



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **90331** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
G01J 1/00
G01J 1/50 (2006.01)
G01J 1/34 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 13677	(72) Винахідник(и): Гороховський Єгор Юрійович (UA)
(22) Дата подання заявки: 25.11.2013	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД "ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ" МІНІСТЕРСТВА ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ,
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 26.05.2014	вул. Жуковського, 66, м. Запоріжжя, 69600 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.05.2014, Бюл.№ 10	

(54) СПОСІБ КОЛОРИМЕТРИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ РЕЧОВИН

(57) Реферат:

Спосіб колориметричного визначення концентрації речовин включає виготовлення серії стандартних розведень аналіту; відбір дослідних зразків розчину речовини, що аналізують; додавання до зразку та серії стандартних розведень аналіту хромогенного аналітичного реагенту, внесення забарвленої сполуки за допомогою автоматичного дозатора до лунок імунологічного планшета; отримання цифрового зображення імунологічного планшета за допомогою сканера; визначення кольорового каналу цифрових зображень зразків, значення інтенсивності якого змінюється найбільше; визначення абсорбції світла кожного зразка в цьому каналі; побудова калібрувального графіку залежності абсорбції світла зразком в вибраному кольоровому каналі від концентрації аналіту в серії стандартних розведень; визначення концентрації аналіту в зразку за цим графіком. Отримання цифрового зображення імунологічного планшета здійснюють у режимі абсолютної колориметрії, із вимкненою автоматичною корекцією кольору, з компенсацією чорної точки в кольоровій моделі RGB із розрядністю 48 біт та зберігають нестиснене зображення на цифровому носії у форматі TIFF.

UA 90331 U

Спосіб належить до біології та медицини та стосується колориметричного визначення концентрації органічних або неорганічних речовин методом відбивної сканометрії та дозволяє встановлювати їх концентрацію і може бути використаний у навчальних та науково-дослідних лабораторіях, а також у телемедицині.

Відомі фотометричні методи визначення концентрації речовин є стандартними лабораторними процедурами. Найчастіше для даного типу досліджень використовують фотоколориметри та спектрофотометри. Серед них найбільш доступними є фотоколориметри, але цій групі приладів притаманні суттєві недоліки: обмежений дискретний спектральний діапазон, зумовлений використанням набору стандартних світлофільтрів, досить низька чутливість та необхідність використання великої кількості реагентів для стандартних кювет (2-4мл).

Спектрофотометри позбавлені вищевказаних недоліків. Однак для визначення концентрації також потрібні досить великі об'єми реагентів (1-2 мл). Крім цього відсутня можливість одночасного визначення концентрації речовини у великій кількості досліджуваних зразків, що, наприклад, у разі дослідження активності ензимів, може впливати на результат, оскільки за даних умов важко дотриматись однакового часу реакції для всіх зразків.

Цих недоліків позбавлені сучасні мікропланшетні фотометри: об'єм проби при використанні цих приладів може бути зменшений до 5-200 мкл, а ферментативна реакція активується одночасно у великій кількості проб (від 6 до 1536 зразків) за допомогою багатоканальної піпетки, що значно покращує відтворюваність результатів і дозволяє суттєво зменшити об'єм реактивів, необхідних для проведення аналізу. Але використання цих приладів обмежено їх високою вартістю. Крім цього можливості аналізу та обробки даних мікропланшетних фотометрів жорстко визначені внутрішньою програмою мікропроцесорного модуля.

Широке розповсюдження цифрових пристроїв для реєстрації зображень та програмного забезпечення для його обробки дозволяє використовувати їх для проведення широкого кола лабораторних досліджень. Використання персональних комп'ютерів дозволяє дуже гнучко підходити до аналізу та обробки отриманих шляхом сканометрії даних.

