

DOI: <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2020-86-2-15-22>

МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ПО РЕАКЦИИ С БРОМПИРОГАЛЛОЛОВЫМ КРАСНЫМ

© Татьяна Борисовна Починок*, Полина Владимировна Анисимович, Зауаль Ахлоович Темердашев

Кубанский государственный университет, Россия, 350040, Краснодар, ул. Ставропольская, д. 149;

*e-mail: pochinokt@chem.kubsu.ru

Статья поступила 9 августа 2019 г. Поступила после доработки 1 октября 2019 г. Принята к публикации 27 ноября 2019 г.

При проведении диагностических исследований результаты определения общего белка в биологических жидкостях зависят от аминокислотного состава присутствующих в них белков. В работе обсуждены некоторые аспекты спектрофотометрического определения белков в биологических жидкостях, в частности, особенности методики, основанной на реакции белков с бромпиروгалловым красным (БПГК), важнейшим преимуществом которого является высокая и одинаковая чувствительность красителя к белкам альбуминовой и глобулиновой фракций. Это позволяет минимизировать погрешности, возникающие за счет несовпадения белкового состава анализируемых проб и используемых градуировочных растворов. Цель работы — исследование влияния условий и сроков хранения раствора БПГК на его аналитические свойства при спектрофотометрическом определении белков в биологических жидкостях. Стабильность оптических и аналитических свойств растворов реагента изучена с использованием критериев Фишера и Стьюдента при различных температурах хранения растворов, содержащих в качестве стабилизатора этанол или бензоат натрия. Проверку правильности определения общего белка по предложенной методике проводили методом «введено – найдено», вводя добавки стандартных растворов, приготовленных из калибраторов «Общий белок» или «Альбумин». Разработанная методика спектрофотометрического определения белков в моче по реакции с бромпирогалловым красным апробирована при анализе реальных объектов, метрологически аттестована и внесена в Федеральный реестр аттестованных методик выполнения измерений. Проведенные аналитические и метрологические исследования показали, что методика определения белков с использованием реагента на основе БПГК позволяет определять белки альбуминовой и глобулиновой фракций в биологических жидкостях человека с высокой и одинаковой чувствительностью. Для увеличения сроков хранения раствора реагента и сохранения его аналитических свойств рекомендуется использовать этанол в качестве стабилизатора.

Ключевые слова: общий белок; альбумин; глобулины; спектрофотометрический метод; бромпирогалловый красный; биологические жидкости.

METHODOLOGICAL FEATURES OF THE SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF PROTEINS IN BIOLOGICAL FLUIDS USING REACTIONS WITH BROMPYROGALLOL RED

© Taniana B. Pochinok*, Polina V. Anisimovich, Zauaal A. Temerdashev

Kuban State University, 149, Stavropol'skaya st., Krasnodar, 350040, Russia; *e-mail: pochinokt@chem.kubsu.ru

Received August 9, 2019. Revised October 1, 2019. Accepted November 27, 2019.

Determination of proteins in biological fluids is rather important for diagnostics in current clinical practice. The results of total protein determination depend on the amino-acid composition of the proteins present in the biological fluid. We discuss some aspects of the spectrophotometric determination of proteins in biological fluids, in particular, the methodological features of the technique based on the reaction of proteins with brompyrogallol red (BPGR). The most important advantage of BPGR in the determination of proteins in biological fluids is rather high and equal sensitivity of the dye to the proteins of albumin and globulin fractions, thus minimizing the errors attributed to the mismatch of the protein composition of the analyzed samples and calibration solutions used. The goal of the work is to study the impact of conditions and shelf life of the BPGR solution on the analytical properties of the solution in the spectrophotometric determination of proteins in biological fluids. Stability of the optical and analytical properties of BPGR solutions are studied using Fisher and Student criteria under conditions of different storage

temperatures and nature of the stabilizer (ethanol or sodium benzoate) in the reagent solutions. Verification of the correctness of the total protein determination by the proposed method was carried out in spike tests. The introduced additives of standard solutions are prepared from the "Total protein" or "Albumin" calibrators. The developed method of the spectrophotometric determination of the mass concentration of proteins in the urine by the reaction with bromopyrogallol red was tested on real objects, metrologically certified and listed in the Federal register of certified measurement techniques. Analytical and metrological studies have shown that the developed method of protein determination with a reagent based on BPGR provides equal and high sensitivity of determination of albumin and globulin protein fractions in human biological fluids. To increase the shelf life of the reagent solution and preserve the analytical properties of the solution, we recommend to use ethanol as a stabilizer.

Keywords: total protein; albumin; globulins; spectrophotometric method; bromopyrogallol red; biological fluids.

Введение

Определение белков в биологических жидкостях занимает важное место в ряду диагностических исследований. В клинической диагностике этот показатель обозначают как «общий белок»: он включает в себя большое количество белков — альбуминов и глобулинов, различающихся по содержанию некоторых аминокислот. Поэтому результаты определения общего белка в значительной степени зависят от аминокислотного состава белков, присутствующих в биологической жидкости.

