

**ОПИСАНИЕ
ИЗОБРЕТЕНИЯ
К ПАТЕНТУ**
(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) **ВУ** (11) **24143**

(13) **С1**

(46) **2023.12.30**

(51) МПК

G 01N 21/64 (2006.01)

G 01N 33/48 (2006.01)

(54) **СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЙ СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
КОНЦЕНТРАЦИИ БИЛИРУБИНА В ПРЕПАРАТАХ АЛЬБУМИНА
ЧЕЛОВЕКА**

(21) Номер заявки: а 20220276

(22) 2022.11.03

(71) Заявитель: Учреждение образования
"Белорусский государственный тех-
нологический университет" (ВУ)

(72) Авторы: Лазовская Олеся Илгамов-
на; Леонтьев Виктор Николаевич;
Крук Николай Николаевич (ВУ)

(73) Патентообладатель: Учреждение обра-
зования "Белорусский государствен-
ный технологический университет"
(ВУ)

(56) ЛАЗОВСКАЯ О.И. и др. Количествен-
ное определение билирубина в лекар-
ственных препаратах альбумина
человека методом флуоресцентной
спектроскопии. Вестник фармации,
2022, № 2 (96), с. 46-54.

RU 2089909 С1, 1997.

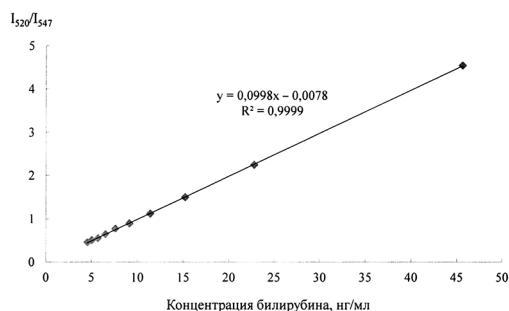
RU 2244935 С2, 2005.

US 5858695 А, 1999.

US 4895799, 1990.

(57)

Спектрофлуориметрический способ определения концентрации билирубина в препа-
рате альбумина человека, заключающийся в том, что препарат альбумина человека разво-
дят дистиллированной водой до концентрации альбумина 1,0 мг/мл, измеряют для
полученного раствора интенсивность флуоресценции связанного с альбумином билируби-
на на длине волны 520 нм при фотовозбуждении на длине волны 460 нм I_{520} , измеряют ин-
тенсивность полосы комбинационного рассеяния дистиллированной воды на длине волны
547 нм при фотовозбуждении на длине волны 460 нм I_{547} , рассчитывают отношение
 I_{520}/I_{547} и определяют концентрацию билирубина в препарате альбумина человека по заран-
нее построенному градуировочному графику зависимости отношения I_{520}/I_{547} от концен-
трации билирубина с учетом разведения.



Изобретение относится к аналитической химии, в частности к определению концентрации билирубина в препаратах альбумина человека методом флуоресцентной спектроскопии, и может найти применение в практике контрольно-аналитических лабораторий фармацевтических предприятий.

Препараты альбумина человека широко используются в инфузионной терапии критических состояний [1]. При этом эффективность лечения пациентов зависит от связывающей способности донорского альбумина, обеспечивающего транспорт токсичных соединений к органам биотрансформации [2]. Согласно [3, 4] при получении препаратов альбумина человека из плазмы крови здоровых доноров нормируют предельное содержание гемовых пигментов, а не продукта их распада - билирубина [5], обладающего наибольшим сродством к альбумину (константа связывания $K_b = 9,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) среди эндогенных метаболитов [6].

В плазме крови билирубин находится в свободном и связанном с альбумином состояниях. Будучи нерастворимым в водных средах, билирубин в комплексе с альбумином транспортируется в печень, где в процессе конъюгации с глюкуроновой кислотой становится водорастворимым и может выводиться из организма с желчью и мочой [7]. В норме содержание билирубина в плазме крови составляет 5-12 мг/л, из которых 75 % приходится на долю связанного с альбумином билирубина [8].

Известен вольтамперометрический способ определения концентрации связанного с альбумином билирубина в биологических жидкостях, основанный на электрохимическом окислении билирубина после его вытеснения бромфеноловым синим из комплекса с альбумином [9]. Недостатком способа является неполное извлечение билирубина из белкового комплекса за счет применения в качестве конкурентного агента бромфенолового синего, который по сравнению с билирубином характеризуется меньшим значением константы связывания с альбумином $K_b = 1,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ [6].

