



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 159 442** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁷ **G 01 N 33/72, 33/52**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 99124689/14, 23.11.1999
(24) Дата начала действия патента: 23.11.1999
(46) Дата публикации: 20.11.2000
(56) Ссылки: RU 2044319 C1, 20.09.1995. SU 1386901 A1, 15.01.1990. RU 2054173 C1, 10.02.1996. US 4349351 A, 14.09.1982. JP 0114357 A, 06.06.1989. JP 61259171 A, 17.11.1986. JP 55162060 A, 17.12.1980. EP 0729031 A1, 28.08.1996. WO 90/13818 A1, 15.11.1990. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник под ред.Меньшикова В.В. - М.: Медицина, 1986, с.107-109.
(98) Адрес для переписки:
630117, г.Новосибирск, а/я 5, Кучумовой Л.Я.

(71) Заявитель:
Закрытое акционерное общество "Вектор-Бест"
(72) Изобретатель: Пупкова В.И.,
Банина Л.И., Войтова Н.И.
(73) Патентообладатель:
Закрытое акционерное общество "Вектор-Бест"

(54) НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЕМОГЛОБИНА В КРОВИ

(57) Реферат:
Изобретение относится к медицине и биохимии. Набор реагентов для определения концентрации гемоглобина в крови включает в себя реагент-комплексобразователь и калибратор. При этом реагент-комплексобразователь содержит следующие компоненты, мас. %: додецилсульфат натрия - 0,03-0,15; азид натрия 0,0003-0,001; вода - остальное.

Калибратор, входящий в состав набора, содержит следующие компоненты, мас. %: гемоглобин 12,0-15,0; додецилсульфат натрия 0,03-0,15; этиленмеркуртисалициловой кислоты натриевая соль 0,03-0,08; вода - остальное. Набор реагентов отличается повышенной стабильностью при хранении и простотой использования при допустимой ошибке определения концентрации гемоглобина 1-2%. 2 табл.

RU 2 1 5 9 4 4 2 C 1

RU 2 1 5 9 4 4 2 C 1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 159 442** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁷ **G 01 N 33/72, 33/52**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 99124689/14, 23.11.1999
(24) Effective date for property rights: 23.11.1999
(46) Date of publication: 20.11.2000
(98) Mail address:
630117, g.Novosibirsk, a/ja 5, Kuchumovoj L.Ja.

(71) Applicant:
Zakrytoe aktsionernoe obshchestvo "Vektor-Best"
(72) Inventor: Pupkova V.I.,
Banina L.I., Vojtova N.I.
(73) Proprietor:
Zakrytoe aktsionernoe obshchestvo "Vektor-Best"

(54) **REAGENT SET FOR DETERMINING BLOOD HEMOGLOBIN CONCENTRATION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine. SUBSTANCE: set has complex-creating reagent and calibration agent. The complex-creating reagent contains the following ingredients in % by mass: sodium dodecylsulfate - 0.03-0.15, sodium azide 0.0003-0.001, water - the rest. The

calibration agent belonging to the set contains the following ingredients in % by mass: hemoglobin - 122.0-15.0, sodium dodecylsulfate - 0.03- 0.15, sodium salt of ethylenemercurthiosalicylic acid 0.03-0.08, water - the rest. EFFECT: high stability in storage; simplified utilization method. 2 tbl

RU 2 1 5 9 4 4 2 C 1

RU 2 1 5 9 4 4 2 C 1

Изобретение относится к области медицины и биохимии и может быть использовано для определения концентрации гемоглобина в крови.

Гемоглобин, относящийся к классу хромопротеидов, состоит из бесцветного белка, глобина, и связанной с ним простетической группы - окрашенного железопорфиринового комплекса гема. Именно гем, придающий гемоглобину характерный алый цвет, является важнейшим объектом спектрофотометрического анализа, который лежит в основе большинства методов количественного определения гемоглобина.

Для измерения гемоглобина в крови были разработаны различные способы, основанные на исследовании окрашенного железопорфиринового комплекса - гема: способ Сали, сапониновый способ, пиридин-гемохромогенный способ (Кушаковский М.С. Клинические формы повреждения гемоглобина. - 1968).

