



УКРАЇНА

(19) UA (11) 94165 (13) C2  
(51) МПК (2011.01)  
G01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

### (54) КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ БІЛКА В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ

1

(21) а200912181

(22) 26.11.2009

(24) 11.04.2011

(46) 11.04.2011, Бюл.№ 7, 2011 р.

(72) КОНДАКОВА ЛЮДМИЛА ВОЛОДИМИРІВНА,  
ТЬОРТИХ ВАЛЕНТИН АНТОЛІЙОВИЧ, ЯНИШ-  
ПОЛЬСЬКИЙ ВІКТОР ВАСИЛЬОВИЧ, КЛІЩАР  
ІРИНА ВАСИЛІВНА(73) ІНСТИТУТ ХІМІЇ ПОВЕРХНІ ІМ. О.О. ЧУЙКА  
НАН УКРАЇНИ(56) Ким Ю.В., Потехин О.Е., Токар М.И., Шибанов  
А.Н. Что мы измеряем в моче сульфосалицило-  
вым методом? //Лабораторная медицина. - 2003. -  
№ 6. С. 94-98.

2

RU 2268476 C2 20.01.2006

(57) Композиція для визначення білка в біологічних  
рідинах, яка включає барвник пірогалоловий чер-  
воний та робочий розчин, яка **відрізняється** тим,  
що робочий розчин містить комплекс органічних  
кислот, при такому співвідношенні компонентів,  
мас. ч.:

пірогалоловий червоний	0,02±0,01
метиловий спирт	0,06±0,01
натрію молібдат	0,03±0,01
бурштинова кислота	3,84±0,20
бензойна кислота	0,43±0,10
щавлева кислота	0,13±0,03
вода	до 1 л розчину.

Винахід відноситься до області медичних клі-  
нічних досліджень та може бути використаний для  
кількісного та якісного визначення вмісту білка в  
крові, сечі, спинномозковій рідині та інших біологі-  
чних рідинах.

Як відомо, аналіз вмісту білка у сечі та спино-  
мозковій рідині є важливим для контролю перебігу  
різноманітних форм протеїнурії та дії ниркового  
фільтру та відноситься до одного з найбільш по-  
ширених клінічних досліджень. Більшість кількіс-  
них методів визначення вмісту білка засновано на  
його коагуляції в об'ємі рідини чи на межі розділу  
двох рідин та визначенні інтенсивності коагуляції  
фізичними (рефрактометрія, спектрофотометрія в  
УФ-області, полярографія), біологічними (придатні  
тільки для білків, що проявляють ферментативну  
або гормональну активність) та хімічними (метод  
Кьельдаля по загальному вмісту азоту у препараті;  
метод Брандберга-Робертса-Стольникова на ос-  
нові кільцевої проби Геллера; різноманітні коло-  
риметричні методи: з сульфосалициловою кисло-  
тою, біуретовий метод, метод Лоурі, метод з  
використанням біцинхонінової кислоти, метод  
Бредфорда з барвником кумасі яскравоголубим,  
метод з бромкрезоловим зеленим, метод Флореса  
з тетрабромфеноловим синім та індикаторні поло-  
ски на його основі).

Відома композиція для напівкількісного визна-  
чення вмісту білка в сечі (метод кільцевої проби),

яка містить азотну кислоту [1]. При взаємодії азот-  
ної кислоти з білком утворюється біле кільце із  
коагульованого білка.

До недоліків використання цієї композиції від-  
носиться те, що при застосуванні її для визначен-  
ня білка в сечі потрібні достатні експериментальні  
навички лаборанта, біле кільце виникає також при  
наявності у сечі уратів, не дозволяє визначити  
вміст білка в інших біологічних рідинах.

Відома композиція для напівкількісного визна-  
чення білка в сечі, яка містить сульфосалицило-  
ву кислоту, при введенні якої в пробу сечі відбуваєть-  
ся замушення розчину [1].

До недоліків цієї композиції відноситься те, що  
вона не може бути застосована до проб сечі осіб,  
які приймали препарати йоду, пеніцилін, сульфа-  
ніламідні препарати, при наявності у складі сечі  
сечової кислоти, не дозволяє визначити вміст біл-  
ка в інших біологічних рідинах.