Відомий спосіб колориметричного визначення концентрації заліза та залишків хлору у воді за допомогою цифрового аналізу зображень [Suzuki Y. Tristimulus Colorimetry Using a Digital Still Camera and Its Application to Determination of Iron and Residual Chlorine in Water Samples / Y. Suzuki, M. Endo, J. Jin [et al.] // Analytical Sciences.-2006. - V. 22. - P. 411-414], який включає приготування серії стандартних розведень аналіту (речовини, що визначають) та відбір зразків, додавання хромогенного реагенту до зразків та серії стандартних розведень аналізу, в результаті хімічної реакції з яким аналіт утворює забарвлену сполуку, інтенсивність забарвлення якої залежить від концентрації аналіту в зразку, фотографування пробірок із реакційною сумішшю (до 7-ми біологічних пробірок або 4-х стандартних кювет) за допомогою цифрової фотокамери, переведення отриманого цифрового зображення з кольорової моделі RGB до кольорової моделі CIE $L^*a^*b^*$, побудову калібрувального графіка по одному з каналів (L^* , a^* або b^*) та визначення концентрації речовини за допомогою цього графіка.

Недоліками аналога є обмежена кількість зразків, що можуть одночасно аналізуватись, відбивання світла скляною поверхнею пробірок та кювет, що впливає на якість отриманого цифрового зображення, велика кількість реагентів, необхідних для проведення аналізу та переведення кольорової моделі зображення з моделі RGB до моделі CIE $L^*a^*b^*$, яка, по-перше ґрунтується не на кольорових каналах, а на складових кольору (яскравість, зелено-червона та синьо-жовта складові), що ускладнює інтерпретацію результатів, а по-друге, не дозволяє використовувати стандартний для фотоколориметрії показник абсорбції світла дослідним зразком.

Ознаками, спільними з корисною моделлю, що заявляється, є: приготування серії стандартних розведень аналіту, відбір зразків, додавання хромогенного реагенту до серії стандартних розведень аналіту та досліджуваних зразків, отримання їх цифрових зображень, оцінка інтенсивності забарвлення, визначення концентрації аналіту в зразках за допомогою колориметричного аналізу цифрового зображення.

Найбільш близьким за суттю та досягнутим результатом є спосіб [Fujita N. Folin-Chiocalteu colorimetric analysis using a scanner for rapid determination of total polyphenol content in many test samples / N. Fujita, Y. Saito, Y. Nitto [et al.] // Studies in Science and Technology.-2012. - V. 1, № 2. - P. 139-144], який включає виготовлення серії стандартних розведень аналіту; відбір зразків розчину речовини, що аналізують; додавання хромогенного реагенту до серії стандартних розведень аналіту та досліджуваних зразків; перенесення їх у акрилову мікроплату із 40-ма лунками; сканування 24-х бітного кольорового зображення за допомогою планшетного сканера у кольоровій моделі RGB; розрахунок значень інтенсивності кольорових каналів за формулою:

$$\Delta I_x = I_{x \max} - I_{x \min} \quad (1)$$

де:

ΔI_x - діапазон змін інтенсивності кольору для каналу X (R, G, B), умовні одиниці;

$I_{x \max}$ - максимальне значення інтенсивності кольору, умовні одиниці;

5 $I_{x \min}$ - мінімальне значення інтенсивності кольору, умовні одиниці;

та вибір каналу, інтенсивність якого змінюється у найбільшому діапазоні; розрахунок абсорбції світла в обраному кольоровому каналі зразка за формулою:

$$A_{\text{зразка}} = \log_{10} \frac{I_{\text{зразка}}}{I_{\text{бланка}}}, \quad (2)$$

де:

10 $A_{\text{зразка}}$ - абсорбція світла зразком, безрозмірна величина;

$I_{\text{зразка}}$ - інтенсивність кольору бланку в вибраному кольоровому каналі, умовні одиниці;

$I_{\text{бланка}}$ - інтенсивність кольору зразка за вибраним кольоровим каналом, умовні одиниці;

побудову калібрувального графіку залежності абсорбції світла досліджуваного зразку від концентрації аналіту в серії стандартних розведень та визначення за цим показником його

15 концентрації.

