



УКРАЇНА

(19) UA (11) 96085 (13) C2

(51) МПК

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

## (54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ БІЛКІВ

1

(21) a201008102

(22) 29.06.2010

(24) 26.09.2011

(46) 26.09.2011, Бюл. № 18, 2011 р.

(72) ЛЕОНЕНКО ІННА ІГОРІВНА, АЛЕКСАНДРОВ  
ДАР'Я ІГОРІВНА, ЄГОРОВА АЛЛА ВОЛОДИМИРІ-  
ВНА, УКРАЇНЕЦЬ ІГОР ВАСИЛЬОВИЧ, АНТОНО-  
ВИЧ ВАЛЕРІЙ ПАВЛОВИЧ(73) ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. О.В. БО-  
ГАТСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК  
УКРАЇНИ(56) Wu X., Zheng J., Guo Ch.Y., Yang J., Ding H.,  
Zh. Hu, Li Chao. Determination of albumins by its  
quenching effect on the fluorescence of Tb<sup>3+</sup>-oxolinic  
acid complex in presence of sodium dodecyl sulphate  
// J. Luminescence. - 2007. - V. 126. - P. 171 - 176  
Kutyrev A., Kappe T. Methanetricarboxylates as key  
reagents for the simple preparation of  
heteroarylcarboxamides with potential biological

2

activity. Part 1. Reaction of methanetricarboxylates  
with indoline and 1,2,3,4-tetrahydroquinoline // J.  
Heterocycl. Chem. 1997, V. 34, № 3, abstract

US 5182214 A 26.01.1993

US 5512493 A 30.04.1996

(57) Спосіб кількісного визначення білків, що пе-  
редбачає приготування проби для аналізу, взає-  
модію її з розчинами хлориду тербію і органічного  
реагенту при заданому рН, опромінювання утво-  
реної системи УФ-світлом та вимірювання інтен-  
сивності люмінесценції реакційного розчину при  
 $\lambda_{\text{еміс}} = 545 \text{ нм}$ , який відрізняється тим, що як ор-  
ганічний реагент використовують розчин 6-[(1-  
гідроксі-3-оксо-6,7-дигідро-3Н,5Н-піридо[3,2,1-  
і]хінолін-2-карбоніл)-аміно]-гексанової кислоти при  
рН 7,5-8,0, а опромінювання проводять УФ-світлом  
при  $\lambda_{\text{збудж}} = 300 \text{ нм}$ .

Винахід належить до аналітичної хімії, зокрема до люмінесцентного визначення біологічно-активних речовин - білків (бичачий сироватковий альбумін - БСА, сироватковий альбумін людини - САЛ, імуноглобулін G - IgG).

Лантанідні комплекси широко вживають як люмінесцентні зонди для визначення органічних сполук (зокрема лікарських препаратів), нуклеїнових кислот та в імунофлуоресцентному аналізі. Люмінесценція у цих комплексах є результатом ефективної внутрішньомолекулярної передачі енергії від органічної частини молекули до іону лантаніду. Основними вимогами до комплексних сполук лантанідів для їх вживання як зондів в біоаналізі є: високий квантовий вихід, висока кінетична стабільність, добра розчинність у воді при оптимальних фізіологічних значеннях рН. Ефективність застосування таких комплексів як аналітичних форм в біоаналітичній хімії обумовлена їх вузькими емісійними смугами, можливістю усунення впливу біологічної матриці на аналітичний сигнал.

Білки, необхідні складові всіх живих організмів, відіграють важливу роль у процесах життєдіяльності, тому їх вивчення та визначення є актуальним.

При опромінюванні світлом білки проявляють власну люмінесценцію. У зв'язку з низькою ефективністю збудження, інтенсивність такої люмінесценції незначна, що не дозволяє використовувати її для високочутливого визначення.

Тому актуальна задача підвищення чутливості визначення білків завдяки застосуванню люмінесцентних зондів (іонів металів, органічних барвників, комплексів металів), люмінесценція котрих значно змінюється при взаємодії з білками (збільшується або гаситься).

