



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **102332** (13) **C2**
(51) МПК**G01N 21/64** (2006.01)**G01N 33/48** (2006.01)**G01N 33/72** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: а 2012 04271	(72) Винахідник(и): Леоненко Інна Ігорівна (UA), Александрова Дар'я Ігорівна (UA), Сгорова Алла Володимирівна (UA), Українець Ігор Васильович (UA), Антонович Валерій Павлович (UA)
(22) Дата подання заявки: 06.04.2012	(73) Власник(и): ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. О.В. БОГАТСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Люстдорфська дорога, 86, м. Одеса, 65080 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.06.2013	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 5882934, 16.03.1999, A Xiao-Feng Yang, Xiang-Qun Guo, Hua Li. Fluorimetric determination of hemoglobin using spiro form rhodamine B hydrazide in a micellar medium // Talanta.-2003. - V. 61. - P. 439-445. Shihui Qin. New fluorimetric determination of hemoglobin used as a substitute of mimetic peroxidase // Annali di Chimica.-2007. - V. 97. - P. 59-67. Маккавеева Е. В., Пахомов П. М. Применение метода УФ спектроскопии для определения концентрации гемоглобина в крови человека. Проблемы теоретической и экспериментальной химии: Тезисы докладов 14 Российской студенческой научной конференции, посвященной 80-летию со дня рождения профессора В. Ф. Барковского, Екатеринбург, 20-23 апр., 2004, С. 222-223. Маккавеева Е. В., Донец А. А., Перескокова Л. С., Мельникова Е. В., Пахомов П. М. Применение метода УФ спектроскопии для изучения гемоглобина крови. Физ.-хим. полимеров. - 2001. - N 7. - С. 149-151.
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.12.2012, Бюл.№ 23	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.06.2013, Бюл.№ 12	

(54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ГЕМОГЛОБІНУ**(57) Реферат:**

Винахід належить до аналітичної хімії, зокрема до люмінесцентного визначення біологічно-активної речовини - гемоглобіну, що включає розчин проби та вимірювання її інтенсивності люмінесценції при $\lambda_{\text{еміс}} = 545$ нм, при цьому як люмінесцентний зонд використовують розчин комплексної сполуки тербію(III) з 1-етил-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонової

UA 102332 C2

кислоти (4-метил-піридин-2-іл)-амідом при рН 8.0, опромінювання проводять УФ-світлом при $\lambda_{\text{збудж}}=317\text{нм}$.

Винахід належить до аналітичної хімії, а саме до люмінесцентного визначення біоактивної речовини гемоглобіну (Гем).

Гемоглобін - складний залізовмісний білок еритроцитів тварин і людини, здатний оборотно зв'язуватися з киснем, забезпечуючи його перенесення до тканин. Головна функція гемоглобіну полягає в транспорті дихальних газів.

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

Тому для флуоресцентного аналізу актуальна задача підвищення чутливості визначення гемоглобіну завдяки застосуванню люмінесцентних зондів, емісія котрих значно змінюється в присутності гемоглобіну (збільшується або гаситься).

Лантанідні комплекси широко вживають для визначення біоактивних речовин (білків, ферментів, нуклеїнових кислот, лікарських препаратів та ін.). 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 pH.

Відомий спосіб визначення гемоглобіну, який полягає у реакції гідразиду родаміну В з гемоглобіном у мицелярному середовищі, що призводить до появи родаміну В та збільшенню інтенсивності люмінесценції ($I_{\text{люм}}$) [див. Xiao-Feng Yang, Xiang-Qun Guo, Hua Li. Fluorimetric determination of hemoglobin using spiro form rhodamine B hydrazide in a micellar medium // Talanta.- 2003. - V. 61. - P. 439-445.]. Спосіб передбачає додавання компонентів у наступній послідовності: 1.5 мл розчину гідразиду родаміну В (1.0×10^{-5} моль/л); 0.8 мл розчину додецилбензолсульфонату натрію (5.0×10^{-3} моль/л); Гем (0.2-12.0 нмоль/л) та 2.0 мл цитратно-фосфатного буферного розчину (pH = 5.0). Далі цю суміш залишають на 5 хвилин і потім додають 4.0 мл фосфатного буферного розчину (pH = 8.0), доводять до 10.0 мл водою та реєструють $I_{\text{люм}}$ при $\lambda_{\text{збудж}} = 556$ нм та $\lambda_{\text{еміс}} = 574$ нм, межа виявлення Гем 0.086 нмоль/л.