Найбільш суттєвим недоліком цього способу є те, що він заснований на аналізі 24-х бітного кольорового зображення (розрядність кожного кольорового каналу дорівнює 8-ми бітам). У такому випадку кількість можливих градацій кожного кольору (червоного, зеленого та синього) дорівнює 255, а загальна кількість кольорів, які можуть бути відтворені на цифрових зображеннях, дорівнює 255^3 (16581375). За реальних умов дослідження, при значенні менше

20 125 умовних одиниць будь-якого кольорового каналу, колір переходить спочатку до сірого, а потім до чорного, що обмежує роздільну здатність методу при цій розрядності зображення і суттєво зменшує чутливість способу.

Для визначення концентрації аналіту у цьому способі використані стандартні налаштування сканера, які зазвичай призначені для сканування звичайних для цього пристрою об'єктів - фотографій, текстів тощо; але для сканування плівок, об'ємних непрозорих об'єктів та ін. необхідний підбір параметрів пристрою для отримання достатньої якості зображення об'єкту.

Ознаками, спільними із найближчим аналогом є:

25 - виготовлення серії стандартних розведень аналіту;

30 - відбір зразків розчину речовини, що аналізують;

- додавання до зразка та серії стандартних розведень аналіту хромогенного аналітичного реагенту;

- внесення забарвленої сполуки за допомогою автоматичного дозатора до лунок імунологічного планшета;

35 - отримання цифрового зображення імунологічного планшета за допомогою планшетного сканера;

- визначення кольорового каналу цифрових зображень зразків, значення інтенсивності якого змінюється найбільше;

- визначення абсорбції світла кожного зразка в вибраному кольоровому каналі;

40 - побудова калібрувального графіка залежності абсорбції світла в вибраному кольоровому каналі від концентрації аналіту в серії стандартних розведень;

- визначення концентрації аналіту в зразку за калібрувальним графіком залежності абсорбції світла зразком в вибраному кольоровому каналі від концентрації аналіту.

В основу корисної моделі поставлена задача розробки способу колориметричного визначення концентрації речовин, який шляхом одночасного аналізу великої кількості досліджуваних зразків та визначення абсорбції світла зразків дозволяє використовувати його у широкому колі лабораторій на доступному обладнанні, має добру чутливість та відтворюваність, високу роздільну здатність для широкого кола органічних та неорганічних речовин, і не потребує перепрограмування приладу при зміні типу досліджуваних зразків. Для встановлення концентрації речовин у розчинах запропонованим способом необхідна лише наявність сканера і персонального комп'ютера. Усе програмне забезпечення, що використовують для аналізу, є таким, що безкоштовно розповсюджується і доступне для вільного завантаження з мережі Інтернет.

50

Суттєвими ознаками способу є:

- виготовлення серії стандартних розведень аналіту;
- відбір зразків розчину речовини, що аналізують;
- додавання до зразків та серії стандартних розведень аналіту хромогенного аналітичного реагенту, здатного утворювати забарвлену сполуку із аналітом;
- внесення забарвленої сполуки за допомогою автоматичного дозатора у лунки імунологічного планшета;
- отримання цифрового зображення імунологічного планшета за допомогою сканера в режимі абсолютної колориметрії, із вимкненою автоматичною корекцією кольору, з компенсацією чорної точки у кольоровій моделі RGB із розрядністю 48 біт;
- збереження отриманого нестисненого зображення на цифровому носії у форматі TIFF;
- визначення кольорового каналу цифрових зображень зразків, значення інтенсивності якого змінюється найбільше;
- розрахунок абсорбції світла кожного зразка в вибраному кольоровому каналі;
- побудова калібрувального графіка залежності абсорбції світла зразком в вибраному кольоровому каналі від концентрації аналіту в серії стандартних розведень;
- визначення концентрації аналіту в зразку за цим калібрувальним графіком.

Відмінними від найближчого аналога ознаками способу є те, що:

- отримання цифрового зображення імунологічного планшета здійснюють у режимі абсолютної колориметрії, із вимкненою автоматичною корекцією кольору, з компенсацією чорної точки у кольоровій моделі RGB із розрядністю 48 біт;
- зберігають отримане нестиснене зображення на цифровому носії у форматі TIFF.