Відомий спосіб, який полягає у збільшенні інтенсивності люмінесценції ( $I_{\text{люм}}$ ) комплексу європію з доксицикліном (ДЦ) в лужному буферному розчині (рН = 10,2) при додаванні сироваткового альбуміну людини (див. Jiang C., Luo L. Spectrofluorimetric determination of human serum albumin using a doxycycline - europium probe // Anal. Chim. Acta. - 2004. - V. 506. - P. 171-175.). Спосіб передбачає додавання компонентів у наступній послідовності: іонів  $\text{Eu}^{3+}$  ( $1,6 \times 10^{-6}$  моль/л); ДЦ ( $1,6 \times 10^{-6}$  моль/л); САЛ (0,0-9,2 мкг/мл) та амонійного буферного розчину (рН = 10,2). Далі цю суміш залишають на 40 хвилин і потім реєструють  $I_{\text{люм}}$

(13) C2

(11) 96085

(19) UA

при  $\lambda_{\text{збудж}} = 385 \text{ нм}$  та  $\lambda_{\text{еміс}} = 612 \text{ нм}$ , межа виявлення  $64,0 \text{ нг/мл}$ .

Недоліками даного способу є: залежність люмінесцентного сигналу від часу реагування компонентів системи, що свідчить про недостатню стійкість комплексу, у зв'язку з чим визначення  $I_{\text{люм}}$  необхідно вести при фіксованому часі (40 хвилин), а також використання сильно лужного середовища ( $\text{pH}=10,2$ ), що не є придатним для біоб'єктів, для яких необхідне фізіологічне значення  $\text{pH}$ .

Найбільш близьким є спосіб люмінесцентного визначення сироваткового альбуміну людини (див. Wu X., Zheng J., Guo Ch.Y., Yang J., Ding H., Zh. Hu, Li Chao. Determination of albumins by its quenching effect on the fluorescence of  $\text{Tb}^{3+}$ -oxolinic acid complex in presence of sodium dodecyl sulphate // J. Luminescence. - 2007. - V. 126. - P. 171-176), в якому до розчину хлориду тербію ( $6 \times 10^{-6} \text{ моль/л}$ ) додають розчин оксолінової кислоти (ОК) ( $1 \times 10^{-5} \text{ моль/л}$ ), САЛ ( $0,1\text{--}10,0 \text{ мкг/мл}$ ), додецилсульфат натрію ( $4 \times 10^{-4} \text{ моль/л}$ ), ацетатно-аміачний буферний розчин  $\text{pH}=6,0$ , перемішують, залишають на 25 хвилин, записують люмінесценцію при  $\lambda_{\text{збудж.}} = 360 \text{ нм}$  та  $\lambda_{\text{еміс}} = 545 \text{ нм}$ . Інтенсивність люмінесценції комплексу тербію з ОК зменшується у 3 рази в присутності  $10 \text{ мкг/мл}$  САЛ (це максимальна концентрація з інтервалу лінійності), але тільки у присутності додецилсульфату натрію, котрий теж значно гасить люмінесценцію комплексу (у 2 рази). Межа виявлення САЛ в цьому способі декларована авторами на рівні  $25 \text{ нг/мл}$ . Цей спосіб визначення білків застосовує гасіння люмінесценції зонду (комплексу тербію з ОК) в присутності додецилсульфату натрію при додаванні білків.

Даний спосіб вибрано прототипом: Прототип та спосіб, що заявляється, мають такі спільні ознаки:

- приготування проби;
- взаємодію білка з розчином комплексу хлориду тербію з відповідним органічним реагентом при заданому  $\text{pH}$  водного середовища;
- опромінювання утвореної потрійної системи УФ-світлом;
- вимірювання інтенсивності люмінесценції розчину при  $\lambda_{\text{еміс}} = 545 \text{ нм}$ . Але спосіб за прототипом вимагає використання міцелярного середовища, яке створюють додаванням поверхнево-активної речовини (ПАР) - додецилсульфату натрію (який теж є гасником  $I_{\text{люм}}$  зонду), що призводить до ускладнення системи, а також до необхідності залишати аналізований розчин на 25 хвилин для одержання максимального сигналу ( $I_{\text{люм}}$ ).

В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб кількісного визначення білків за ефектом гасіння люмінесценції комплексної сполуки тербію, в якому шляхом використання нового органічного реагенту забезпечується просте та швидке визначення білків.