На настоящий момент в клинической практике нет единой методики определения белков. Наиболее распространенными являются методики, основанные на связывании белков с органическими красителями [1 – 16]. Для этой цели используют Кумасси бриллиантовый синий [1 – 3], бромфеноловый синий [4], бромкрезоловый зеленый [5], пирогаллоловый красный [6 – 16] и другие органические реагенты. В результате реакции красителей с молекулами белков образуются окрашенные соединения, интенсивность окраски которых пропорциональна концентрации белков в пробе. Каждая методика имеет свои ограничения, связанные, например, с невысокой чувствительностью определения, нелинейностью зависимости оптической плотности от концентрации белков, помутнением раствора и коагуляцией образующегося продукта [1, 2, 4, 5]. Однако главным недостатком всех методик с использованием органических красителей является заметное различие в чувствительности реагентов к альбуминам и белкам глобулинового ряда, что приводит к возникновению ошибок при определении общего белка в случае несовпадения состава анализируемых проб и используемого стандартного раствора [7, 10, 17 – 20]. Поэтому основной проблемой большинства методик, наряду с недостаточной чувствительностью при определении низких концентраций белков, является сложность выбора адекватного стандартного вещества.

Наиболее часто для определения общего белка используют пирогаллоловый красный (ПГК),

впервые предложенный в работе [14]. По сравнению с другими методами ПГК-метод определения белков характеризуется более высокой чувствительностью. Для оптимизации условий взаимодействия белков с реагентом реакцию проводят в сукцинатном буферном растворе с pH 2,5. Позднее были предложены модифицирующие добавки к сукцинатному буферному раствору, в том числе, молибдат натрия [12 – 16, 22], который содержится и в современных коммерческих реактивах для определения общего белка. В присутствии белков происходит связывание комплекса ПГК – Мо (VI) с образованием тройного соединения ПГК – Мо (VI) — белок, что приводит к сдвигу его максимума поглощения с 400 до 600 нм [16]. Максимальное поглощение глобулинового комплекса наблюдается при pH 2,3 – 2,5; альбуминового — 2,5 – 3,0. Авторы работы [22] установили, что комплекс Мо (VI) – ПГК реагирует с различными боковыми цепями аминокислот, образуя более прочные связи с аргинином, лизином и гистидином; более низкую реакционную способность комплекс проявляет по отношению к аланину, триптофану, пролину, метионину, цистеину, тирозину, фенилаланину. Поэтому, несмотря на важные преимущества спектрофотометрического метода с применением ПГК, полученные результаты также характеризуются ошибками, связанными с различной чувствительностью красителя к белкам различной природы [7, 10, 20, 21].

Близким по свойствам к пирогаллоловому красному является краситель бромпирогаллоловый красный (БПГК), также взаимодействующий с белками с образованием окрашенного соединения. Ранее нами было исследовано взаимодействие БПГК с белками и показано, что данный краситель одинаково чувствителен к белкам альбуминовой и глобулиновой фракций, поэтому его применение для определения общего белка позволяет снизить ошибки, которые возникают в обычной практике при использовании в качестве калибратора стандартного раствора альбумина [23]. Оптимизированы условия проведения

реакции и показано, что сукцинатный буферный раствор с pH 2,5 обеспечивает оптимальную среду для взаимодействия БПГК с белками, а присутствие в составе раствора оксалата натрия позволяет устранить возможное влияние оксалатионов на значение оптической плотности растворов.

Отдельного обсуждения требуют вопросы, связанные с условиями хранения рабочего раствора БПГК, в состав которого входят органические соединения. Для увеличения сроков хранения коммерческих растворов органических реагентов их обычно хранят при пониженных температурах, в их состав вводят консерванты, например, бензоат натрия или этиловый спирт [10, 15, 16]. Эти компоненты могут оказывать влияние на аналитические свойства реагентов и метрологические характеристики методик.

Цель работы — исследование влияния условий и сроков хранения раствора БПГК на его аналитические свойства при спектрофотометрическом определении белков в биологических жидкостях и оценка метрологических характеристик разработанной методики определения белков в моче.

Экспериментальная часть

В работе использовали дигидрат молибдата натрия, чда; янтарную кислоту, хч; натрий щавелевокислый, хч; этанол перегнанный; бензоат натрия, хч; ацетат натрия, хч; уксусную кислоту, хч; хлорид натрия, хч; сульфат аммония, хч; бромпирогаллоловый красный, чда («Нева Реактив», Россия); калибратор «Альбумин» 50 г/л (ООО «Агат-Мед», Россия); калибратор «Общий белок» 60 г/л (ООО «Агат-Мед», Россия); набор контрольных растворов белков мочи «БМ-контроль-ПГК» и набор контрольных образцов мочи «КМ-контроль-БХ» (ООО «Медлакор», Россия).