Отримане цифрове зображення з урахуванням вказаних параметрів сканування та розрядністю 48-біт дозволяє визначати мінімальну різницю між інтенсивністю кольорів досліджуваних зразків, що неможливо при аналізі 24-х бітного зображення. Збереження отриманого цифрового зображення у форматі TIFF дозволяє уникнути явища так званої "цифрової деградації" при багаторазовій його обробці, архівуванні та при використанні у телемедицині.

На фіг. 1 наведено цифрове зображення мікропланшета зі зразками серії стандартних розведень альбуміну (лунки D-F7-12), аналітичного реагенту (лунки D-F6) та дослідних зразків (лунки D-F3-4).

На фіг. 2 наведено лінійний графік залежності абсорбції світла зразками розчину альбуміну від його концентрації.

Спосіб здійснюють таким чином: готують серію стандартних розведень аналіту, зразки якого вносять за допомогою автоматичного дозатора у реакційну пробірку або безпосередньо до лунок імунологічного планшета та додають хромогенний аналітичний реагент, у результаті реакції якого з аналітом утворюється забарвлена сполука, витримують реакційну суміш певний час для повного перебігу реакції. Аналітичний реагент, який використовують для аналізу, також вносять в окрему лунку планшета. Планшет розміщують на склі сканера, процедуру сканування проводять у затемненому приміщенні або запобігають потраплянню світла за допомогою світлонепроникного екрана. Сканування проводять при роздільній здатності сканера 300-600 DPI (Dots Per Inch - точок на дюйм) у кольоровому режимі RGB із розрядністю 48 біт, із вимкненою автоматичною корекцією кольору, з компенсацією чорної точки; режим управління кольором - абсолютний колориметричний. Отримане нестиснене зображення зберігають на цифровому носії інформації у форматі TIFF. Для подальшого аналізу використовують лише такі програми, які здатні обробляти 48-ми бітні зображення. Розраховують за формулою 1 кольоровий канал цифрових зображень зразків, значення інтенсивності якого змінюється найбільше та обирають його для подальшого аналізу. За формулою 2 розраховують показник абсорбції світла досліджуваного зразка в обраному кольоровому каналі. Будують калібрувальний графік залежності абсорбції світла зразком від концентрації речовин: по осі абсцис якого відкладають концентрацію речовини в обраних одиницях (відсотки, г/л, моль/л), а по осі ординат - значення абсорбції світла зразком в вибраному кольоровому каналі цифрового зображення, за яким знаходять концентрацію аналіту.

Приклад конкретного виконання. Визначали вміст альбуміну людини за допомогою бромкрезолового зеленого, який у кислому середовищі у присутності детергенту утворює з альбуміном комплекс зеленого кольору, інтенсивність забарвлення якого залежить від концентрації альбуміну в досліджуваному зразку.

Для побудови калібрувального графіка в скляні біологічні пробірки, що містили 3 мл хромогенного аналітичного реагенту (розчин бромкрезолового зеленого в ацетатному буфері із додаванням детергенту), вносили відповідно по 5, 10, 15, 20, 25 та 30 мкл стандартного розчину

