

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК: 543.42; 543.43; 543.865.

©Коллектив авторов

МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЛАБОРАТОРНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ БЕЛКА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ (ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ МАТЕМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА)

Б.Ю. АЛЬТШУЛЕР¹, С.С. РАКОВ², Г.А. ТКАЧЕВ³

¹Городская клиническая больница №29 им Н.Э. Баумана, 111020, Москва,
Госпитальная площадь, д.2, тел:(095)-263-06-47, факс: (095) 263-26-30;

²Кафедра клинической лабораторной диагностики Российской медицинской
академии последипломного образования, 125101, Москва, 2-ой Боткинский
проезд, д.5, корп. 17, тел: (095) 945-84-00, факс: (095) 945-82-22;

³Кафедра высшей математики Московского Государственного Университета
Природообустройства, ул. Прянишникова, д.19, тел: (095) 976-16-50.

Изучено влияние соотношения альбуминов и глобулинов исследуемого образца на ошибку определения концентрации общего белка при использовании методов Брэдфорд, Лоури, пирогаллолового и сульфосалицилового. Обнаружено, что реагенты метода Лоури обладают большим сродством к глобулинам, а методов Брэдфорд, сульфосалицилового и пирогаллолового — к альбуминам. Биуретовый метод одинаково выявляет белки различной структуры, но обладает недостаточной аналитической чувствительностью. Зависимость ошибки определения каждым методом от белкового состава опытной пробы имеет нелинейный характер.

Установлено, что сочетанное определение концентрации белка двумя различными методами с использованием одного калибратора полностью устраняет аналитическую ошибку.

Предложена модификация сульфосалицилового метода, позволяющая значительно повысить точность определения концентрации белка.

Ключевые слова: общий белок, концентрация, лабораторные методы определения, фотометрия, калибровка, протеинурия.

ВВЕДЕНИЕ. Проблема определения концентрации белка насчитывает уже более 60 лет. Окончательно она не решена до сих пор. Очевидно, что создание "идеального метода" неосуществимо в силу уникальности структуры каждого белка.

Для определения концентрации общего белка широкое практическое применение нашли фотометрические методы [1-3], которые условно могут быть разделены на следующие группы:

- 1) Основанные на физико-химических процессах, с образованием в реакционной среде окрашенных веществ. В качестве последних могут выступать как специфические соединения, так и модифицированные молекулы самого белка.
- 2) Турбидиметрические методы, основанные на преципитации белков.
- 3) Прямая спектрофотометрия (метод Вартбурга). В этом методе используется способность ароматических аминокислот поглощать свет с длиной волны 280 нм.

Наибольшие методические сложности представляет определение низких концентраций белка, которые характерны для мочи, спинномозговой, синовиальной, слезной, выпотной, лаважной и др. жидкостей организма [4-7].

Для определения концентрации общего белка в моче унифицирован сульфо-салициловый метод, предложенный Кингсберри и соавт. в 1926 г [2,8]. Менее широко в работе клинико-диагностических лабораторий используются методы, основанные на применении красителя Кумаси G-250, биуретового реактива и растворов пирогаллола. О возможности использования Кумаси G-250 для определения концентрации белка Брэдфорд сообщила в 1976 г [9]. Этот реагент способен сорбироваться на белках, изменяя максимум поглощения: комплекс белок-краситель поглощает при длине волны 595 нм. Применение пирогаллола для определения концентрации белка в биологических жидкостях было предложено Вантанабе и соавт. в 1986 г [10]. Метод основан на связывании молибдата пирогаллола с белком в кислой среде. Максимум поглощения продуктов реакции составляет 600 нм [11,12]. В качестве референтного при определении низких концентраций белка, по-прежнему, рассматривается метод Лоури [13].

Целью настоящей работы явилось сравнительное исследование перечисленных методов лабораторного анализа, изучение влияния альбуминов и глобулинов в исследованных образцах (A/G коэффициент) на полученный результат и оценка обнаруженных закономерностей методами математической логики. Дополнительно планировалось разработка практических рекомендаций по уменьшению возможных аналитических погрешностей.

МЕТОДИКА. Работа выполнена с помощью биохимических автоанализаторов карусельного типа COBAS MIRA PLUS ("Hoffmann La Roche", Швейцария) и Eclips Plus ("Vitalab", Голландия).