Стандартные растворы общего белка и альбумина готовили непосредственно перед работой из исходных растворов калибраторов с использованием дозаторов переменного объема 5 – 50, 50 – 200, 100 – 1000 мкл («Biohit», Sartorius, США); калибраторы разбавляли физиологическим раствором (0,9 %-ный раствор хлорида натрия).

Исходные растворы красителей готовили растворением точной навески красителя в 500 мл дистиллированной воды, рабочие растворы получали путем разбавления исходных с добавлением необходимых реагентов. Рабочие растворы БПГК содержали $6,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л красителя и $4,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л молибдата натрия в сукцинатном буферном растворе с pH 2,5, в состав которого входили янтарная кислота ($5,0 \cdot 10^{-2}$ моль/л) и оксалат натрия ($1,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л). Для изучения

влияния стабилизаторов на метрологические характеристики методики исследовали взаимодействие с белками комплекса БПГК – Мо (VI) в сукцинатном буферном растворе в присутствии бензоата натрия ($1,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л) или этанола (10 % об.). Сукцинатный буферный раствор имел состав, аналогичный буферному раствору, используемому при определении общего белка с красителем пирогаллоловым красным¹.

Оптическую плотность растворов измеряли с использованием спектрофотометра UV-1800 («Shimadzu», Япония). Значения pH буферных растворов контролировали с помощью иономера «Эксперт-001» с комбинированным стеклянным электродом ЭСК-10601/7.

Для получения градуировочных зависимостей в пробирки вносили раствор реагента и соответствующий объем стандартного раствора белка, растворы перемешивали, и после выдерживания в течение 10 мин измеряли оптическую плотность относительно раствора сравнения в кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см на длине волны 608 нм. Раствор сравнения готовили добавлением к реагенту соответствующего объема физиологического раствора.

Для исследования влияния природы стабилизатора и температурного режима хранения растворов реагента на результаты анализа готовили шесть растворов реагента, содержащего БПГК и сукцинатный буферный раствор. Из них три раствора, содержащие бензоат натрия ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) или этанол (10 % об.), и без стабилизатора хранили в холодильнике (6 ± 2 °C), а перед использованием термостатировали. Три других раствора, приготовленных аналогичным образом, хранили при комнатной температуре. Через определенные промежутки времени в течение нескольких месяцев измеряли оптическую плотность растворов реагента (580 нм), а также этих растворов в присутствии белков. Для этого к 2,0 мл раствора БПГК в сукцинатном буферном растворе с pH 2,5, содержащем стабилизатор или без него, добавляли с помощью дозатора 60 мкл рабочего раствора общего белка. После перемешивания и выдерживания в течение 10 мин приготовленные растворы фотометрировали при $\lambda = 608$ нм. Полученные результаты статистически обрабатывали.

Апробацию методики и оценку ее метрологических характеристик проводили на примере образцов мочи — жидкостей с низким содержанием белков. Отбор проб мочи осуществляли в соответ-

¹ Инструкция РУ № ФСР 2007/01435 по применению набора реагентов для количественного определения общего белка в моче и спинномозговой жидкости с пирогаллоловым красным (ОБЩИЙ БЕЛОК ПГК ФС «Диакон-ДС»). Утверждена Приказом Росздравнадзора от 20 июля 2010 г. № 6830 — Пр/10.

ствии с ГОСТ Р 53079.4–2008². В зависимости от природы анализируемой биологической жидкости и содержания в ней белков можно варьировать кратность разбавления физиологическим раствором.

Метрологические характеристики методики рассчитывали в соответствии с рекомендациями³.

Образцы для аттестации и оценивания характеристик погрешности методики готовили с использованием стабилизированного стандартного образца контрольной мочи человека с аттестованным значением содержания белков «КМ-контроль-ВХ». Для варьирования концентраций белков использовали набор контрольных растворов белков мочи «БМ-контроль-ПГК» с четырьмя уровнями концентраций и стандартный раствор, приготовленный из калибратора «Альбумин».

Обсуждение результатов

При изучении стабильности растворов БПГК без добавления стабилизаторов было установлено, что оптические и аналитические свойства раствора реагента зависят от температуры хранения: раствор реагента сохраняет свои свойства в течение всего 5–6 дней в случае его хранения при комнатной температуре; на 7-й день полученные результаты были идентифицированы как промахи во всей выборке. Выдерживание этого раствора при температуре $6 \pm 2^\circ\text{C}$ позволяет сохранить его свойства в течение примерно одного месяца, после этого срока наблюдается снижение средних значений оптической плотности более чем на 5–10 % с одновременным снижением воспроизводимости результатов. Невысокая устойчивость растворов БПГК создает неудобства при его использовании для массовых клинических испытаний.

Интерес представляло исследование стабильности оптических и аналитических свойств растворов БПГК в присутствии стабилизатора — этанола или бензоата натрия.

Влияние температуры хранения и природы стабилизатора в растворах реагента на срок хранения растворов БПГК изучали статистическим методом с использованием критериев Фишера и Стьюдента.