Відома композиція для кількісного визначення  
білка в сечі, яка містить в своєму складі солі міді в  
лужному середовищі [1]. Композиція солей міді у  
лужному середовищі при взаємодії з розчинами  
білка утворює комплекс фіолетового кольору, що  
дозволяє фотометрично визначати кількість білка  
в розчині.

До недоліків цієї композиції відноситься те, що  
вона потребує попереднього концентрування білка  
(протеїнурія в нормі складає 50-150 мг на добу)

(19) UA (11) 94165 (13) C2

трихлороцтовою кислотою, аналіз триває 1 годину, не дозволяє визначити вміст білка в інших біологічних рідинах.

Відома, вибрана як прототип, композиція на основі пірогаллолового червоного для визначення білка в сечі [2]. Ця композиція містить сукцинатний буфер (бурштинова кислота та NaOH), який забезпечує перебіг реакції в кислому середовищі при стабільному значенні pH.

До недоліків цієї композиції відноситься те, що реакційну суміш потрібно готувати безпосередньо перед дослідженнями, необхідно використовувати детергенти для стабілізації реакційної суміші, а використання малого об'єму зразка для аналізу може вносити помилки в результати аналізу.

В основу винаходу поставлене завдання розробити композицію, яка є універсальною для визначення загального білка в різних біологічних рідинах, усуває попереднє концентрування білка, підвищує чутливість аналізу.

Поставлене завдання вирішується тим, що композиція для визначення білка в біологічних рідинах включає барвник пірогаллоловий червоний та робочий розчин. Згідно з винаходом, робочий розчин містить комплекс органічних кислот при такому співвідношенні компонентів, мас. ч.:

Пірогаллоловий червоний	0,02±0,01
метиловий спирт	0,06±0,01
натрію молібдат	0,03±0,01
бурштинова кислота	3,84±0,20
бензойна кислота	0,43±0,10
щавлева кислота	0,13±0,03
вода	- до 1 л розчину

На основі пірогаллолового червоного створена композиція, придатна для визначення загального вмісту білків у мікрокількостях біологічних рідин. Визначення вмісту білка у різних біологічних рідинах засновано на реакції, що перебігає у кислому середовищі при стабільному значенні pH. Заявлений комплекс органічних кислот у водному розчині забезпечує підтримання визначеної кислотності (pH -2,6), яка не змінюється при додаванні значної кількості 6М розчину NaOH. При визначенні молібдату натрію і барвник пірогаллоловий червоний утворюють комплекс із молекулою білка. Молекули барвника у вільному стані не поглинають світло при довжині хвилі 600 нм, а утворюючи комплекс з білком поглинають в цій області спектра, причому зміна оптичної густини реакційної суміші при довжині хвилі 600 нм чітко корелює із концентрацією білка в дослідному зразку. Спорідненість пірогаллолового червоного до різних фракцій білка однакова, тому метод визначення білка на основі заявленої композиції дозволяє вимірювати загальний вміст білка, що знаходиться у зразку.

Заявлена композиція містить компоненти при оптимальному співвідношенні. Збільшення кількості компонентів робочого розчину понад оптимальну призводить до зменшення їх розчинності і до збільшення вартості аналізу, а зменшення - до зниження чутливості методу визначення білка в біологічній пробі.

Із застосуванням розробленої композиції запропоновано тест-систему «Мікротест-білок» для визначення концентрації загального білка, які до-

зволяють визначати вміст білка в сечі, крові та спинномозковій рідині в діапазоні концентрацій 0,15-1,0 г/л з точністю  $\pm 5\%$ . Час проведення одного аналізу - до 15 хвилин.

«Мікротест-білок» забезпечує простий спосіб визначення білків (альбумінів, глобулінів, білку Бенс-Джонса) з використанням мікролітрових кількостей зразків сечі, крові або спинномозкової рідини. В присутності білка червоний колір розчину «Мікротест-білок» змінюється на синьо-фіолетовий з максимумом поглинання біля 600 нм. Реєстрація цієї зміни кольору за допомогою спектрофотометра чи фотоелектроколориметра дозволяє проводити кількісне визначення білка. Вимірювання поглинання світла можна проводити і при 590 нм.

Суть винаходу пояснюється прикладом виконання.