Известен способ определения концентрации связанного с альбумином билирубина в биологических жидкостях, заключающийся в извлечении билирубина из белкового комплекса с помощью анионных поверхностно-активных веществ с последующим ферментативным окислением в присутствии промотора, образующегося в результате удаления защитной группы из предшественника промотора с помощью соответствующего фермента, и измерении оптической плотности при 450 нм. По градуировочному графику находят концентрацию билирубина, которая пропорциональна изменению оптической плотности анализируемого раствора до и после ферментативной реакции [10]. К недостатку способа следует отнести использование в качестве агентов для освобождения билирубина из комплекса с альбумином таких анионных поверхностно-активных веществ, как додецилсульфат натрия и холат натрия, обладающих денатурирующим действием по отношению к ферментам [11].

Наиболее близким по технической сущности аналогом является спектрофлуориметрический способ определения концентрации билирубина в препаратах альбумина человека, заключающийся в последовательном внесении нескольких добавок билирубина в разбавленный дистиллированной водой препарат альбумина человека, измерении интенсивности флуоресценции свободного билирубина при длине волны испускания 520 нм (длина волны возбуждения 460 нм) после внесения каждой добавки билирубина, расчете интенсивности флуоресценции связанного с альбумином билирубина с учетом квантовых выходов флуоресценции свободного и связанного с альбумином билирубина, построении градуировочного графика зависимости интенсивности флуоресценции связанного с альбумином билирубина от концентрации добавленного билирубина с последующей экстраполяцией до пересечения с осью абсцисс и определении концентрации билирубина в препарате альбумина человека по точке пересечения градуировочного графика с осью абсцисс с учетом разведения [12]. Недостатком способа является необходимость построения градуировочного графика для каждого анализируемого препарата альбумина человека.

Задачей настоящего изобретения является разработка спектрофлуориметрического способа определения концентрации билирубина в препаратах альбумина человека, обеспечивающего универсальность, экспрессность и точность проведения анализа.

Поставленная задача решается тем, что предлагается спектрофлуориметрический способ определения концентрации билирубина в препаратах альбумина человека, заключающийся в том, что препарат альбумина человека разводят дистиллированной водой до концентрации альбумина 1,0 мг/мл, измеряют для полученного раствора интенсивность флуоресценции связанного с альбумином билирубина на длине волны 520 нм при фотовозбуждении на длине волны 460 нм I_{520} , измеряют интенсивность полосы комбинационного рассеяния дистиллированной воды на длине волны 547 нм при фотовозбуждении на длине волны 460 нм I_{547} , рассчитывают отношение I_{520}/I_{547} и определяют концентрацию билирубина в препарате альбумина человека по заранее построенному градуировочному графику зависимости отношения I_{520}/I_{547} от концентрации билирубина с учетом разведения.

Изобретение иллюстрируется фиг. 1-3.

Фиг. 1 - градуировочный график линейной зависимости отношения I_{520}/I_{547} от концентрации билирубина в разбавленных растворах препарата альбумина человека.

Фиг. 2 - спектры флуоресценции билирубина в разбавленных растворах препарата альбумина человека при фотовозбуждении на длине волны 460 нм.

Фиг. 3 - спектр комбинационного рассеяния дистиллированной воды при фотовозбуждении на длине волны 460 нм.

Изобретение поясняется примерами.

Пример 1.

Анализируемый препарат альбумина человека, раствор для инфузий 200 мг/мл, разводят дистиллированной водой до концентрации альбумина 1,0 мг/мл. Измеряют интенсивность флуоресценции связанного с альбумином билирубина в полученном растворе на длине волны 520 нм I_{520} (длина волны возбуждения 460 нм; ширина входной и выходной щелей 5 нм) и интенсивность полосы комбинационного рассеяния дистиллированной воды на длине волны 547 нм I_{547} (при той же длине волны возбуждения и тех же величинах щелей). Рассчитывают отношение I_{520}/I_{547} . Концентрацию билирубина в анализируемом препарате альбумина человека определяют по градуировочному графику зависимости отношения I_{520}/I_{547} от концентрации билирубина с учетом разведения.

Для построения градуировочного графика зависимости отношения I_{520}/I_{547} от концентрации билирубина (фиг. 1) используют препарат альбумина человека с известной концентрацией билирубина. Из препарата альбумина человека, раствора для инфузий 200 мг/мл, с концентрацией билирубина 4,56 мкг/мл путем разведения в интервале от 1000 до 100 раз готовят разбавленные растворы с концентрациями билирубина в интервале от 4,56 до 45,61 нг/мл. Измеряют интенсивность флуоресценции связанного с альбумином билирубина в полученных растворах на длине волны 520 нм I_{520} (длина волны возбуждения 460 нм; ширина щелей 5 нм) (фиг. 2) и интенсивность полосы комбинационного рассеяния дистиллированной воды на длине волны 547 нм I_{547} (при той же длине волны возбуждения и тех же величинах щелей) (фиг. 3). Рассчитывают отношение I_{520}/I_{547} в разбавленных растворах препарата альбумина человека с концентрациями билирубина в интервале от 4,56 до 45,61 нг/мл.