По критерию Фишера устанавливали, значительно ли различаются дисперсии средних значений оптической плотности растворов двух сопоставляемых выборок, т.е. являются ли дисперсии однородными. Критерий Стьюдента использовали для сравнения средних значений двух выборок, если дисперсии соответствующих величин значительно не различались: воспроизводимость результатов измерения характеризуется средней дисперсией $\bar{S}^2$, значимость расхождения средних результатов оценивали по формуле:

$$t_{\text{экс}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\bar{S}} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}, \quad (1)$$

где n_1 и n_2 — числа параллельных измерений; $\bar{x}_1$ и $\bar{x}_2$ — рассчитанные средние значения для первой и второй выборок; $\bar{S}$ — среднее стандартное отклонение, вычисляемое по формуле:

$$\bar{S} = \sqrt{\frac{f_1 s_1^2 + f_2 s_2^2}{f_1 + f_2}}, \quad (2)$$

где f_1 и f_2 — числа степеней свободы соответствующих дисперсий s_1^2 и s_2^2 . Различие средних результатов принимали как значимое, если $t_{\text{экс}} > t(P, f)$. Критическим значением выбирали коэффициент Стьюдента для доверительной вероятности $P = 0,95$ и числа степеней свободы $f = f_1 + f_2$.

В случае когда сравниваемые дисперсии оказывались неоднородными и различались значительно, пренебрегали меньшей по значению дисперсией, считая ее равной нулю, а соответствующее ей среднее значение — более точной величиной. Для проверки значимости различия между выбранными средними значениями рассчитывали коэффициент $t_{\text{экс}}$ по формуле:

$$t_{\text{экс}} = \frac{|\bar{x} - a|}{S(x)} \sqrt{n}, \quad (3)$$

где $\bar{x} = \bar{x}_1$, $\bar{x}_2 = a$, $s(x) = s_1^2$, если $s_2^2 < s_1^2$; $\bar{x} = \bar{x}_2$, $\bar{x}_1 = a$, $s(x) = s_2^2$, если $s_2^2 > s_1^2$. Рассчитанное значение $t_{\text{экс}}$ сравнивали с табличным t -критерием, установленным для доверительной вероятности $P = 0,95$ и числа степеней свободы f . Значимое различие средних результатов принимали, если $t_{\text{экс}} > t(P, f)$.

При исследовании зависимости оптических и аналитических свойств реагента от природы стабилизатора и температурного режима хранения полагали, что влияние указанных факторов установлено, если сравниваемые выборки неоднородны. Однородность выборок устанавливали по критерию Фишера (табл. 1), сравнение средних

² ГОСТ Р 53079.4–2008. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа. — М.: Стандартинформ, 2009. — 65 с.

³ РМГ 61–2010. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. — М.: ИПК Издательство стандартов, 2004. — 42 с.

Таблица 1. Результаты статистической проверки влияния температуры хранения и природы стабилизатора на оптическую плотность растворов реагента**Table 1.** The results of statistical verification of the effect of storage temperature and nature of the stabilizer on the optical density of the reagent solutions

Температура хранения, °С	Стабилизатор в составе раствора реагента	Срок хранения раствора реагента, дни	Критерии Фишера для А растворов реагента			Критерии Фишера для А растворов общего белка, 0,012 г/л		
			n	$F_{\text{эксп}}$	$F_{\text{крит}}$	n	$F_{\text{эксп}}$	$F_{\text{крит}}$
25 ± 1	Без стабилизатора	7	15	53,28	2,79	20	7,48	2,33
6 ± 2		70	25			25		
25 ± 1	Этанол	120	40	4,88	1,88	40	2,43	1,88
6 ± 2		120	40			40		
25 ± 1	Бензоат натрия	120	40	11,58	1,88	40	1,13	1,88
6 ± 2		120	40			40		
25 ± 1	Без стабилизатора	7	15	6,14	2,67	20	3,20	2,07
		Этанол	120			40		
6 ± 2	Без стабилизатора	70	25	42,28	2,01	25	5,41	2,15
		Этанол	120			40		
25 ± 1	Без стабилизатора	7	15	37,18	2,67	20	2,72	2,07
		Бензоат натрия	120			40		
6 ± 2	Без стабилизатора	70	25	16,59	2,01	25	3,09	2,15
		Бензоат натрия	120			40		
25 ± 1	Этанол	120	40	6,05	1,88	40	1,23	1,88
		Бензоат натрия	120			40		
6 ± 2	Этанол	120	40	2,55	1,88	40	1,75	1,88
		Бензоат натрия	120			40		

значений выборок проводили по критерию Стьюдента (табл. 2).

Сравнение значений критериев Фишера и Стьюдента подтверждает неоднородность дисперсий массивов данных и средних значений для растворов одинакового состава, но хранившихся при разных температурах, и свидетельствует о том, что независимо от природы стабилизатора для всех исследованных составов температура хранения влияет на аналитические свойства раствора реагента: при 6 ± 2 °С растворы дольше сохраняют свои свойства. Неоднородность дисперсий массивов данных и средних значений выборок по данным для растворов, хранившихся в одинаковых температурных условиях и содержащих в одном случае этанол, во втором — бензоат натрия, указывает также на влияние природы стабилизатора на оптические и аналитические свойства растворов БПГК.

