



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1720004 A1

(51)5 G 01 N 33/52, 33/68

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГКНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

1

(21) 4784560/14
(22) 18.01.90
(46) 15.03.92. Бюл. № 10
(71) Научно-исследовательский институт физико-химической медицины МЗ РСФСР
(72) Р. К. Айдыралиев и Г. Е. Добрецов
(53) 612.015(088.8)
(56) Лабораторные методы исследования в клинике /Под ред. В. В. Меньшикова. М.: Медицина, 1987, с. 174-176.
(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЬБУМИН-ГЛОБУЛИНОВОГО КОЭФФИЦИЕНТА КРОВИ
(57) Изобретение относится к медицине, а именно к клинической биохимии, и касается определения альбумин-глобулинового коэффициента (АГК) в плазме или сыворотке крови. Цель изобретения – упрощение способа при одновременном повышении его

2

чувствительности. Кровь, плазму и сыворотку разводят буферным раствором, отделяют (в случае крови) форменные элементы, добавляют флуоресцентный краситель N-фенил-1-амино-8-сульфонафталин (АНС), измеряют интенсивность собственной флуоресценции в исследуемом и контрольном образцах до и после добавления АНС и рассчитывают величину АГК по формуле. В качестве контрольного образца используют раствор триптофана. Для проведения анализа по описанному способу достаточно 2-40 мкл крови или 1-20 мкл плазмы или сыворотки (т.е. чувствительность возрастает на 1-2 порядка), нет необходимости в проведении отдельного определения количества альбумина и глобулинов. Время анализа одной пробы по предлагаемому способу 1-2 мин.

Изобретение относится к медицине, а точнее к клинической биохимии, и касается определения альбумин-глобулинового коэффициента (АГК) в плазме или сыворотке крови с диагностической целью. АГК – величина, выражающая отношение количества альбуминов к количеству глобулинов в биологических жидкостях. В норме АГК крови колеблется в пределах 1,2-2,0. При разнообразных патологических состояниях (хронические инфекции, заболевания печени, почек, ожоги, воспаления и т.д.) наблюдается снижение АГК крови – и это служит важным диагностическим признаком.

Цель изобретения – упрощение способа при одновременном повышении его чувствительности.

Способ осуществляется следующим образом.

Пробу крови разводят в 50-1000 раз, отделяют форменные элементы, из полученного раствора плазмы готовят четыре пробы, в которых измеряют интенсивность флуоресценции (ее величины обозначены как Е, Б, С и Д) и рассчитывают АГК по формуле

$$\text{АГК} = \frac{E \cdot D}{B \cdot C} \cdot K - 2 \quad (1).$$

(19) SU (11) 1720004A1

где E – интенсивность собственной флуоресценции разбавленной плазмы;

B – то же, в присутствии N -фенил-1-амино-8-сульфонафталина (АНС) в конечной концентрации 20–60 мкМ;

C – интенсивность флуоресценции 10–50 мкМ раствора триптофана;

D – то же в присутствии 20–60 мкМ АНС;

K – числовой коэффициент, который при средней концентрации АНС 40 мкМ составляет величину 2,13.

Коэффициент K связан с концентрацией АНС следующим уравнением:

$$K = 2,25 (1 - 0,0013 \cdot H),$$

где H – концентрация АНС в мкМ.

Обычно используют концентрацию АНС 40 мкМ, и в уравнениях расчета АГК используют коэффициент, равный 2,13. В интервале концентраций 20–60 мкМ даже при использовании постоянного коэффициента (2,13) ошибка определения АГК находится в пределах $\pm 7\%$. Если же использовать переменный коэффициент, то значения АГК получаются практически одинаковые. Результаты приведены в таблице.

В предлагаемом способе можно также использовать цельную плазму или сыворотку, которую перед измерениями необходимо развести в 100–2000 раз (это соответствует разведению крови в 50–1000 раз).

Для проведения анализа в зависимости от степени разведения достаточно 2–40 мкл крови, или 1–20 мкл сыворотки или плазмы (в известном способе – 110 мкл). Это повышает чувствительность по сравнению с известным способом в 5–110 раз. При дальнейшем разведении снижается сигнал, а следовательно, и точность измерения. Разведение крови менее, чем в 50 раз нецелесообразно, так как требует большего объема крови, и, следовательно, приводит к снижению чувствительности способа.