Поставлена задача вирішена в способі визначення білків, що передбачає приготування проби для аналізу, взаємодію її з розчинами хлориду тербію і органічного реагенту при заданому  $\text{pH}$ , опромінювання утвореної системи УФ-світлом та вимірювання інтенсивності люмінесценції, тим, що

як органічний реагент використовують 6-[(1-гідрокси-3-оксо-6,7-дигідро-3H,5H-піrido[3,2,1-ij]хінолін-2-карбоніл)-аміно]-гексанову кислоту (L) при  $\text{pH } 7,5\text{--}8,0$ , а опромінювання проводять УФ-світлом при  $\lambda_{\text{збудж.}} = 300 \text{ нм}$ .

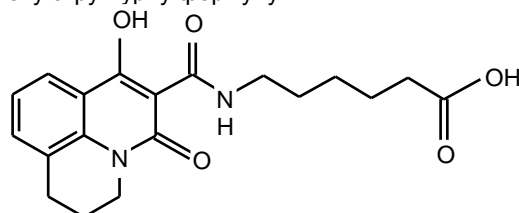
Новим у винаході, що заявляється, є наявність наступних ознак:

- як органічний ліганд використовують 6-[(1-гідрокси-3-оксо-6,7-дигідро-3H,5H-піrido[3,2,1-ij]хінолін-2-карбоніл)-аміно]-гексанову кислоту;
- опромінювання утвореної системи  $\text{Tb(III)}\text{-L}$ -білок УФ-світлом з  $\lambda_{\text{збудж.}} = 300 \text{ нм}$ .

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю суттєвих ознак, що заявляються, і технічним результатом, що досягається, полягає в наступному:

- високий квантовий вихід ( $Q = 0,31$ ) водного розчину комплексної сполуки тербію з наведеним органічним лігандом дозволяє зменшити кількість реагентів та уникнути використання міцелярного середовища;
- зменшити час визначення білків.

Визначення стало можливим завдяки використанню нового люмінесцентного зонду - комплексу тербію з новим лігандом 6-[(1-гідрокси-3-оксо-6,7-дигідро-3H,5H-піrido[3,2,1-ij]хінолін-2-карбоніл)-аміно]-гексановою кислотою (див. Kutyrev A., Kappe T. Methanetricarboxylates as key reagents for the simple preparation of heteroarylcarboxamides with potential biological activity. Part 1. Reaction of methanetricarboxylates with indoline and 1,2,3,4-tetrahydroquinoline // J. Heterocycl. Chem. 1997, V. 34, № 3, P. 969-972). Це можна пояснити наступним. Органічний ліганд належить до похідних 2-оксо-4-гідрокси-хінолінкарбонової кислоти і має таку структурну формулу:



Обробка стандартного розчину солі тербію водним розчином реагенту також, як і у випадку прототипу, посилює люмінесценцію тербію, але без використання ПАР. Цей реагент має в ультрафіолетовій області спектру смуги поглинання з високими молярними коефіцієнтами екстинкції ( $\epsilon_{334} = 5100 \text{ л·моль}^{-1}\text{·см}^{-1}$ ;  $\epsilon_{293} = 19900 \text{ л·моль}^{-1}\text{·см}^{-1}$ ;  $\epsilon_{236} = 49200 \text{ л·моль}^{-1}\text{·см}^{-1}$ ), що обумовлює ефективне поглинання енергії збудження. Ця енергія передається з триплетного рівня ліганду ( $E_T = 22000 \text{ см}^{-1}$ ) на енергетичний рівень Tb ( $E^5D_4 = 20500 \text{ см}^{-1}$ ), що призводить до значного зростання  $I_{\text{люм}}$  тербію.

Взаємодія білків з люмінесцентним зондом - комплексом  $\text{Tb(III)}\text{-L}$  відбувається при  $\text{pH } 4,0\text{--}11,0$ , максимум люмінесценції спостерігається при  $\text{pH } 7,5\text{--}8,0$  (див. Фіг.1, де наведено залежність інтенсивності люмінесценції (відносних одиниць - відн. од.) системи  $\text{Tb-L-BCA}$  від  $\text{pH}$  розчину ( $C_{\text{Tb(III)}} = C_L = 1 \times 10^{-6} \text{ моль/л}$ ;  $C_{\text{бса}} = 5 \text{ мкг/мл}$ )). У запропонованому способі для утворення оптимального  $\text{pH}$  се-

редовища використовується 40 % уротропіновий розчин (pH=8,0).