Недоліками даного способу є: залежність люмінесцентного сигналу від наявності мицелярного середовища, у зв'язку з чим визначення $I_{\text{люм}}$ необхідно проводити тільки у присутності додецилбензолсульфонату натрію, а також використання двох буферних розчинів (pH=5.0 та pH=8.0), що ускладнює аналіз.

Найбільш близьким є спосіб люмінесцентного визначення гемоглобіну [див. Shihui Qin. New fluorimetric determination of hemoglobin used as a substitute of mimetic peroxidase // Annali di Chimica.-2007. - V. 97. - P. 59-67], в якому до 0.1 мл розчину 4,4',4'',4'''-тетразаміщеного амінофталоціаніну алюмінію (1×10^{-4} моль/л) додають розчин гемоглобіну (5.0×10^{-11} - 1.2×10^{-8} моль/л), 0.1 мл розчину пероксиду водню (1×10^{-2} моль/л), 1.0 мл фосфатного буферного розчину pH=11.4, перемішують, залишають на 40 хвилин, далі додають 1.0 мл розчину хлористоводневої кислоти (0.1 моль/л), доводять до 10.0 мл водою та записують люмінесценцію при $\lambda_{\text{збудж}} = 606$ нм та $\lambda_{\text{еміс}} = 673$ нм. Інтенсивність люмінесценції комплексу органічного барвника значно зменшується. Цей спосіб визначення гемоглобіну застосовує гасіння люмінесценції зонда (4,4',4'',4'''- тетразаміщеного амінофталоціаніну алюмінію), яке є наслідком його каталітичного окиснення перексидом водню в присутності гемоглобіну.

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

- приготування проби;
- встановлення заданого pH водного середовища;
- опромінювання утвореної системи світлом;
- вимірювання гасіння інтенсивності люмінесценції розчину.

Але спосіб за прототипом вимагає використання каталітичного окиснення перексидом водню органічного барвника (гемоглобін виступає у ролі каталізатора), тобто визначення гемоглобіну є посереднім, що призводить до необхідності залишати аналізуємий розчин на 40 хвилин для проведення каталітичної реакції. У прототипі використовують фосфатний буферний розчин із значенням pH=11.4, що значно перевищує pH біуринин.

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

Поставлена задача вирішена в способі визначення гемоглобіну, що передбачає приготування проби для аналізу, взаємодію її з розчином люмінесцентного зонда при заданому pH, опромінювання утвореної системи УФ-світлом та вимірювання інтенсивності люмінесценції, тим, що як люмінесцентний зонд використовують комплексну сполуку тербію(Ш) з 1-етил-4-

гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонової кислоти (4-метил-піридин-2-іл)-амідом (L) при pH 8.0, опромінювання проводять УФ-світлом при $\lambda_{зб\ddot{u}дж} = 317$ нм та вимірювання інтенсивності люмінесценції при $\lambda_{еміс} = 545$ нм.

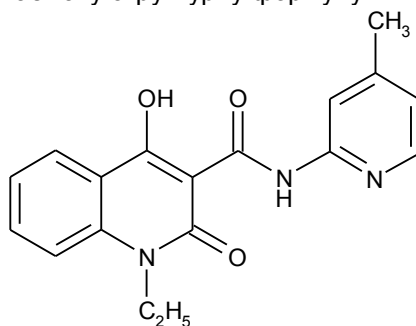
Новим у винаході, що заявляється, є наявність наступних ознак:

- 5 - як люмінесцентний зонд використовують комплексну сполуку тербію(Ш), з 1 -етил-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3 -карбонової кислоти (4-метил-піридин-2-іл)-амідом;
- опромінювання утвореної системи Tb(III)-L-гемоглобін проводять УФ-світлом при $\lambda_{зб\ddot{u}дж} = 317$ нм та вимірювання інтенсивності люмінесценції при $\lambda_{еміс} = 545$ нм;
- застосування уротропінового буферного розчину.

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

- зменшення часу визначення гемоглобіну;
- уротропіновий буферний розчин з рН=8.0 дозволяє проводити визначення в біоридинах.