С учетом того, что тангенс угла наклона градуировочной зависимости выше в случае добавления этанола [23], при проведении массовых клинических испытаний можно рекомендовать использовать этанол в качестве стабилизатора и хранить раствор реагента при температуре 6 ± 2 °С.

Для проверки правильности определений по выбранной методике использовали метод «введе-

но – найдено», вводя добавки стандартных растворов, приготовленных из калибраторов «Общий белок» или «Альбумин». Полученные результаты, представленные в табл. 3, показывают, что в обоих случаях статистически значимого различия между введенным и найденным содержанием белка в исследуемых растворах не наблюдается.

Методику определения общего белка с бромпирогаллоловым красным в выбранных условиях подготовили к проведению метрологической аттестации. Экспериментальную оценку метрологических характеристик методики проводили в условиях внутрилабораторной прецизионности: в разное время, разными исполнителями с разными наборами посуды и основных реактивов. Для построения градуировочного графика готовили аттестованные образцы растворов белков с использованием калибратора «Общий белок» (с концентрацией 60 г/л) или калибратора «Альбумин» (50 г/л). Полученные данные были объединены в один массив, установлена единая градуировочная характеристика, по которой оценивали содержание общего белка.

Для варьирования концентраций белков в образцах применяли метод стандартных добавок с использованием стабилизированного стандартного образца контрольной мочи человека и набо-

Таблица 2. Результаты сравнения средних значений выборок по критерию Стьюдента**Table 2.** Comparison of the mean values of samples using the Student's *t*-test

Температура хранения, °C	Стабилизатор в составе раствора реагента	Срок хранения раствора реагента, дни	Критерии Стьюдента для А растворов реагента			Критерии Стьюдента для А растворов общего белка, 0,012 г/л		
			<i>n</i>	<i>t</i> _{эксп}	<i>t</i> _{крит}	<i>n</i>	<i>t</i> _{эксп}	<i>t</i> _{крит}
25 ± 1	—	7	15	3,31	2,06	20	0,94	2,13
6 ± 2		70	25			25		
25 ± 1	Этанол	120	40	5,09	2,02	40	3,46	2,02
6 ± 2		120	40			40		
25 ± 1	Бензоат натрия	120	40	2,50	2,02	40	1,74	2,02
6 ± 2		120	40			40		
25 ± 1	—	7	15	7,39	2,02	20	0,91	2,13
		120	40			40		
6 ± 2	—	70	25	6,66	2,06	25	3,41	2,02
		120	40			40		
25 ± 1	—	7	15	3,86	2,02	20	2,32	2,09
		120	40			40		
6 ± 2	—	70	25	2,41	2,06	25	3,81	2,02
		120	40			40		
25 ± 1	Этанол	120	40	6,87	2,02	40	4,74	1,99
		120	40			40		
6 ± 2	Этанол	120	40	21,89	2,02	40	0,46	1,99
		120	40			40		

Таблица 3. Результаты проверки правильности методики с использованием добавок стандартных растворов различного состава (*n* = 5; *P* = 0,95)**Table 3.** The results of the procedure validation using additives of standard solutions of various compositions (*n* = 5; *P* = 0.95)

Номер пробы мочи	Калибратор	<i>C</i> _{белков} г/л	
		Введено	Найдено
1	Общий белок	—	0,071 ± 0,003
		0,098	0,161 ± 0,008
		0,192	0,259 ± 0,012
2	Общий белок	—	0,108 ± 0,005
		0,098	0,208 ± 0,010
		0,192	0,309 ± 0,013
3	Альбумин	—	0,094 ± 0,006
		0,054	0,145 ± 0,005
		0,358	0,455 ± 0,006
4	Альбумин	—	0,150 ± 0,010
		0,192	0,337 ± 0,015
		0,320	0,489 ± 0,024

ра контрольных растворов белков мочи, а также калибратора «Альбумин». Было приготовлено 6 образцов с содержанием белков в диапазоне от 0,05 до 2,00 г/л. Из каждого раствора отбирали дозатором аликвоту 60 мкл и вносили в 2,0 мл раствора реагента. Выдерживали растворы

10 мин и измеряли их оптическую плотность с использованием спектрофотометра на длине волны 608 нм. Для каждой концентрации проводили 12 параллельных определений. Содержание белков определяли по градуировочному графику и с учетом разбавления пересчитывали на содержание в контрольном образце.

На основе полученных экспериментальных данных установлены характеристики погрешностей методики в пределах диапазона определяемых содержаний белков от 0,10 до 1,40 г/л (табл. 4).

Разработанная методика успешно прошла метрологическую аттестацию⁴ и внесена в Федеральный реестр аттестованных методик выполнения измерений (ФР.1.31.2019.33862).