Основным недостатком способа Сали является недостаточная точность из-за влияния белков плазмы на реакцию между гемоглобином и соляной кислотой, а также из-за влияния билирубина, освещения, изменения со временем цвета стандартных растворов солянокислого гематина. Суммарная ошибка при использовании способа Сали доходит до 30%. При использовании сапонинового способа не растворяются тельца Гейнца, гемолизат остается мутным, а спектр раствора может изменяться. Пиридин-хромогенный способ дает заниженные результаты.

Наиболее распространенным и унифицированным для определения содержания гемоглобина в крови является гемиглобинцианидный способ, согласно которому содержащиеся в крови различные формы гемоглобина трансформируют к одному устойчивому продукту - гемиглобинцианиду, а концентрацию гемоглобина определяют по результатам измерения оптической плотности этого продукта (Drabkin D. L. Bibl. haemat., Basel, Fasc.21). В процессе измерения используют набор реагентов, включающий трансформирующий агент и калибратор. Трансформирующий реагент содержит железосинеродистый калий, цианид натрия и натрий углекислый кислый. Железосинеродистый калий окисляет все формы гемоглобина в метгемоглобин, который образует с цианидом натрия окрашенный в красно-коричневый цвет прозрачный раствор гемиглобинцианида. Калибратор содержит раствор гемиглобинцианида с точно установленной концентрацией. Недостатком известного набора является использование в нем токсичного компонента - цианида натрия.

Наиболее ближайшим к заявленному набору - прототипом, является набор реагентов для определения концентрации гемоглобина в крови (Патент РФ N 2044319, кл. С 01 N 33/48, опубл. 20.09.95, Бюл. N 26), включающий реагент-комплексобразователь и калибратор. Реагент-комплексобразователь содержит, мас. %:

Додецилсульфат натрия - 0,03 - 0,15
Хлорид натрия - 0,9

Вода - Остальное
рН реагента - 7-7,5

Калибратор содержит известное количество гемоглобина, растворенного в реагенте-комплексобразователе, включающем додецилсульфат натрия. Способ измерения концентрации гемоглобина заключается в следующем: пробы крови обрабатывают

5 реагентом-комплексобразователем, включающим додецилсульфат натрия, который трансформирует все формы гемоглобина в гемихром, имеющий в растворе красно-коричневый цвет, измеряют оптическую плотность раствора на двух различных длинах волн, значения которых находятся в области 550-595 нм, определяют значение содержания гемоглобина по результатам этих измерений. Допустимая ошибка определения гемоглобина при использовании известного набора реагентов составляет $\pm 2\%$.

10 15 Недостатками известного набора реагентов является:
- недостаточная стабильность реагентов при хранении;
- необходимость проведения измерений оптической плотности раствора на двух различных длинах волн (550-595 нм).

20 25 Технической задачей предлагаемого изобретения является повышение стабильности набора реагентов для определения содержания гемоглобина в крови при сохранении высокой точности определения последнего.

30 35 Поставленная задача достигается предлагаемым набором реагентов, включающим реагент-комплексобразователь и калибратор, при этом реагент-комплексобразователь дополнительно содержит азид натрия, а калибратор дополнительно содержит тимеросал, взятые в экспериментально подобранных оптимальных концентрациях.

40 45 Предлагаемый набор реагентов включает реагент-комплексобразователь, содержащий 0,03-0,15% додецилсульфата натрия (SDS), 0,0003-0,001% азида натрия и воду (остальное), рН реагента 7-8, и калибратор гемихрома, содержащий известное количество гемоглобина в реагенте-комплексобразователе, 0,03-0,08% тимеросала и воду(остальное), рН калибратора 7-8.

50 Допустимая ошибка определения концентрации гемоглобина с использованием заявляемого набора реагентов составляет 1-2%.

