбувається за допомогою зондів. Досягнення при створенні аналітичної техніки сприяють розширенню методів досліджень слини та шлункового соку, вдосконаленню засобів досліджень їх складу. Катіони K, Na, Ca, Mg та ін. входять до складу слини, шлункового соку, крові та ін. біологічних рідин організму, являються їх структурними елементами.

Зусилля досліджувачів направлені на пошуки та розробку більш досконалих засобів вивчення складу біологічних рідин. Це важливо як для діагностики захворювань, так і для розуміння їх механізму розвитку та протікання.

Засоби визначення катіонів відомі. Відомий спосіб визначення катіонів калію, натрію, та ін. елементів у біологічних рідинах шляхом пламенної фотометрії [5]. Спосіб являється емісійним, спектральним і ґрунтується на тому, що катіони (K, Na, Ca, Mg та ін.) при збудженні їх атомів дають характерний спектр випромінювання. Інтенсивність випромінювання спектру залежить від концентрації речовини. Збудження атомів досягають введенням їх розчинів у полум'я. Спектр, який випромінюється досліджуваною речовиною, направляють крізь світлофільтри на фотоелемент і по силі виникнення струму, який вимірюють мікроамперметром, роблять висновок про наявність елементу.

Для реалізації способу необхідна подача газу у прилад під строго визначеним тиском, це потребує додаткових стабілізуючих пристроїв. Невиконання даної умови знижує точність способу. Крім того, для виконання аналізу і розрахунку результатів дослідження, необхідно підтримувати постійну температуру джерела випромінювання, що не завжди може бути точно виконано. Аналітичний сигнал залежить від концентрації збуджених атомів, яка дуже мала порівняно з загальною концентрацією атомів. Це ускладнює та обмежує використання полум'яної фотометрії.

Відомий спосіб атомно-абсорбційної спектrophотометрії [5], який оснований на поглинанні атомами внесеного у полум'я досліджуваного елемента, при проходженні крізь нього монохроматичного випромінювання, генерованого спеціальним джерелом світла. Поряд з перевагами даного методу (висока чутливість, селективність) існують і недоліки: на кожен визначений елемент повинно бути джерело випромінювання; в один відрізок часу можна визначити тільки один елемент; необхідна довгочасна пробопідготовка. Цей спосіб, як і спосіб рентгеновської спектроскопії і нейтронно-активаційного аналізу, потребують наявності коштовної апаратури.

Відомий спосіб визначення калію і натрію в слині [6], включаючий вплив ультразвуку на слину. При цьому визначають зміни швидкості ультразвуку, проходжуємого крізь слину при температурі 30°C та 37°C порівняно з дистильованою водою; при таких же температурах і обчислюють значення калію та натрію в молях на літр за формулами.

В останній час в клініко-лабораторній практиці застосовують методи іонометричного визначення іонів K, Na та ін., що полягають в вимірюванні електродного потенціалу іоноселективного елект-

роду, зануреного в досліджуємый розчин [5]. Значення потенціалу електроду дозволяє робити висновки про активність присутніх у розчині іонів калію, натрію, кальцію та ін. Для виконання способу використовують різноманітні конструкції іоноселективних аналізаторів.

До числа найбільш відомих аналізаторів такого типу - відносяться аналізатор іонного складу біологічних рідин «Easylite» фірми «Медика», аналізатори «Elektrolyte-2» фірми «Бекман» та ін. Спосіб іонометричного визначення, як найбільш близький до заявленого способу; технічної суті та досягаємого ефекту, прийнятий за найближчий аналог. Недоліки найближчий аналогу полягають в недостатній ефективності використання поширеної номенклатури критеріїв якості; обмеження можливостей збільшення чутливості при ідентифікації, що в сукупності запобігає підвищенню об'єктивності оцінки та точності, а також недоступність приладів закордонних фірм для використання через їх високу вартість.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити такий спосіб визначення вмісту катіонів в слині та шлунковому соку, яка забезпечувала б визначення широкого спектру катіонів з високою точністю за короткий проміжок часу, був простим при використанні, не вимагав дефіцитних реактивів та коштовних приборів.