альбуміну людини із концентрацією 50 г/л. Таким чином, концентрація альбуміну в серії стандартних розведень становила відповідно 8,3; 16,7; 25,0; 35,0; 42,0 та 50,0 г/л. Також готували дослідні зразки, концентрація альбуміну в яких дорівнювала 31 та 19 г/л. Реакційну суміш ретельно збовтували і відповідно до рекомендацій фірми-виробника залишали на 10 хв., після чого обережно, щоб уникнути утворення піни, за допомогою автоматичної піпетки-дозатора вносили в кожну лунку імунологічного планшета аліквоти серії стандартних розведень та зразків в об'ємі 200 мкл. Розчин аналітичного реагенту також вносили в окремі лунки планшета і розміщували його на склі сканера Mustek 1200 UB Plus. Усі процедури із отримання та обробки зображення та подальшої обробки даних проводили за допомогою ПЕОМ під керуванням операційної системи Ubuntu Linux 12.04. За допомогою програми XSane проводили попереднє сканування з метою визначення локалізації планшета та обмежували зону сканування цією ділянкою. Цей етап є бажаним, оскільки сканування всієї поверхні при високій роздільній здатності приладу в 48-ми бітному кольоровому режимі є досить тривалою процедурою, а отримане зображення має великий розмір. Після цього сканували зображення планшета із досліджуваними зразками в 48-ми бітному кольоровому режимі при роздільній здатності 300 DPI. Отримане цифрове зображення мікропланшета зі зразками розчину альбуміну (фіг. 1) зберігали на жорсткому диску у форматі TIFF для подальшого аналізу. За допомогою програми аналізу зображень ImageJ вимірювали значення інтенсивності кольорових каналів цифрового зображення кожного зі зразків аналіту та розчину хромогенного реагенту. Усі визначення проводили у трьох аналітичних повтореннях. Отримані дані інтенсивності кольору зразків у кожному каналі заносили до електронної таблиці (табл. 1).

Таблиця 1

Інтенсивність кольорових каналів серії стандартних розведень альбуміну

Концентрація альбуміну в розчині, г/л	Значення інтенсивності кольорового каналу, у.о.		
	червоний	зелений	синій
8,3	9896,69	15191,13	9427,92
16,7	10863,52	16472,26	9745,64
25,0	11894,73	17160,94	9346,22
35,0	12773,35	17504,93	9168,73
41,6	15626,22	19041,2	9304,88
50,0	19018,93	20138,12	9250,53
Мінімум	9896,69	15191,13	9168,73
Максимум	19018,93	20138,12	9745,64
ΔI	9122,24	4946,99	576,91

Таким чином було встановлено, що найбільше змінюється значення інтенсивності червоного каналу цифрового зображення зразків, а зміни зеленого та синього каналів значно менше виражені, тому визначення абсорбції світла зразків проводили за формулою 2 у цьому каналі їх цифрових зображень.

За отриманими даними у електронній таблиці (табл. 2) шляхом кубічної апроксимації був побудований калібрувальний графік залежності абсорбції світла зразків від концентрації в них аналіту (фіг. 2).

Таблиця 2

Абсорбція світла зразками розчину альбуміну у червоному каналі
цифрових зображень, $M \pm S$

№ зразку	Концентрація альбуміну в розчині, г/л	Абсорбція світла у червоному каналі, безрозмірна величина
1	Бланк	0
Серія стандартних розведень		
2	8	$0,1244 \pm 0,00812$
3	17	$0,2168 \pm 0,02786$
4	25	$0,2846 \pm 0,02182$
5	35	$0,3228 \pm 0,02864$
6	42	$0,3696 \pm 0,03001$
7	50	$0,3990 \pm 0,01317$
Дослідні зразки		
8	19	$0,2335 \pm 0,02706$
9	31	$0,3106 \pm 0,01300$

Відповідно до отриманого рівняння концентрація альбуміну у дослідних зразках № 8 та № 9 дорівнювала 30,6 та 18,9 г/л відповідно, що на 1 % та 0,5 % відрізняється від відомої концентрації дослідних зразків (31 та 19 г/л).

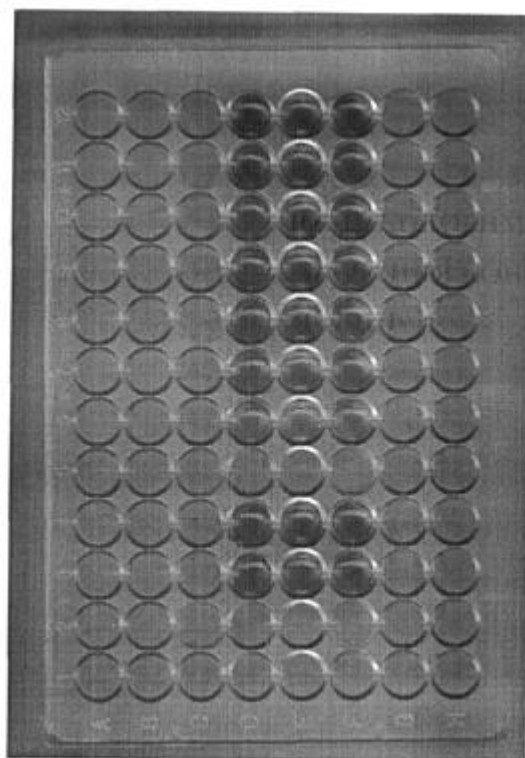
Таким чином отримані дані свідчать про те, що заявлений спосіб колориметричного визначення концентрації речовин методом відбивної сканометрії є достатньо чутливим, а відхилення отриманих значень на прикладі визначення концентрації альбуміну, не перевищують межі 1 %, і тому можуть бути прийнятними для більшості лабораторних досліджень.