Максимальний ефект гасіння спостерігається при співвідношенні Tb : L = 1:1, оптимальна концентрація іонів Tb<sup>3+</sup> та реагенту становить 1x10<sup>-6</sup> моль/л (див. Фіг.2, де наведено залежність інтенсивності люмінесценції (відн. од.) системи Tb(III)-L-БСА від концентрацій L (а) та Tb(III) (б) (C<sub>БСА</sub> = 20 мкг/мл)). Необхідний час для реагування компонентів системи Tb(III)-L-БСА та досягнення оптимального аналітичного сигналу становить 5 хвилин. Далі інтенсивність люмінесценції залишається постійною протягом 2 годин (див. Фіг.3, де наведено залежність інтенсивності люмінесценції (відн. од.) системи Tb(III)-L-БСА від часу реагування компонентів (C<sub>Tb</sub> = C<sub>L</sub> = 1·10<sup>-6</sup> моль/л; C<sub>БСА</sub> = 20 мкг/мл)). Гасіння I<sub>люм</sub> тербію в комплексі Tb(III)-L-білок спостерігається при опромінюванні утвореного комплексу УФ-світлом з  $\lambda_{\text{збудж}} = 300 \text{ нм}$  (див. Фіг.4, де наведено спектри люмінесценції комплексу Tb(III)-L в присутності різних концентрацій БСА (а), САЧ (б), IgG (в) (C<sub>Tb</sub> = C<sub>L</sub> = 1·10<sup>-6</sup> моль/л; C<sub>Біл-ка</sub> = 0,1-70,0 мкг/мл)). Інтенсивність люмінесценції тербію в системах Tb(III)-L-білок пропорційна в інтервалі концентрацій БСА - 0,1-40,0 мкг/мл; САЧ - 0,1-40,0 мкг/мл; IgG - 0,1-70,0 мкг/мл (див. Фіг.5, де наведено градувальні графіки у координатах Штерна-Фольмера для визначення БСА (а), САЧ (б), IgG (в) (C<sub>Tb</sub> = C<sub>L</sub> = 1·10<sup>-6</sup> моль/л)).

Також встановлено, що при додаванні різних концентрацій білків час життя збудженого стану іонів тербію не змінюється. Для прикладу наведені криві загасання люмінесценції комплексу Tb(III)-L у присутності різних концентрацій БСА (див. Фіг.6, де наведено криві загасання люмінесценції комплексу Tb(III)-L (C<sub>Tb</sub> = C<sub>L</sub> = 1·10<sup>-6</sup> моль/л) у присутності різних концентрацій БСА (мкг/мл): 1 - 0; 2 - 0,5; 3 - 1,0; 4 - 2,0; 5 - 5,0).

Висунуто припущення щодо змішаного механізму гасіння: статичного, пов'язаного з утворенням систем Tb(III)-L-білок, та динамічного, обумовленого зіткненням молекул зонду та гасників у збудженому стані. При цьому спостерігається характерна в таких випадках особливість графіку Штерна-

Фольмера - відхилення вгору та вгнутість по відношенню до осі у (див. Lakowicz J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, New York:Plenum, 1986).

Приклад.

Визначення проводили на модельних розчинах шляхом введення відомої кількості білків. Кількісне визначення білків проводили за градувальним графіком.