Означений вище технічний результат досягається тим, що у відомому способі визначення катіонів в слині та шлунковому соку шляхом капілярного електрофорезу, який містить підготовку проби, центрифугування в технологічно прийнятному режимі, ідентифікацію на заданій довжині хвилі аналізатора, та якісно-кількісний аналіз, згідно з корисною моделлю, сканують оптичну щільність поляризованих проб, перетворюють її у аналогово-цифровий сигнал, отримують електрофореграми, з яких ідентифікують амплітуди сигналів катіонів, при відповідній полярності потенціалів джерела живлення. Поляризація проб здійснюється першими буферними розчинами, між поляризованими пробами та другими буферними розчинами розміщують капілярну трубку, з можливістю підтримки тиску 30мБар протягом 5сек в її порожнині, та впритул до капілярної трубки встановлюють аналізатор, а сканування оптичних щільностей поляризованих проб здійснюють під час міграції останніх крізь капілярну трубку. Перший буферний розчин для ідентифікації профілю катіонів формують у вигляді суміші бензимидазолу, винної кислоти, 18-краун-6 та води дистильованої, взятих у співвідношенні 3,0:1,0:2,0:4,0см³. Другі буферні розчини отримують змішуванням 1см³ буферного розчину №1 та 9см³ дистильованої води.

Перетворення результатів сканування в аналогово-цифровий сигнал засвідчує витончену, більш прозору графологічну картину поточної проби. Виготовлення буферних розчинів дозволяє отримати та підготувати форетичне й електрофоретичне середовище для відтворення процесу, забезпечує поляризацію проби, міграцію її компонентів, та виявлення кількісного вмісту. Центрифугування проби зі швидкістю 6000об/хв протягом 5 хвилин переслідують її дегазацію для безперешкодного потрапляння в порожнину капілярної трубки

та подальшого переміщення. Змішування проб з першими буферами передбачає поляризацію проби та подальше розпізнання при скануванні. Розміщення капілярної трубки між поляризованими пробами та другими буферними розчинами відтворює капілярний електрофорез, сприяє переміщенню проби для остаточної ідентифікації та розпізнання. Отже сукупність умов відтворення капілярного електрофорезу виключає необхідність використання хімічних засобів, забезпечує оптимальні рівні поляризації, стабілізує експозицію інтервалів між періодами їх виділення в пробі. Означені властивості капілярного електрофорезу істотно збільшують чутливість ідентифікації, що забезпечує підвищення об'єктивності та вірогідності визначення.

Спосіб визначення катіонів калію, натрію, магнію, кальцію в слині та шлунковому соку виконують шляхом капілярного електрофорезу за допомогою приладу "Капель 103Р" російської фірми "Люмекс", ваг лабораторних, дозаторів пипеточних змінних обсягів, рН-метру, програмного забезпечення "Мультихром".

Спосіб включає ряд послідовних етапів: відбір та підготовку проби досліджуваної рідини, підготовку капіляру приладу до роботи, введення досліджуваної рідини в капіляр, розподіл компонентів проби, виявлення і реєстрацію процесу на електрофореграмі, обробка результатів дослідження.