Приклад. В мірній колбі на 1 л в 600 мл дистильованої води (при температурі приміщення) розчиняють такі реактиви: 0,03 г натрію молібдату, 3,84 г бурштинової кислоти, 0,13 г щавлевої кислоти, 0,43 г бензойної кислоти. 0,02 г індикатора пірогаллолового червоного розчиняють в 0,06 г метанолу, потім додають 8 мл дистильованої води. Змішують приготовлені розчини в мірній колбі та доводять об'єм дистильованою водою до 1 л. Приготовлений таким чином розчин «Мікротест-білок» є повністю готовою до використання рідиною та не потребує розведень чи інших підготовчих операцій. Стандартні розчини білків для побудови калібрувальних графіків готують в залежності від потреб.

Хід визначення.

При температурі середовища (20±5) °С, атмосферному тиску 84,0-106,7 кПа (600,0-800,7 мм рт. ст.), відносній вологості 30-80 % у пробірку вносять зразки сечі, спинномозкової рідини чи крові в кількості 200 мкл. Для контролю використовують дистильовану воду. Доливають в кожну пробірку по 5 мл розчину «Мікротест-білок» і перемішують. Реакційну суміш залишають при температурі приміщення і через 10-15 хвилин вимірюють поглинання зразків на спектрофотометрі при довжині хвилі 600 нм.

Концентрацію білка у невідомому зразку можна визначити, знаходячи поглинання зразка на стандартному графіку і зчитуючи відповідну концентрацію білка, або можна розрахувати за допомогою наступної формули:

концентрація білка (г/л) = поглинання зразка/поглинання стандартного розчину x концентрація стандартного розчину (г/л).

Побудова калібрувального графіка для визначення білка за допомогою розчину «Мікротест-білок».

Реактиви:

1. Альбумін бичачий, ДФУ 100, Перше видання.
2. Альбуміну людського розчин, ДФУ 1002400, Перше видання.
3. Вода дистильована, ДФУ 1095504, Перше видання.
4. «Мікротест-білок».
5. Хлористий натрій.

Побудова калібрувального графіка:

1. Приготувати 0,9 %-ний розчин хлористого натрію.

2. Приготувати початковий розчин білка (альбумін людський або альбумін бичачий) концентра-

цією 1,5 мг/мл в дистильованій воді або в 0,9 %-ному хлористому натрію.

3. Зробити ряд розведень одержаного розчину за табл. 1.

Таблиця 1

Порядковий номер	1	2	3	4	5	6
Об'єм початкового розчину білка, мл	0,3	1,0	2,0	2,0	2,4	0,1
Об'єм 0,9 % NaCl, мл	2,7	4,0	2,0	1,0	0,6	0

До 5 мл розчину «Мікротест-білок» додати 200 мкл отриманих розчинів. Для контролю - 200 мкл дистильованої води. Перемішати, витримати при температурі приміщення 10-15 хвилин і провести вимірювання.

У табл. 2 наведені основні характеристики методу визначення білка на основі заявленої композиції у порівнянні з прототипом.

Таблиця 2

Основні характеристики методу визначення білка	На основі заявленої композиції	За прототипом
Чутливість, г/л	0,003	0,012
Лінійність, г/л	0,15-1,0	до 1,5
Об'єм проби, мл	0,2	0,02-0,08
Об'єм реактиву, мл	5	1
Кількість калібрів	1	1
Холоста проба по реагенту	+	+
Неохідність фільтрації непрозорих зразків	-	-
Стабільність пофарбування зразків	+	+

Як видно із табл. 2, запропонована композиція має великі переваги, у порівнянні з прототипом. Вона не потребує попереднього концентрування білка, чутливість способу у декілька разів вища, ніж у прототипу, що дозволяє визначати білки у мікрокількостях зразка (200 мкл). Крім того, відому композицію необхідно готувати безпосередньо перед дослідженням, а термін зберігання запропонованої композиції близько року, що скорочує час аналізу.

Запропонована композиція є універсальною та дозволяє визначити наявність та вміст білка у різ-

них біологічних рідинах: крові, сечі, спинномозковій рідині тощо.

Таким чином, здійснення заявленого винаходу дозволяє одержати необхідний технічний результат.

Джерела інформації

1. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. В. В. Меньшикова. - М.: Медицина, 1987. - 368 с.

2. Ким Ю.В., Потехин О.Е., Токар М.И., Шибанов А.Н. Что мы измеряем в моче сульфосалициловым методом? //Лабораторная медицина. - 2003. - №6. С. 94-98.