- 15 Визначення стало можливим завдяки використанню нового люмінесцентного зонда - комплексу тербію(Ш) з новим лігандом 1-етил-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3 -карбонової кислоти (4-метил-піридин-2-іл)-амідом [див. Українець І. В., Ель Каянь С. А., Горохова О. В., Сидоренко Л. В. Синтез та протитуберкульозна активність метилзаміщених піридил-2-амідів 1-Бі-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот // Фарм. журн.-2004, № 4, С. 47-53]. Це можна пояснити наступним. Органічний ліганд належить до похідних піридиновмісних амідів оксохінолінкарбонової кислоти і має таку структурну формулу:
- 20



- Обробка розчину солі тербію(III) водним розчином реагенту посилює люмінесценцію Tb(III). Цей реагент має в ультрафіолетовій області спектра смугу поглинання з високим молярним коефіцієнтом екстинкції ($\epsilon_{313}=24900$ л·моль⁻¹·см⁻¹), що обумовлює ефективне поглинання енергії збудження. Ця енергія передається з триплетного рівня ліганду ($E_T = 22220$ см⁻¹) на енергетичний рівень Tb³⁺ ($E^5D_4=20500$ см⁻¹), що призводить до значного зростання $I_{\text{люм}}$ тербію.
- 25

- Взаємодія гемоглобіну з люмінесцентним зондом-комплексом Tb(III)- L відбувається при pH 4.5-10.0, максимум люмінесценції спостерігається при pH 7.5-8.5 (див. Фіг.1, де наведено залежність інтенсивності люмінесценції (відн. од.) системи Tb-L-Гем від pH розчину ($C_{\text{Tb(III)}} = C_L=1 \times 10^{-6}$ моль/л; $C_{\text{Гем}} = 20$ мкг/мл)). У запропонованому способі для утворення оптимального pH середовища використовується 40 % уротропіновий розчин (pH=8.0).
- 30

- Максимальний ефект гасіння спостерігається при співвідношенні Tb: L=1:1, оптимальна концентрація іонів Tb³⁺ та реагенту становить 1×10^{-6} моль/л (див. Фіг.2, де наведено залежність інтенсивності люмінесценції (відн. од.) системи Tb(III)-b-Гем від концентрацій L (а) та Tb(III) (б) ($C_{\text{Гем}} = 20$ мкг/мл)). Гасіння $I_{\text{люм}}$ тербію в комплексі Tb(III)-L-Гем спостерігається при опромінюванні утвореного комплексу УФ-світлом з $\lambda_{зб\ddot{u}дж} - 317$ нм (див. Фіг.3, де наведено спектри люмінесценції комплексу Tb(III)-L в присутності різних концентрацій гемоглобіну ($C_{\text{Tb}}=C_L=1 \times 10^{-6}$ моль/л; $C_{\text{Гем}}=0.6-36.0$ мкг/мл)).
- 35

- Інтенсивність люмінесценції тербію в системі Tb(III)-L-Гем пропорційна в інтервалі концентрацій гемоглобіну - 0.6-36.0 мкг/мл (див. Фіг.4, де наведено залежність інтенсивності люмінесценції комплексу Tb(III)-L від концентрації Гем (а) і градувальний графік у координатах Штерна-Фольмера для визначення Гем (б) ($C_{\text{Tb}}=C_L=1 \times 10^{-6}$ моль/л)).
- 40

- Процес гасіння 4f-люмінесценції комплексу Tb(III)-L гемоглобіном можна пояснити передачею енергії від Tb(III)-L (донора) на Гем (акцептор). Про резонансний перенос енергії електронного збудження (FRET) в цьому випадку свідчить перекривання спектра поглинання гемоглобіну із спектром люмінесценції комплексу Tb(III)-L.
- 45

Час життя люмінесценції комплексу Tb(III)-L в присутності різних концентрацій Гем суттєво змінюється (див. Фіг.5, де наведено криві затухання 4f-люмінесценції комплексу Tb(III)-L в присутності різних концентрацій гемоглобіну ($C_{\text{Tb}}=C_L=1 \times 10^{-6}$ моль/л)).

Значення ферстеровського радіуса ($R_0=47 \text{ \AA}$) та інтегралу перекривання ($\int_{\text{Over}} = 2.9 \cdot 10^{13} \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1} \text{ нм}^4$) спектра люмінесценції Tb(III)-L зі спектром поглинання Гем розраховано в програмі SetaFret з урахуванням розподілення квантової інтенсивності випромінювання в спектрі люмінесценції донору і молярного коефіцієнта поглинання акцептора.

Значення інтегралу перекривання та ферстеровського радіуса дозволяють характеризувати гемоглобін, як ефективний гасник 4f-люмінесценції іонів Tb(III). Приклад.

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

За допомогою одержаних результатів будують градувальний графік залежності I_0/I від концентрації гемоглобіну (мкг/мл) у координатах Штерна-Фольмера (див. Фіг. 4) в інтервалі концентрацій білків 0.6-36.0 мкг/мл.