Збирання слини або шлункового соку для дослідження виконують відомими методами. Пробу досліджуваної рідини в об'ємі 5см³ поміщають в пробірку Епандорфа, центрифугують протягом 5 хвилин зі швидкістю 6000обертів/хв, а потім фільтрують крізь целюлозно-ацетатний фільтр. Відбирають за допомогою дозатору 300мкл досліджуваної рідини і перемішують її з 300мкл буферного розчину [2]. Капіляр приладу перед дослідженням промивають по 5 хвилин розчинами: хлороводневої кислоти, дистильованої води, натрію гідроксиду, робочим буферним розчином [1]. Пробірку з підготовленою пробкою встановлюють на вході капіляру, пробірку з буферним розчином [1] - на виході капіляру. Між пробкою, що змішана з другим буфером, та електролітичним середовищем, функцію якого виконує перший буферний розчин, встановлюють капілярну трубку, з можливістю підтримки тиску 30МБар протягом 5 секунд в її порожнині, встановлюють аналізатор оптичної щільності впритул до капілярної трубки та комутують ланцюги високовольтного живлення. Проведення аналізу протягом 20 хвилин відбувається за умов підключення джерела електричного струму напругою 10кВ позитивної полярності. Розподіл компонентів суміші рідин здійснюється за рахунок розходження швидкостей їх міграції в капілярі, який знаходиться під впливом електричного струму. За допомогою детектора, розміщеного впритул до капіляру, сканують оптичні щільності проб і реєструють компоненти, що не мають поглинання на довжині хвилі 253,7нм. Відбувається так зване "непряме детектування", цей процес досягається введенням у головний [1] електроліт невеликих концентрацій речовин, що поглинаються на потрібній довжині хвилі. Шляхом перетворення даних сканування проби в аналогово-цифровий сигнал

отримують першу електрофореграму, яка являє собою набір позитивних піків над базовою лінією. Отримані аналітичні сигнали у вигляді піків на електрофореграмі використовують для ідентифікації та кількісного визначення. Концентрацію в пробі визначають за допомогою калібрувального графіку по площі піку даного катіону. Запропонованому об'єкту притаманні високий рівень рентабельності та автоматизації, швидкість визначення вмісту, відсутність необхідності використання додаткових реагентів для виділення компонентів проби та простота відтворення.

Виконання запропонованого способу реєструється певними прикладами.

Пацієнт Г. 48 років, практично здоров. 01.06.2006 провели збирання слини та шлункового соку традиційними прийомами та досліджували їх на вміст катіонів. Дослідження проводили на приладі «Капель 103Р». З 8см³ слини, 30см³ шлункового соку відібрали в окремі пробірки Епандорфа по 5см³ рідини. Відібрані проби центрифугували протягом 5хв. при швидкості 6000об/мин; профільтрували крізь целюлозно-ацетатні фільтри та змішали у співвідношенні 1:1 з буферним розчином [2]. Провели підготовку капіляру приладу шляхом його промивання рідинами, які вказані вище, протягом 5хв. В режимі приладу «Введення проби» досліджувану рідину вводили в капіляр приладу під тиском 30мБар протягом 5с. Після введення проби на вхід капіляру встановили пробірку з буферним розчином та підключили напругу 10кВ позитивної полярності. При положенні перемикача приладу в режимі «Аналіз» проводили виділення катіонів в електричному полі. Їх міграція з різною швидкістю фіксувалась на електрофореграмах, представлених на Фіг.1, 2 у вигляді піків. На Фіг.1 представлена електрофореграма досліджуваної слини. Визначена площа піків катіонів, використовує калібрувальний графік встановила, що досліджувана слина містить 278,5мг/дм³ калію, 178,1мг/дм³ натрію, 6,06мг/дм³ магнію, 2,78мг/дм³ кальцію. Відповідним чином розрахували вміст катіонів в досліджуваній рідині шлункового соку (див. Фіг.2). Встановили, що шлунковий сік містить 267,8мг/дм³ калію, 721,7мг/дм³ натрію, 13,12мг/дм³ магнію, 29,15мг/дм³ кальцію.

Заявляємий спосіб визначення катіонів в слині та шлункового соку використаний в умовах лабораторії ДП "Дніпростандартметрологія". Всього виконано 30 аналізів дослідження слини та 30 аналізів дослідження шлункового соку, отриманих у людей з захворюваннями органів травлення та у відносно здорових осіб.

Робота, згідно з заявленим способом може бути виконана в умовах звичайної лабораторії при кімнатній температурі, атмосферному тиску та вологості, згідно з вимогами до лабораторії. Спосіб забезпечує високу чутливість розпізнання компонентів, точність дослідження, швидкість визначення і головне для виконання аналізу необхідна мала кількість проби, що дозволяє досліджувати біологічні рідини невеликого об'єму. Спосіб збирання об'єктів дослідження (слини та шлункового соку) простий, доступний та безпечний для людини.