АНС используется в способе в качестве тушителя собственной флуоресценции альбумина. Конечная концентрация АНС в анализируемой пробе 20–60 мкМ, оптимальная концентрация – 40 мкМ.

В предлагаемом способе с целью стандартизации процедуры анализа используется раствор триптофана (10–50 мкМ). Измерения интенсивности флуоресценции в растворе триптофана для каждого конкретного прибора и измерительной кюветы достаточно провести один раз. Время проведения одного анализа с момента получе-

ния разбавленной плазмы или сыворотки – 1–2 мин.

Пример 1. В 30 образцах плазмы по предлагаемому способу было определено соотношение альбумин/глобулин. С этой целью к 5 мкл плазмы каждого образца добавляют 1 мл буферного раствора следующего состава: трис-(оксиметил)-аминометан 10 мМ, ЭДТА 2 мМ, NaCl 145 мМ, pH 7,4. Измеряют интенсивность флуоресценции разбавленной плазмы до (E) и после (B) добавления 40 мкМ АНС. Измеряют интенсивность флуоресценции 40 мкМ раствора триптофана до (C) и после (D) добавления 40 мкМ АНС. По формуле (1) и $K = 3,13$ рассчитывают значения АГК. Среднее значение в группе составило 1,40. Измерения проводят при следующих условиях: длина волны возбуждения 285 нм, длина волны флуоресценции 340 нм, расстояния между внутренними поверхностями прямоугольной кюветы 1 см. Параллельно в этих образцах крови вычислены значения АГК с помощью известного способа (среднее значение 1,41). Коэффициент корреляции между данными обоих способов составляет 0,92. При изменении концентрации АНС на 10 мкМ (25%) и использовании постоянного коэффициента $K = 2,13$ определяемое значение АГК изменяется на 0,05 единиц (3–4%). Следовательно, небольшие вариации в концентрации АНС слабо влияют на точность анализа. Коэффициент (K) в уравнении (1) зависит от концентрации АНС и при 40 мкМ равен 2,13. Если ввести поправку на концентрацию, то точность способа будет еще выше.

Предлагаемый способ позволяет значительно упростить и ускорить определение АГК. Проведение одного анализа (вместо двух в известном способе) с использованием одного флуоресцентного красителя (вместо набора реактивов) приводит к упрощению способа, а сокращение времени инкубации красителя с образцом с 35–70 мин (в известном способе) до 0,5–1,0 мин (в предлагаемом способе) – к сокращению времени анализа до 1–2 мин. При этом происходит значительная экономия красителя – для проведения анализа требуется в 10 раз меньшее количество красителя, чем для определения альбумина по известному способу.

Кроме того, повышается чувствительность анализа по сравнению с известным способом в 5–110 раз за счет использования микроколичества крови (2–40 мкл).

Положительные эффекты достигаются без уменьшения точности определения АГК.

Формула изобретения

Способ определения альбумин-глобулинового коэффициента крови, включающий

получение плазмы или сыворотки крови, добавление к ней красителя с последующим анализом оптических свойств исследуемого и контрольного образцов, отличающийся тем, что, с целью упрощения способа при одновременном повышении его чувствительности, в качестве красителя используют N-фенил-1-амино-8-сульфонафалин в концентрации 20–60 мкМ, измеряют интенсивность собственной флуоресценции в контрольном образце, содержащем триптофан, и в исследуемом образце, содержащем сыворотку или плазму до и после добавления красителя, а альбумин-глобулиновый коэффициент рассчитывают по формуле

$$АГК = \frac{Е \cdot Д}{Б \cdot С} \cdot К - 2,$$

где АГК – альбумин-глобулиновый коэффициент;

Е – интенсивность собственной флуоресценции плазмы или сыворотки крови;

Б – интенсивность флуоресценции плазмы или сыворотки в присутствии красителя;

С – интенсивность флуоресценции контрольного образца, содержащего триптофан;

Д – флуоресценция образца, содержащего триптофан в присутствии красителя;

К – числовой коэффициент, зависящий от концентрации красителя.

Концентрация АНС, мкМ	20	30	40	50	60
К	2,19	2,16	2,13	2,10	2,07
АГК	1,55	1,56	1,56	1,55	1,54

Редактор И.Сегляник

Составитель Н.Гуляева
Техред М.Моргентал

Корректор М.Максимишинец

Заказ 769

Тираж

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул.Гагарина, 101