Для стандартизации условий анализа и избежания возможных интерференционных влияний, белок определяли в специально приготовленных растворах с известной концентрацией. Были приготовлены 11 растворов белка с различным соотношением альбуминовых и глобулиновых фракций в диапазоне от 2,14 до 16,42. Из каждого такого раствора, путем разведения, создавались опытные пробы с расчетными концентрациями 0,1; 0,3; 0,5; 0,9; 2,7 г/л. Необходимые значения A/G коэффициентов были обеспечены смешиванием в разных пропорциях стандартного водного раствора альбумина и калибратора на основе сыворотки крови здорового человека ("Hoffmann La Roche"). Содержание глобулиновой фракции в калибраторе определялось на фирме-производителе и

было указано в его паспортных данных. Затем, содержание общего белка в этих опытных пробах для каждой концентрации и определенного A/G коэффициента определялось экспериментально.

При построении калибровочных графиков использовался водный раствор альбумина известной концентрации, из которого, в соответствии с заданной программой, биохимический анализатор создавал требуемые стандартные разведения. Аналогичным образом, для каждого изучаемого метода строился калибровочный график и по сывороточному калибратору. Калибровочные графики заносились в оперативную память аппарата и впоследствии использовались для анализа опытных проб.

При модификации сульфосалицилового метода было исследовано 75 образцов нормальной и патологической мочи.

Полученные результаты подвергались математическому анализу с использованием компьютерной программы Exel 5,0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В результате проведенных исследований нами выявлены следующие закономерности. Значения, получаемые для любого водного раствора белка всеми перечисленными методами, достоверно ($p < 0,001$) различны, причем, в разных растворах с одинаковой концентрацией белка одним и тем же методом, также, определялись различные значения. При этом, в некоторых образцах с одинаковым содержанием белка, определяемые концентрации разнились в 2 и более раза. Определение концентрации белка в растворах с известным содержанием, дает правильный результат лишь в том случае, когда, A/G коэффициент анализируемого образца соответствует A/G коэффициенту калибратора. В тех же растворах, альбумин-глобулиновый спектр которых отличается от калибровочного, выявляются либо более высокие, либо более низкие концентрации белка. При этом, влияние белкового спектра на аналитическую погрешность в значительной степени зависит от используемого метода.

Природа явления обусловлена, главным образом, аминокислотным составом белков. Альбумин и глобулины значительно различаются по содержанию глутамина, серина, триптофана, фенилаланина и цистеина [14]. Сравнивая калибровочные графики (рис. 1а, б), можно видеть, что величина сигнала фотопреобразователя в момент "конечной точки" определяется не только концентрацией, но и соотношением белковых фракций анализируемых проб.

Наиболее интересным представляется характер зависимости между определяемой концентрацией и белковым спектром раствора. Нами показано, что для методов, базирующихся на использовании сульфосалициловой кислоты, пирогаллола и Кумасси G-250, увеличение доли альбумина, при неизменной концентрации общего белка, сопровождается возрастанием сигнала фотопреобразователя. Для метода Лоури характерна обратная зависимость фотосигнала от белкового спектра. Такая закономерность отмечается во всем диапазоне концентраций от 0,1 до 2,7 г/л.

Математический анализ проводили с помощью аппроксимации статистических рядов гиперболическими функциями относительно неизвестного параметра кривой [15]. Было установлено, что зависимости между A/G коэффициентом растворов и определяемой в них концентрацией общего белка нелинейны во всех перечисленных методах, за исключением биуретового. С наименьшей погрешностью эти зависимости могут быть описаны следующими функциями:

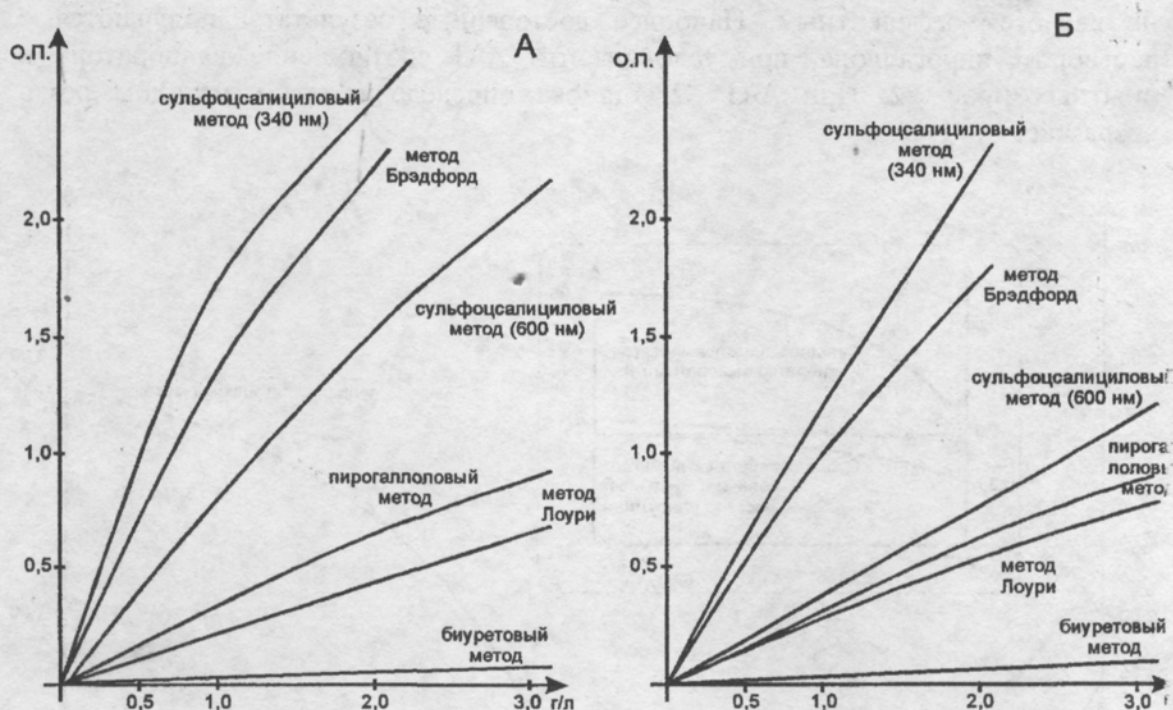


Рисунок 1.

Калибровочные графики для определения концентрации белка различными методами.

а. Калибратор — водный раствор человеческого альбумина. б. Сывороточный калибратор с А/Г коэффициентом — 2,14. Здесь и далее О.П. — оптическая плотность.

Для сульфосалицилового метода: $C(A/G) = 1,85 - [5,43 : (A/G + 4,42)]$;
 Для метода Лоури: $C(A/G) = 0,82 + [0,79 : (A/G + 1,12)]$;
 Для метода Бредфорд: $C(A/G) = 1,22 - [1,72 : (A/G + 4,73)]$;
 Для пирогаллолового метода $C(A/G) = 1,04 - [0,06 : (A/G + 0,20)]$, где:
 $C(A/G)$ — определяемая концентрация; (A/G) — альбумин/глобулиновое соотношение анализируемого образца биологической жидкости.

Полученные функции служат объективным количественным критерием способности метода выявлять различные белки. Так, реагенты метода Лоури обладают большим сродством к глобулинам. Для трех других методов, появление в составе пробы глобулинов, напротив, сопровождается занижением результата. Только биуретовый реактив одинаково окрашивает белки различной структуры.

Возникающая в лабораторной практике ситуация, показана на рис. 2. С правой и левой стороны по оси абсцисс отложены значения выявляемой концентрации, по оси ординат — значения А/Г коэффициента. Истинное содержание белка в любом анализируемом образце, условно, принято за единицу. В точке "В" $A/G = 0$, точкой "С" показан раствор чистого альбумина. Точка "А" может находиться в любом месте отрезка [BC]. Она соответствует опытной пробе, А/Г соотношение которой совпадает с таковым в калибраторе. В образцах, содержащих альбумина больше (интервал [AC]) или меньше (интервал [AB]), чем в калибраторе, будут определяться ошибочные значения. Максимально возможные для каждого метода, расчетные искажения правильного результата, отмечены на пересечении кривых с линиями абсцисс.

Как видно из представленного графика, ни один из исследованных методов не является референтным. Наиболее достоверные результаты получаются с раствором пирогаллола, при условии, что A/G соотношение калибратора и опытных проб >2 . При $A/G < 2$, ошибка определения этим методом резко возрастает.