Градувальний графік будують наступним чином: у мірні колби місткістю 10 мл вносять по 0,01; 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50; 0,60; 0,70; 0,80; 0,90; 1,00; 1,20; 1,30; 1,50; 1,80; 2,00; 2,50; 3,00; 3,50; 4,00; 5,00; 6,00; 6,50; 7,00 мл робочого розчину БСА (САЛ, IgG) (100 мкг/мл) (5 паралельних вимірів). В кожен колбу додають по 1,0 мл 1x10<sup>-5</sup> моль/л розчину хлориду тербію, 1,0 мл 1 x 10<sup>-5</sup> моль/л розчину L, 0,4 мл 40 %-ного розчину уротропіну. Доводять водою до 10,0 мл та перемішують. Паралельно готують розчин контрольної проби, який містить усі компоненти, крім білків. Через 5 хв. вимірюють інтенсивність люмінесценції за  $\lambda_{\text{еміс}} = 545 \text{ нм}$  ( $\lambda_{\text{збудж}} = 300 \text{ нм}$ ) у кожній точці (I) та інтенсивність люмінесценції контрольної проби (I<sub>0</sub>).

За допомогою одержаних результатів будують градувальний графік залежності I<sub>0</sub>/I від концентрації білків (мкг/мл) у координатах Штерна-Фольмера (див. Фіг. 4, а,б,в) в інтервалі концентрацій білків 0,1-70,0 мкг/мл.

Методика

У мірні колби місткістю 10 мл вносять по 1,0 мл робочих розчинів хлоридів калію, натрію, кальцію та глюкози (1x10<sup>-4</sup> моль/л); по 0,5 мл робочого розчину L-аланіну (1·10<sup>-4</sup> моль/л), додають по 0,5; 2,0; 5,0 мл робочого розчину БСА (САЛ, IgG) (100 мкг/мл) (5 паралельних вимірів). Далі додають усі реактиви та проводять вимірювання як у випадку градувального графіка.

Результати визначення білків в модельних розчинах представлено в таблиці.

Таблиця

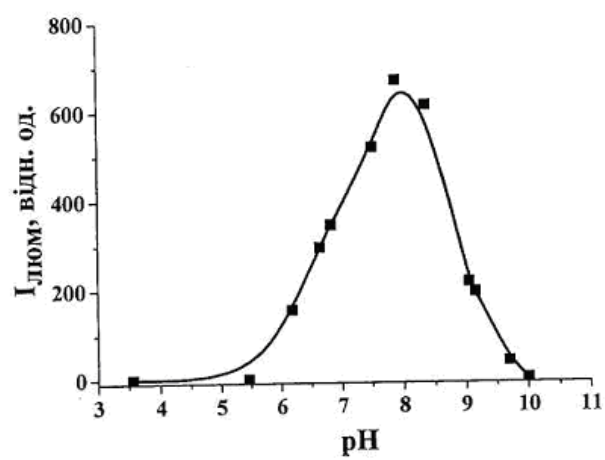
Результати визначення білків методом "введено - знайдено" (n=5; P=0,95)

Білок	Сторонні речовини	Введено білка, мкг/мл	Знайдено білка, мкг/мл	S <sub>r</sub>
БСА	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , глюкоза, L-аланін	5,0	5,2±0,3	0,048
		20,0	19,4±0,5	0,022
САЛ	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , глюкоза, L-аланін	5,0	4,9±0,3	0,046
		50,0	50,6±1,4	0,023
IgG	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , глюкоза, L-аланін	5,0	5,2±0,3	0,049
		20,0	20,6±0,5	0,019

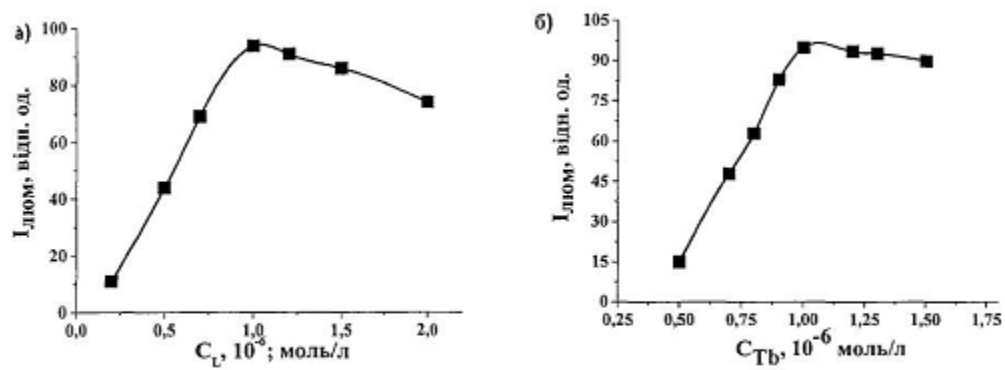
C<sub>Me</sub><sup>n+</sup> = 1x10<sup>-5</sup> моль/л; C<sub>Глюкоза</sub> = 1x10<sup>-5</sup> моль/л; C<sub>L-Аланін</sub> = 5 x10<sup>-6</sup> моль/л

Точність і правильність визначення білків у розчинах перевірені методом "введено - знайдено". При n=5; P=0,95 відносне стандартне відхилення (s<sub>r</sub>) складає 0,019-0,049.