Заключение

Таким образом, проведенные аналитические и метрологические исследования показали, что методика определения белков с использованием реагента на основе БПГК позволяет определять белки альбуминовой и глобулиновой фракций в биологических жидкостях человека с высокой и

⁴ Массовая концентрация белков в моче. Методика измерений спектрофотометрическим методом с бромпирогалловым красным. Аттестована ФГБУ «ГХИ». Свидетельство об аттестации методики измерений от 27.04.2018 № С.МИ 02067847.04.RA.RU.311345–2018.

Таблица 4. Метрологические характеристики аттестованной методики ($P = 0,95$)**Table 4.** Metrological characteristics of the certified technique ($P = 0.95$)

Метрологическая характеристика	Значение
Диапазон определяемых концентраций белка, г/л	От 0,10 до 1,40 включ.
Показатель повторяемости (среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ , %	2
Показатель воспроизводимости (среднеквадратическое отклонение воспроизводимости) σ_R , %	3
Показатель правильности (границы систематической погрешности), $\pm \Delta_c$, %	7
Показатель точности (границы абсолютной погрешности), $\pm \delta$, %	10
Предел повторяемости (для двух результатов параллельных определений), r_m , %	5
Предел воспроизводимости (значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в лаборатории), R_m , %	8

одинаковой чувствительностью. Для увеличения сроков хранения раствора реагента и сохранения его аналитических свойств рекомендуется использовать этанол в качестве стабилизатора.

На примере анализа проб с низким содержанием белков установлены метрологические характеристики методики спектрофотометрического определения белков с использованием реагента на основе бромпирогаллолового красного. Для разработанной методики вследствие одинаковой чувствительности БПГК к белкам альбуминовой и глобулиновой фракций характерно отсутствие влияния состава стандартного раствора на результаты определения белков. Предлагаемая методика прошла процедуру метрологической аттестации и внесена в Федеральный реестр аттестованных методик выполнения измерений.

Работа выполнена с использованием научно-го оборудования ЦКП «Эколого-аналитический центр Кубанского госуниверситета».

ЛИТЕРАТУРА

1. Schleicher E., Wieland O. H. Evaluation of the Bradford method for protein determination in body fluids / J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1978. Vol. 16. N 9. P. 533 – 534.
2. Marshall T., Williams K. M. Total protein determination in urine: elimination of a differential response between the coomassie blue and pyrogallol red protein dye-binding assays / Clin. Chem. 2000. Vol. 46. N 3. P. 392 – 398.
3. Samudra P. B., Swagata P., Shakuntala G., et al. Interference of sugars in the Coomassie Blue G dye binding assay of proteins / Anal. Biochem. 2009. Vol. 386. N 1. P. 113 – 115. DOI: 10.1016/j.ab.2008.12.006.
4. Trivedi V. D. On the role of lysine residues in the bromophenol blue — Albumin interaction / Ital. J. Biochem. 1997. Vol. 46. N 2. P. 67 – 73.
5. Vatassery G. T., Krezowski A. M., Sheridan M. A. Comparison of manual methods of determination of albumin in human cerebrospinal fluid by the bromocresol green and immuno-precipitation methods / Clin. Biochem. 1980. Vol. 13. N 2. P. 78 – 80. DOI: 10.1016/S0009-9120(80)91233-3.
6. Yalamati P., Bhongir A. V., Karra M., Beedu S. R. Comparative Analysis of Urinary Total Proteins by Bicinchoninic Acid and Pyrogallol Red Molybdate Methods / J. Clin. Diagn. Res. 2015. Vol. 9. N 8. P. 1 – 4. DOI: 10.7860/JCDR/2015/13543.6313.
7. Ларичева Е. С., Андреев Ю. Н., Козлов А. В. Способен ли метод определения белка в моче пирогаллоловым красным претендовать на роль основного / Лабораторная диагностика. 2009. № 1. С. 24 – 32.
8. Williams K. M., Marshall T. Protein concentration of cerebrospinal fluid by precipitation with Pyrogallol Red prior to sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis / J. Biochem. Biophys. Methods. 2001. Vol. 47. N 3. P. 197 – 207. DOI: 10.1016/S0165-022X(00)00135-4.
9. Lynch K. M., Sellers T. S., Gossett K. A. Evaluation of an automated pyrogallol red-molybdate method for the measurement of urinary protein in rats / Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1996. Vol. 34. N 7. P. 569 – 571.
10. Пупкова В. И., Прасолова Л. М. Метод с пирогаллоловым красным — альтернатива традиционным методам определения белка в моче / Клини. лаб. диагностика. 2007. № 6. С. 17 – 21.
11. Marshall T., Williams K. M. Interference in the Coomassie Brilliant Blue and Pyrogallol Red protein dye-binding assays is increased by the addition of sodium dodecyl sulfate to the dye reagents / Anal. Biochem. 2004. Vol. 331. N 2. P. 255 – 259. DOI: 10.1016/j.ab.2004.04.029.
12. Da Silva A. S., Falkenberg M. Analytical interference of quinolone antibiotics and quinine derived drugs on urinary protein determined by reagent strips and the pyrogallol red-molybdate protein assay / Clin. Biochem. 2011. Vol. 44. N 12. P. 1000 – 1004. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2011.05.018.
13. Yanga Jui-Yi., Chiena Tzu-I., Lua Jin-Ying, Kaoa Jau-Tsuen. Heparin interference in the cerebrospinal fluid protein assay measured with a pyrogallol red-molybdate complex / Clin. Chim. Acta. 2009. Vol. 408. N 1 – 2. P. 75 – 78. DOI: 10.1016/j.cca.2009.07.011.
14. Fujita Y., Mori I., Kitano S. Color reaction between Pyrogallol Red — molybdenum(VI) complex and protein / J. Bunseki Kagaku. 1983. Vol. 32. P. 379 – 386. DOI: 10.2116/bunsekikagaku.32.12_E379.
15. Orsonneau J. L., Douet P., Massoubre C., et al. An improved pyrogallol red-molybdate method for the determining total urinary protein / Clin. Chem. 1989. Vol. 35. P. 2233 – 2235.
16. Watanabe N., Kamel S., Ohkubo A., et al. Urinary protein as measured with a pyrogallol-red-molybdate complex manually and in a Hitachi 726 automated analyzer / Clin. Chem. 1986. Vol. 32. P. 1551 – 1154. DOI: 10.1371/journal.pone.0100768.
17. Lefevre G., Bloch S., Le Bricon T., Billier S., et al. Influence of protein composition on total urinary protein determined by pyrocatechol-violet (UPRO Vitros) and pyrogallol red dye binding methods / J. Clin. Lab. Anal. 2001. Vol. 15. N 1. P. 40 – 42. DOI: 10.1002/1098-2825(2001)15:1<40::AID-JCLA8>3.0.CO;2-0.
18. Marshall T., Williams K. M. Protein determination in cerebrospinal fluid by protein dye-binding assay / Brit. J. Biomed. Sci. 2000. Vol. 57. N 4. P. 281 – 286.
19. Artiss J. D., Thibert R. J., Zak B. Spectrophotometric study of total protein-albumin methods applied to cerebrospi-