Джерела інформації:

1. В. Е. Зайчик, Ш.Т. Багиров Содержание химических элементов в смешанной, нестимулированной слюне здорового человека.// Стоматология. - 1991. - №1. - С.14-17.

2. Ш.Т. Багиров, В.Е. Зайчик, В.М. Калашников Физиологическая изменчивость концентрации химических элементов в смешанной, нестимулированной слюне человека (натрий, хлор, кальций).// Азейбарджанский мед. журн. - 1985. - №8. - С.29-34.

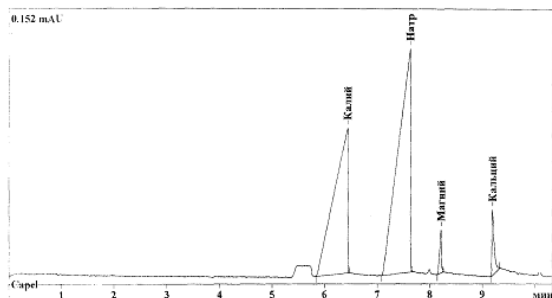
3. А.И. Рыбаков, В.С. Иванов Клиника терапевтической стоматологии. М.,1980.

4. И. В. Григорьев, А.А. Чиркин Роль биохимического исследования слюны в диагностике заболеваний. // Клинич. лаборатор. диагностика - 1998. - №6. - С.18-20.

5. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика. Справочник. В.С. Калашников. 2003.

6. Заявка №2004111022 РФ МПК G01N33/68 Способ определения калия и натрия в слюне. Опубликовано 2005.10.10.

ПРОБА: Слина
Метод-визначення катіонів
Пробирка №: 1
Объем: 300.0 мкл
Разведение: 2.00
Количество: 600.00
Дата/время забора: 05/06/2006 11:53:32

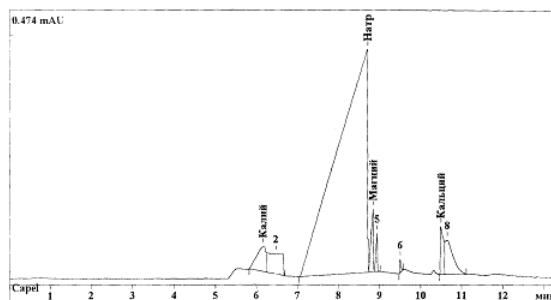


РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА				
Метод расчета:	Заказной			
Стандарт:	Нет			
Канал:	Cape1			
Нормализация:	100.00			
№	Время сек	Высота mAU	Площадь mAU*сек	Название
1	386.1	0.09	1.59	Калий
2	457.5	0.14	2.17	Натрий
3	492.8	0.03	0.07	Магний
4	551.5	0.04	0.11	Кальций
4	620.8	0.29	3.93	

КОММЕНТАРИЙ
Ввод пробы 5 сек
Напряжение 10 кВ
Время анализа 15 мин
Слина Ганева
pH - 6,95
V - 60,0

Фиг. 1

ПРОБА: Желудочный сок
Метод-визначення катіонів
Пробирка №: 1
Объем: 300.0 мкл
Разведение: 2.00
Количество: 600.00
Дата/время забора: 05/06/2006 12:11:45



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА				
Метод расчета:	Заказной			
Стандарт:	Нет			
Канал:	Cape1			
Нормализация:	100.00			
№	Время сек	Высота mAU	Площадь mAU*сек	Название
1	370.8	0.05	0.76	Калий
2	388.2	0.04	0.93	
3	521.9	0.42	21.23	Натрий
4	530.5	0.12	0.45	Магний
5	536.3	0.07	0.19	
6	570	0.03	0.06	
7	629.6	0.09	0.47	Кальций
8	639	0.07	0.91	
8	797.4	0.88	24.99	

КОММЕНТАРИЙ
Ввод пробы 5 сек
Напряжение 10 кВ
Время анализа 15 мин
Желудочный сок Ганевой

Фиг. 2