Градувальний графік будують наступним чином: у мірні колби місткістю 10 мл вносять по 0.05; 0.10; 0.20; 0.30; 0.40; 0.50; 0.60; 0.90; 1.50; 2.00; 3.00 мл робочого розчину Гем (120 мкг/мл) (5 паралельних вимірів). В кожну колбу додають по 1.0 мл 1×10^{-5} моль/л розчину хлориду тербію, 1.0 мл 1×10^{-5} 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 $\lambda_{\text{еміс}} = 545 \text{ нм}$ ($\lambda_{\text{збудж}} = 317 \text{ нм}$) у кожній точці (I) та інтенсивність люмінесценції контрольної проби (I_0).

Визначення гемоглобіну в зразках крові.

Методика.

Робочий розчин крові. 0.5 мл зразка крові вносили в мірну колбу місткістю 50.0 мл, доводили об'єм розчину водою до мітки і перемішували. 5.0 мл отриманого розчину поміщали в мірну колбу місткістю 50.0 мл, доводили об'єм розчину водою до мітки і перемішували.

У мірні колби об'ємом 10 мл вносили по 2.0 мл робочого розчину крові (5 паралельних вимірювань). У кожну колбу додавали по 1.0 мл 1×10^{-5} моль/л розчину хлориду тербію, 1.0 мл 1×10^{-5} моль/л розчину L та 0.4 мл 40 %-ного розчину уротропіну. Паралельно готували розчин контрольної проби, який містить всі компоненти, окрім робочого розчину крові. Розчини доводили до 10.0 мл водою і перемішували. Через 5 хвилин вимірювали $I_{\text{люм}}$ при $\lambda_{\text{еміс}} = 545 \text{ нм}$ ($\lambda_{\text{збудж}} = 317 \text{ нм}$).

Концентрацію гемоглобіну в зразках крові встановили по градувальному графіку (з урахуванням розведення).

Правильність люмінесцентної методики перевірена зіставленням отриманих результатів визначення гемоглобіну в зразках крові (таблиця) з даними, отриманими фотоколориметричним геміглобінціанідним методом [див. СМ. Льюїс, Б. Бэйн, И. Бэйтс //Практическая и лабораторная гематология / пер. с англ. под ред. А.Г. Румянцева. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009.-672 с.].

Таблиця

Результати визначення гемоглобіну методом "введено-знайдено" в зразках і крові (n=5, P = 0.95)

№ зразка	Люмінесцентний метод	Sr	Геміглобінціанідний метод	Sr
	Знайдено гемоглобіну, г/л		Знайдено гемоглобіну, г/л	
№1	145±8	0.046	139±7	0.041
№2	122±6	0.037	126±5	0.032

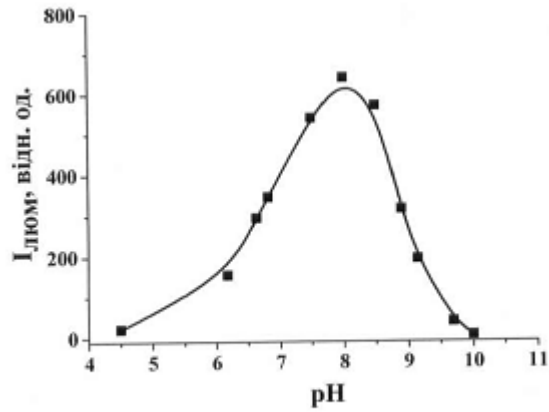
Отримані дані указують на задовільне узгодження результатів, отриманих двома різними методами.

На підставі отриманих даних можна зробити висновок про те, що введення в систему Tb(III)-L гемоглобіну приводить до значного гасіння $I_{\text{люм}}$ тербію(III), що дозволяє використовувати вказаний комплекс як аналітичну форму для визначення Гем.

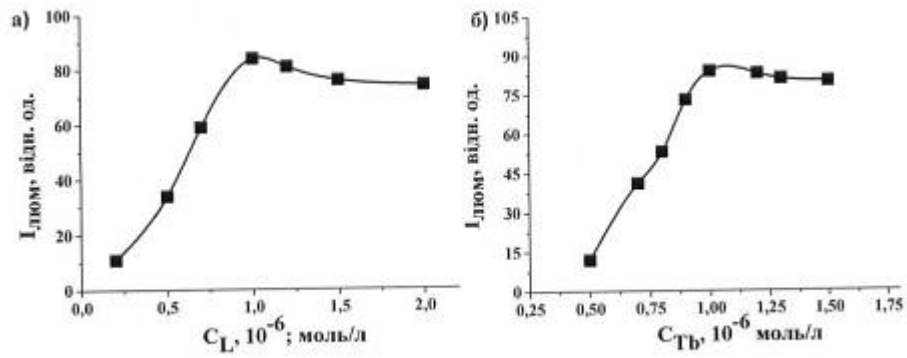
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб кількісного визначення гемоглобіну, що включає одержання проби для аналізу, проведення взаємодії з розчином люмінесцентного зонда при заданому рН, опромінення одержаної системи УФ-світлом та вимірювання інтенсивності люмінесценції реакційного розчину, який **відрізняється** тим, що як люмінесцентний зонд використовують розчин комплексної сполуки тербію(III) з 1-етил-4-гідроксі-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонової

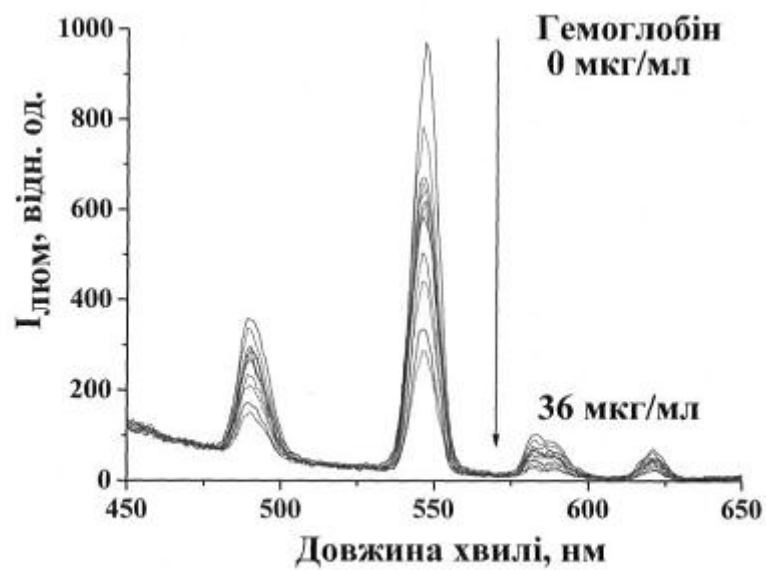
кислоти (4-метил-піридин-2-іл)-амідом при рН 8,0, опромінення проводять УФ-світлом при $\lambda_{\text{збудж}}=317$ нм та вимірювання інтенсивності люмінесценції при $\lambda_{\text{еміс}}=545$ нм.



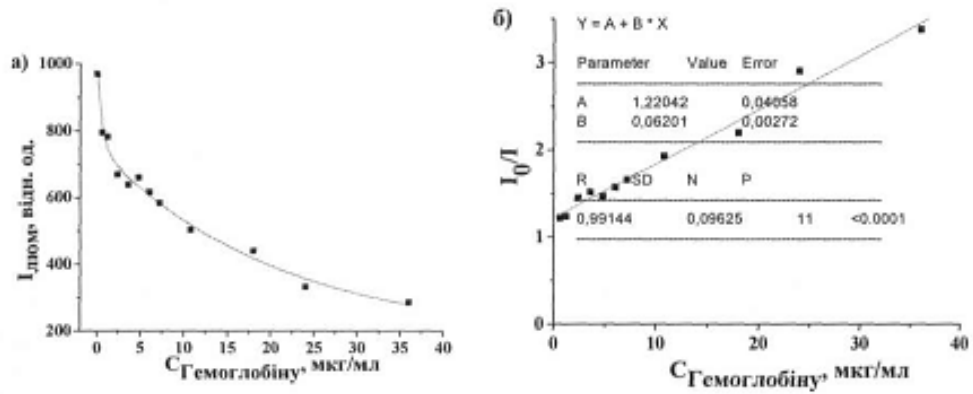
Фиг. 1



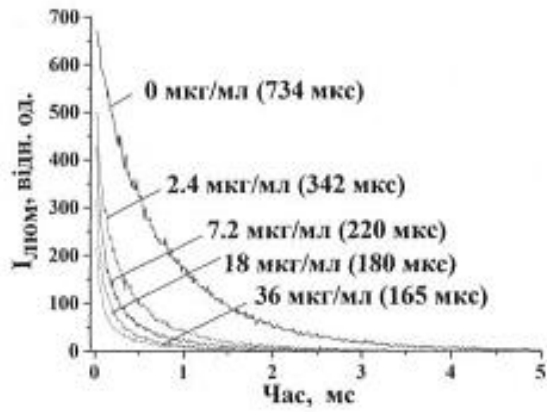
Фиг. 2



Фиг. 3



Фіг. 4



Фіг. 5