55 Включение в состав реагента-комплексобразователя нового компонента - азида натрия позволяет повысить стабильность реагента и продлить срок его годности до 2-х лет, а срок годности рабочего раствора реагента продлить до 8 месяцев. Использование азида натрия в количестве менее 0,0003% не позволяет добиться повышенной стабильности

60 реагента-комплексобразователя, а использование азида натрия в количестве более 0,001% экономически нецелесообразно, так как не обеспечивает дальнейшего повышения стабильности реагента-комплексобразователя.

Включение в состав калибратора

тимеросала (этиленмеркуртиосалициловой кислоты натриевая соль) позволяет стабилизировать комплекс гемихрома за счет содержащихся в препарате S-связей. Тимеросал в количестве 0,03-0,08% обеспечивает стабильность калибратора до 12 месяцев.

Значение водородного показателя (рН) реагента-комплексобразователя и калибратора находится в пределах 7-8, что и требуется для получения стабильного спектра конечного продукта (гемихрома).

Для приготовления раствора калибратора используют очищенную эритроцитарную массу, к которой добавляют рассчитанный объем воды и получают модельный образец крови. Затем к раствору гемоглобина добавляют додецилсульфат натрия и тимеросал и получают реагент-калибратор с рН 7-8.

В таблице 1 представлены данные зависимости стабильности рабочего раствора реагента от используемого количества азид натрия.

В табл. 2 представлены данные по влиянию концентраций тимеросала на стабильность калибратора.

Из таблиц 1 и 2 видно, что использование азид натрия и тимеросала в оптимальных концентрациях позволяет повысить стабильность реагента-комплексобразователя и калибратора.

Определение концентрации гемоглобина в крови осуществляют следующим образом: к пробе крови (20 мкл) добавляют 5 мл реагента-комплексобразователя и через 5 минут измеряют оптическую плотность раствора на длине волны 540 нм. Содержание гемоглобина в крови (С) в г/л определяют по формуле:

$$C = \frac{A}{A_k} C_k,$$

где А - оптическая плотность исследуемой пробы, ед.опт.пл.;

C_к - концентрация гемоглобина в калибраторе, г/л;

A_к - оптическая плотность калибратора, ед.опт.пл.

Определяющими существенными отличиями предлагаемого набора реагентов для определения концентрации гемоглобина в крови по сравнению с прототипом являются:

- реагент-комплексобразователь дополнительно содержит азид натрия в количестве 0,0003-0,001%, что позволяет повысить стабильность реагента и срок годности его рабочих растворов;

- калибратор дополнительно содержит тимеросал в количестве 0,03-0,08%, что позволяет повысить стабильность последнего при хранении.

Поиск по источникам патентной и научно-технической литературе не выявил сведений о наборе реагентов для определения концентрации гемоглобина в крови, аналогичного заявляемому.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами конкретного выполнения.

Пример 1.

Предварительно готовят реагент-комплексобразователь и калибратор. Для приготовления

реагента-комплексобразователя в мерную колбу вместимостью 1 литр вносят 0,6 г додецилсульфата натрия, затем на микроаналитических весах взвешивают 5 мг азид натрия и переносят туда же, приливают 500 мл дистиллированной воды и перемешивают. Объем раствора доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Для приготовления калибратора взвешивают 0,6 г додецилсульфата натрия и 0,5 г тимеросала. Навески переносят в мерную колбу вместимостью 1 литр, приливают 3,10 мл эритроцитарной массы, добавляют 500 мл дистиллированной воды и перемешивают, после чего объем раствора доводят до метки дистиллированной водой и вторично перемешивают.

В результате получают набор реагентов для определения гемоглобина в крови, который включает

реагент-комплексобразователь, содержащий, мас. %:

Додецилсульфат натрия - 0,06

Азид натрия - 0,0005

Вода - Остальное

и калибратор, содержащий, мас. %:

Гемоглобин - 14,0

Додецилсульфат натрия - 0,06

Тимеросал - 0,05

Вода - Остальное

При этом значение рН реагента-комплексобразователя и калибратора составляет 7,3.

Пример 2.

Приготовление

реагента-комплексобразователя и калибратора осуществляют аналогично примеру 1.