- nal fluid / 1981. Clin. Biochem. Vol. 14. N 1. P 32 – 38. DOI: 10.1016/0009-9120(81)90165-X.
20. **Миллер В. Г., Брунс Д. Е., Хортин Г. Л. и др.** Современное состояние вопросов измерения и представления результатов выделения альбумина с мочой / Клини. лаб. диагностика. 2012. № 3. С. 43 – 53. DOI: 10.1373/clinchem.2008.106567.
 21. **Dube J., Girouard J., Leclerc P., Douville P.** Problems with the estimation of urine protein by automated assays / Clin. Biochem. 2005. Vol. 38. P 479 – 485. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2004.12.010.
 22. **Negin S., Wayne F. P., Mark J. L., Shepro D.** Pyrogallol Red — molybdate: A reversible, metal chelate stain for detection of proteins immobilized on membrane supports / Electrophoresis. 1996. Vol. 17. P 678 – 693. DOI: 10.1002/elps.1150170411.
 23. **Анисимович П. В., Починок Т. Б., Токарева Е. В.** Спектрофотометрическое определение белков в биологических жидкостях / Журн. аналит. химии. 2017. Т. 72. № 12. С. 1069 – 1077. DOI: 10.7868/S0044450217120039.
- ## REFERENCES
1. **Schleicher E., Wieland O. H.** Evaluation of the Bradford method for protein determination in body fluids / J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1978. Vol. 16. N 9. P 533 – 534.
 2. **Marshall T., Williams K. M.** Total protein determination in urine: elimination of a differential response between the coomassie blue and pyrogallol red protein dye-binding assays / Clin. Chem. 2000. Vol. 46. N 3. P 392 – 398.
 3. **Samudra P. B., Swagata P., Shakuntala G., et al.** Interference of sugars in the Coomassie Blue G dye binding assay of proteins / Anal. Biochem. 2009. Vol. 386. N 1. P 113 – 115. DOI: 10.1016/j.ab.2008.12.006.
 4. **Trivedi V. D.** On the role of lysine residues in the bromophenol blue — Albumin interaction / Ital. J. Biochem. 1997. Vol. 46. N 2. P 67 – 73.
 5. **Vatassery G. T., Krezowski A. M., Sheridan M. A.** Comparison of manual methods of determination of albumin in human cerebrospinal fluid by the bromocresol green and immuno-precipitation methods / Clin. Biochem. 1980. Vol. 13. N 2. P 78 – 80. DOI: 10.1016/S0009-9120(80)91233-3.
 6. **Yalamati P., Bhongir A. V., Karra M., Beedu S. R.** Comparative Analysis of Urinary Total Proteins by Bicinchoninic Acid and Pyrogallol Red Molybdate Methods / J. Clin. Diagn. Res. 2015. Vol. 9. N 8. P 1 – 4. DOI: 10.7860/JCDR/2015/13543.6313.
 7. **Laricheva E., Andreev J., Kozlov A.** If a method of determining protein in the urine pyrogallol red to claim the role of principal / Klin. Lab. Diagn. 2009. N 1. P 24 – 32 [in Russian].
 8. **Williams K. M., Marshall T.** Protein concentration of cerebrospinal fluid by precipitation with Pyrogallol Red prior to sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis / J. Biochem. Biophys. Methods. 2001. Vol. 47. N 3. P 197 – 207. DOI: 10.1016/S0165-022X(00)00135-4.
 9. **Lynch K. M., Sellers T. S., Gossett K. A.** Evaluation of an automated pyrogallol red-molybdate method for the measurement of urinary protein in rats / Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1996. Vol. 34. N 7. P 569 – 571.
 10. **Pupkova V. I., Prasolova L. M.** The method with pyrogallol red — an alternative to the traditional methods of determining protein in the urine / Klin. Lab. Diagn. 2007. N 6. P 17 – 21 [in Russian].