Спосіб колориметричного визначення речовин методом відбивної сканометрії був також апробований для визначення концентрації загального білка в сироватці крові щурів біуретовим методом, нітритів у екстрактах гомогенатів тканин органів за допомогою реактиву Грісса, загальної відновлювальної активності сироватки крові за допомогою гексаціаноферату (II) калію. Похибка визначення концентрації вказаних речовин не перевищувала 2 % і тому спосіб може бути рекомендований для визначення широкого кола органічних або неорганічних речовин і не потребує перепрограмування приладу при зміні типу речовини, що визначають.

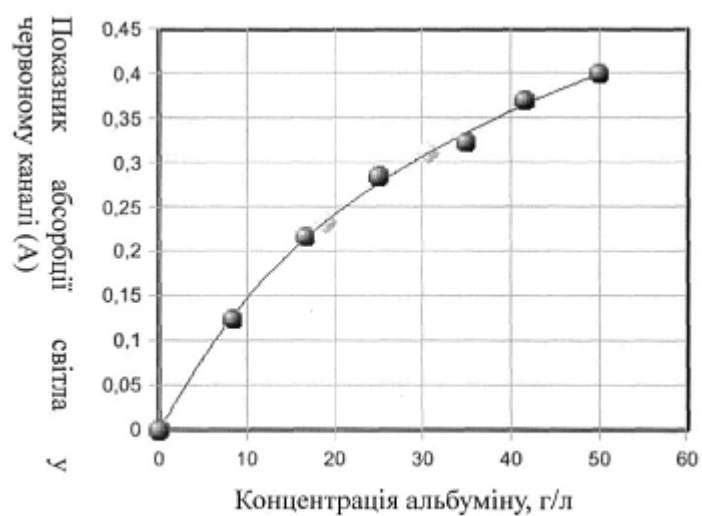
Розроблений спосіб може бути здійснений за допомогою звичайного сканера та персонального комп'ютера, має достатньо високу чутливість і роздільну здатність і може бути рекомендований для використання у навчальних та науково-дослідних лабораторіях та у телемедицині.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб колориметричного визначення концентрації речовин, який включає виготовлення серії стандартних розведень аналіту; відбір дослідних зразків розчину речовини, що аналізують; додавання до зразку та серії стандартних розведень аналіту хромогенного аналітичного реагенту, внесення забарвленої сполуки за допомогою автоматичного дозатора до лунок імунологічного планшета; отримання цифрового зображення імунологічного планшета за допомогою сканера; визначення кольорового каналу цифрових зображень зразків, значення інтенсивності якого змінюється найбільше; визначення абсорбції світла кожного зразка в цьому каналі; побудову калібрувального графіку залежності абсорбції світла зразком в вибраному кольоровому каналі від концентрації аналіту в серії стандартних розведень; визначення концентрації аналіту в зразку за цим графіком, який **відрізняється** тим, що отримання цифрового зображення імунологічного планшета здійснюють у режимі абсолютної колориметрії, із вимкненою автоматичною корекцією кольору, з компенсацією чорної точки в кольоровій моделі RGB із розрядністю 48 біт та зберігають нестиснене зображення на цифровому носії у форматі TIFF.



Фіг. 1



Фіг. 2

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601