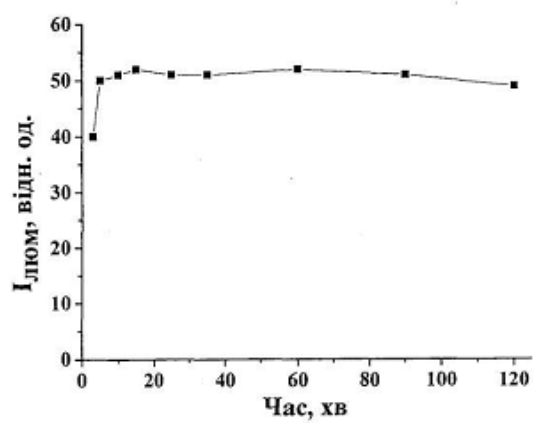
Таким чином, спосіб, що заявляється, дозволяє забезпечити достатню чутливість та збіжність визначення білків та прискорити проведення аналізу у 4-5 разів.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

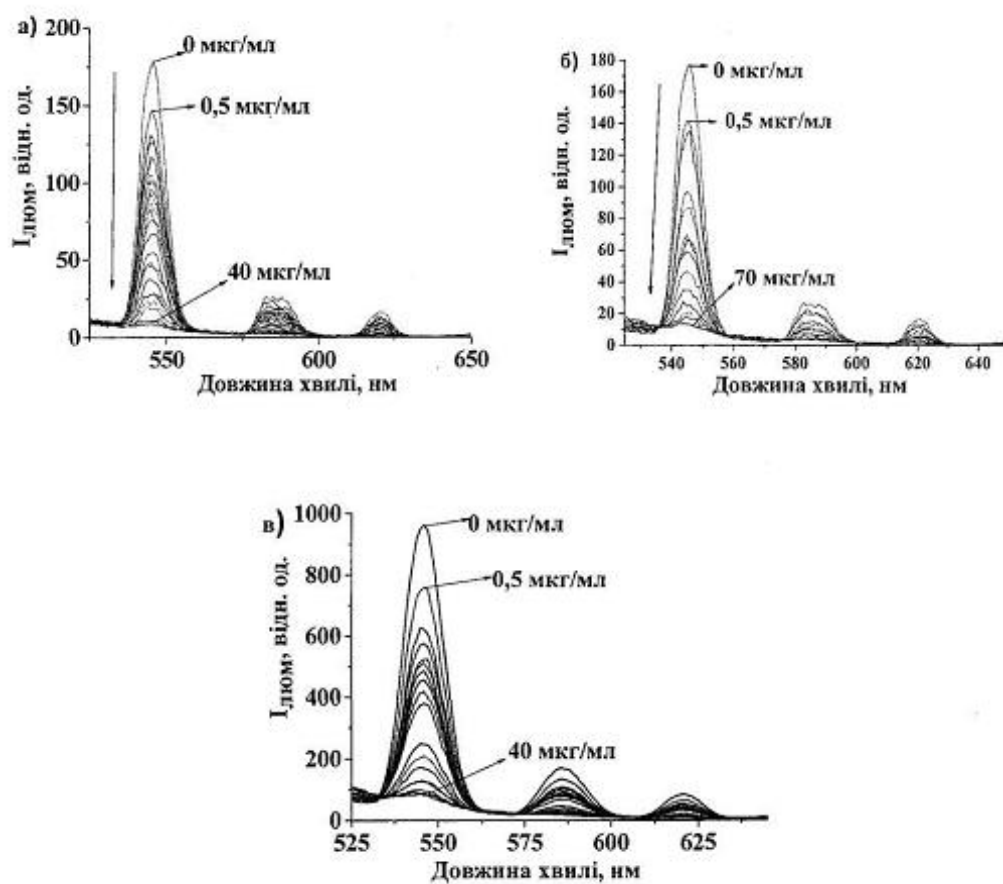
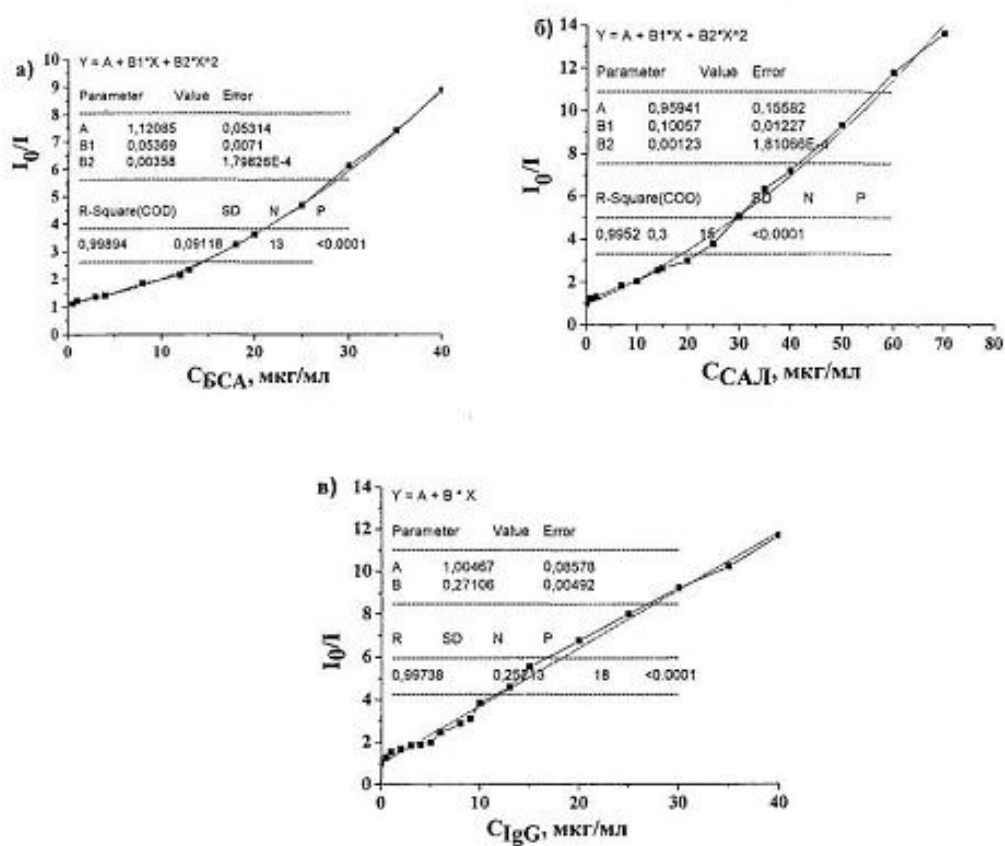
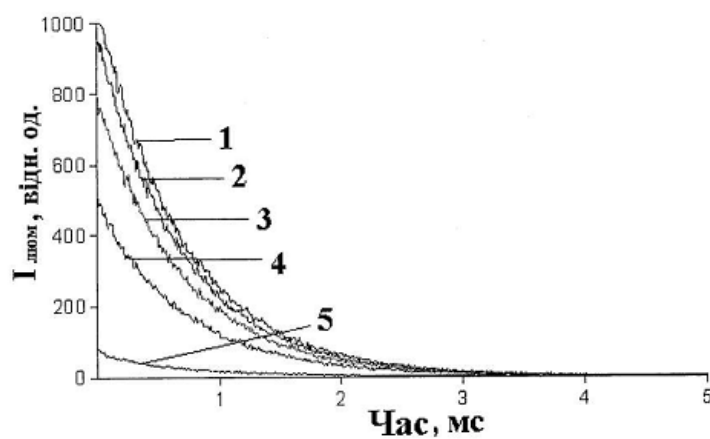


Fig. 4



Фиг. 5



Фиг. 6