 11. **Marshall T., Williams K. M.** Interference in the Coomassie Brilliant Blue and Pyrogallol Red protein dye-binding assays is increased by the addition of sodium dodecyl sulfate to the dye reagents / Anal. Biochem. 2004. Vol. 331. N 2. P 255 – 259. DOI: 10.1016/j.ab.2004.04.029.
 12. **Da Silva A. S., Falkenberg M.** Analytical interference of quinolone antibiotics and quinine derived drugs on urinary protein determined by reagent strips and the pyrogallol red-molybdate protein assay / Clin. Biochem. 2011. Vol. 44. N 12. P 1000 – 1004. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2011.05.018.
 13. **Yanga Jui-Yi., Chiena Tzu-I., Lua Jin-Ying, Kaoa Jau-Tsuen.** Heparin interference in the cerebrospinal fluid protein assay measured with a pyrogallol red-molybdate complex / Clin. Chim. Acta. 2009. Vol. 408. N 1 – 2. P 75 – 78. DOI: 10.1016/j.cca.2009.07.011.
 14. **Fujita Y., Mori I., Kitano S.** Color reaction between Pyrogallol Red — molybdenum(VI) complex and protein / J. Bunseki Kagaku. 1983. Vol. 32. P 379 – 386. DOI: 10.2116/bunsekikagaku.32.12_E379.
 15. **Orsonneau J. L., Douet P., Massoubre C., et al.** An improved pyrogallol red-molybdate method for the determining total urinary protein / Clin. Chem. 1989. Vol. 35. P 2233 – 2235.
 16. **Watanabe N., Kamel S., Ohkubo A., et al.** Urinary protein as measured with a pyrogallol-red-molybdate complex manually and in a Hitachi 726 automated analyzer / Clin. Chem. 1986. Vol. 32. P 1551 – 1154. DOI: 10.1371/journal.pone.0100768.
 17. **Lefevre G., Bloch S., Le Bricon T., Billier S., et al.** Influence of protein composition on total urinary protein determined by pyrocatechol-violet (UPRO Vitros) and pyrogallol red dye binding methods / J. Clin. Lab. Anal. 2001. Vol. 15. N 1. P 40 – 42. DOI: 10.1002/1098-2825(2001)15:1<40::AID-JCLA8>3.0.CO;2-0.
 18. **Marshall T., Williams K. M.** Protein determination in cerebrospinal fluid by protein dye-binding assay / Brit. J. Biomed. Sci. 2000. Vol. 57. N 4. P 281 – 286.
 19. **Artiss J. D., Thibert R. J., Zak B.** Spectrophotometric study of total protein-albumin methods applied to cerebrospinal fluid / 1981. Clin. Biochem. Vol. 14. N 1. P 32 – 38. DOI: 10.1016/0009-9120(81)90165-X.
 20. **Miller V. G., Bruns D. E., Hortin G. L., et al.** Current issues in measurement and reporting of urinary albumin excretion / Klin. Lab. Diagn. 2012. N 3. P 43 – 53. DOI: 10.1373/clinchem.2008.106567 [in Russian].
 21. **Dube J., Girouard J., Leclerc P., Douville P.** Problems with the estimation of urine protein by automated assays / Clin. Biochem. 2005. Vol. 38. P 479 – 485. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2004.12.010.
 22. **Negin S., Wayne F. P., Mark J. L., Shepro D.** Pyrogallol Red — molybdate: A reversible, metal chelate stain for detection of proteins immobilized on membrane supports / Electrophoresis. 1996. Vol. 17. P 678 – 693. DOI: 10.1002/elps.1150170411.
 23. **Anisimovich P. V., Pochinok T. B., Tokareva E. V.** Spectrophotometric determination of proteins in biological fluids / J. Anal. Chem. 2017. Vol. 72. N 12. P 1212 – 1218. DOI: 10.1134/S1061934817120024.