Установленное в соответствии с заявляемым способом значение концентрации билирубина в анализируемом препарате альбумина человека, растворе для инфузий 200 мг/мл, составляет 3,21 мкг/мл и хорошо согласуется с результатом, полученным по прототипу (таблица).

Пример 2.

Анализируемый препарат альбумина человека, раствор для инфузий 50 мг/мл, разводят дистиллированной водой до концентрации альбумина 1,0 мг/мл. Дальнейшие операции аналогичны примеру 1.

Установленное в соответствии с заявляемым способом значение концентрации билирубина в анализируемом препарате альбумина человека, растворе для инфузий 50 мг/мл, составляет 0,84 мкг/мл и хорошо согласуется с результатом, полученным по прототипу (таблица).

Результаты количественного определения билирубина в препаратах альбумина человека

Номер примера	Концентрация альбумина, мг/мл	Концентрация билирубина, мкг/мл	
		Заявляемый способ	Прототип
1	200	3,21	3,08
2	50	0,84	0,88

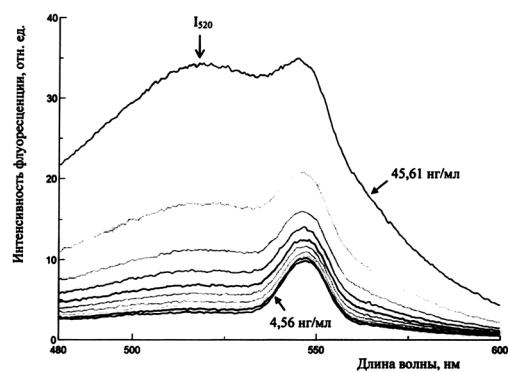
Таким образом, заявляемый способ позволяет определять концентрацию билирубина в препаратах альбумина человека, по сравнению с прототипом является экспрессным за счет использования универсального градуировочного графика и в то же время точным за счет применения внутреннего стандарта (полосы комбинационного рассеяния дистиллированной воды).

Изобретение может быть использовано на предприятиях фармацевтической промышленности.

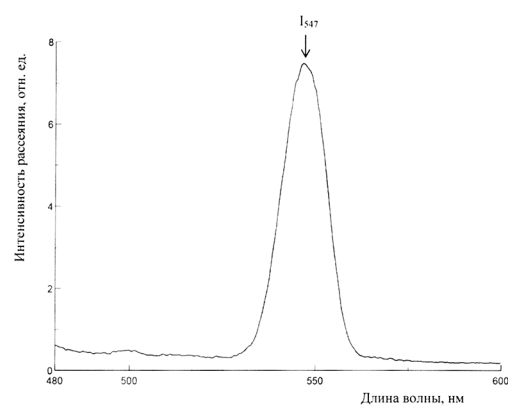
Источники информации:

1. БОРДАКОВ П.В. и др. Роль и место альбумина в инфузионно-трансфузионной терапии. Военная медицина, 2020, № 2, с. 24-27.
2. ХОХЛОВА Н.И. и др. Показатели связывающей способности сывороточного альбумина в клинической оценке эндогенной интоксикации при острых вирусных гепатитах. Клиническая лабораторная диагностика, 2007, № 8, с. 35-39.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации: в 4 т.: введ. в действие с 1 дек. 2018 г. приказом М-ва здравоохранения РФ от 31.10.2018 г. № 749. Москва: ФЭМБ, 2018, т. 4, 1833 с.
4. European Pharmacopoeia: in 3 vol. Strasbourg: Council of Europe, 2019, vol. 2, 1320 p.
5. KAPITULNIK J. Bilirubin: an endogenous product of heme degradation with both cytotoxic and cytoprotective properties. Molecular Pharmacology, 2004, vol. 66, N 4, p. 773-779.
6. VARSHNEY A. et al. Ligand binding strategies of human serum albumin: how can the cargo be utilized? Chirality, 2010, vol. 22, N 1, p. 77-87.
7. VITEK L. et al. Bilirubin chemistry and metabolism; harmful and protective aspects. Current Pharmaceutical Design. 2009, vol. 15, N 25, p. 2869-2883.
8. МЕНЬШИКОВ В.В. Лабораторные методы исследования в клинике. Москва: Медицина, 1987, 368 с.
9. US 10324097 B2, 2019.
10. US 5858695 A, 1999.
11. MUGA A. et al. Structural and functional studies on the interaction of sodium dodecyl sulfate with betagalactosidase. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1993, vol. 300, N 1, p. 451-457.

12. ЛАЗОВСКАЯ О.И. и др. Количественное определение билирубина в лекарственных препаратах альбумина человека методом флуоресцентной спектроскопии. Вестник фармации, 2022, № 2, с. 46-54.



Фиг. 2



Фиг. 3