Получают набор реагентов для определения гемоглобина в крови, который включает реагент-комплексобразователь, содержащий, мас. %:

Додецилсульфат натрия - 0,15

Азид натрия - 0,001

Вода - Остальное

и калибратор, содержащий, мас. %:

Гемоглобин - 15,0

Додецилсульфат натрия - 0,15

Тимеросал - 0,08

Вода - Остальное

При этом значение рН реагента и калибратора составляет 7,5.

Пример 2.

Приготовление

реагента-комплексобразователя и калибратора осуществляют аналогично примеру 1.

Получают набор реагентов для определения гемоглобина в крови, который включает реагент-комплексобразователь, содержащий, мас. %:

Додецилсульфат натрия - 0,15

Азид натрия - 0,001

Вода - Остальное

и калибратор, содержащий, мас. %:

Гемоглобин - 15,0

Додецилсульфат натрия - 0,15

Тимеросал - 0,08

Вода - Остальное

При этом значение рН реагента и калибратора составляет 7,8.

Пример 3.

Приготовление

реагента-комплексобразователя и

калибратора осуществляют аналогично примеру 1.

Получают набор реагентов для определения гемоглобина в крови, который включает реагент-комплексобразователь, содержащий, мас. %:

Додецилсульфат натрия - 0,03

Азид натрия - 0,0003

Вода - Остальное

калибратор, содержащий, мас. %:

Гемоглобин - 12,0

Додецилсульфат натрия - 0,03

Тимеросал - 0,03

Вода - Остальное

При этом значение pH реагента и калибратора составляет 7,3.

Использование предлагаемого набора реагентов позволит по сравнению с прототипом:

- повысить стабильность набора при хранении путем обеспечения срока годности реагента-комплексобразователя до 2-х лет, а калибратора до 12 месяцев;

- повысить функциональность и универсальность набора за счет обеспечения возможности работы с ним в тех же условиях, что и для набора реагентов для определения концентрации гемоглобина гемиглобинцианидным способом (оптическую плотность растворов измеряют при длине волны 540 нм).

Предлагаемый набор реагентов прошел клинические испытания и рекомендован к

серийному выпуску Комитетом по новой медицинской технике Минздрава РФ. Предлагаемый набор реагентов доступен для любой клинико-диагностической и поликлинической лаборатории и позволяет получать точные, достоверные результаты анализа, соответствующие лучшим зарубежным стандартам.

Формула изобретения:

Набор реагентов для определения концентрации гемоглобина в крови, включающий реагент-комплексобразователь на основе додецилсульфата натрия и воды при следующем соотношении компонентов, мас. %:

Додецилсульфат натрия - 0,03 - 0,15

Вода - Остальное

и калибратор, содержащий заданное количество гемоглобина, растворенного в додецилсульфате натрия, и воду, отличающийся тем, что

реагент-комплексобразователь дополнительно содержит азид натрия в количестве 0,0003 - 0,001 мас. %, а калибратор дополнительно содержит этиленмеркуртиосалициловой кислоты натриевую соль при следующем соотношении компонентов, мас. %:

Гемоглобин - 12,0 - 15,0

Додецилсульфат натрия - 0,03 - 0,15

Этиленмеркуртиосалициловой кислоты натриевая соль - 0,03 - 0,08

Вода - Остальное

Таблица 1

Содержание азидна натрия, %	Стабильность рабочего раствора реагента, мес.
0,0002	4
0,0003	6
0,0005	6
0,0008	8

Таблица 2

Срок хранения, %	Концентрация тимеросала, %	Концентрация гемоглобина в калибраторе, г/л
0	0,02	126,8
6	0,02	123,6
12	0,02	121,2
0	0,03	126,8
6	0,03	126,1
12	0,03	126,6
0	0,05	126,9
6	0,05	126,7

RU 2159442 C1

RU 2159442 C1

RU 2159442 C1

12	0,05	127,3
0	0,08	126,7
6	0,08	127,0
12	0,08	126,5

RU 2159442 C1