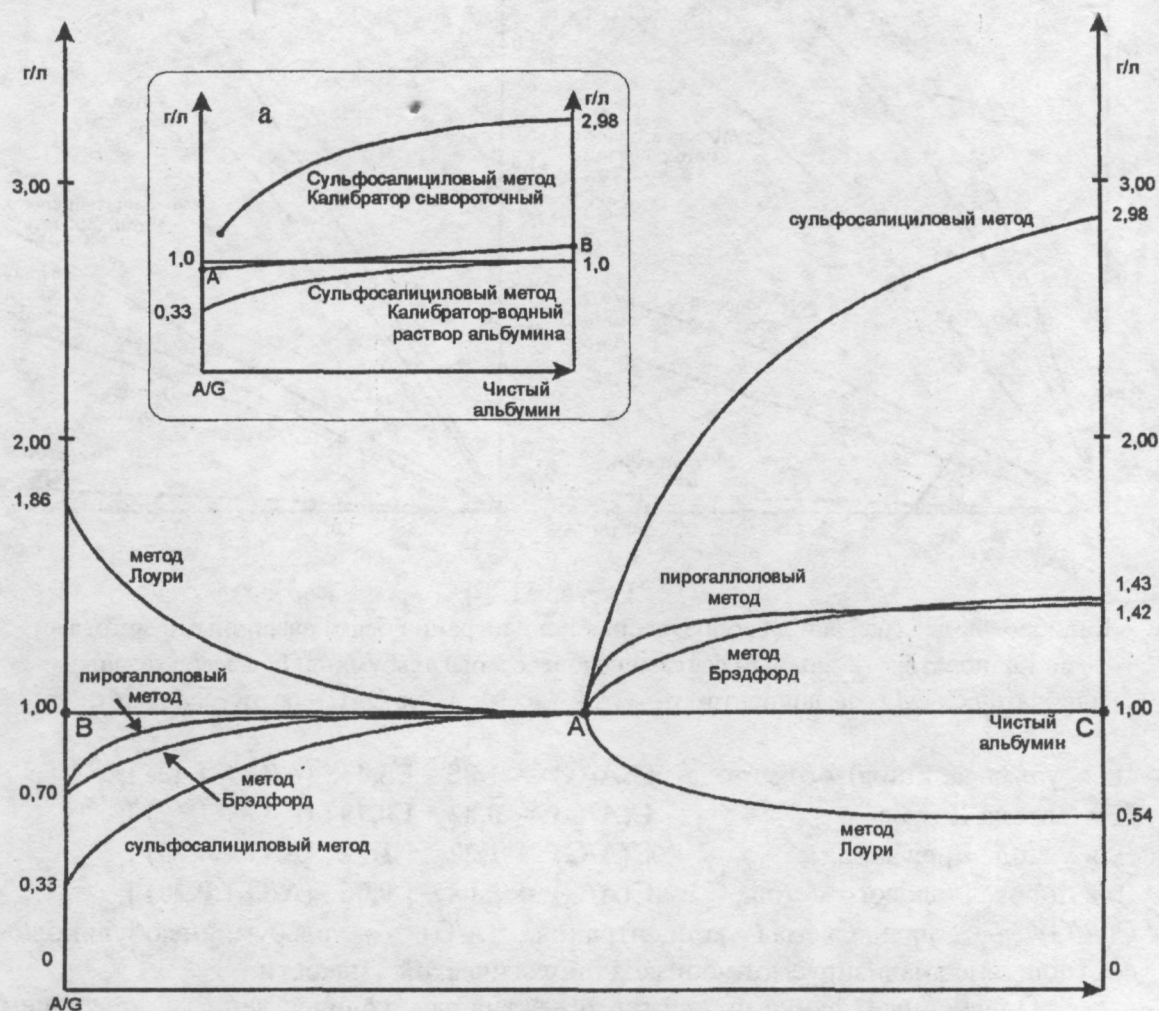


Рисунок 2.

Зависимость выявляемой концентрации общего белка от соотношения альбуминовых и глобулиновых фракций. Интервал АВ — концентрация альбуминов в образцах меньше, чем в калибраторе. Интервал АС — концентрация альбуминов в образцах больше чем в калибраторе. На врезке (а): Распределение концентраций общего белка, выявляемых унифицированным и модифицированным сульфосалициловым методом в зависимости от A/G соотношения.

Максимальная аналитическая ошибка присуща сульфосалициловому методу. При этом, в случае калибровки по водному раствору альбумина, ошибка определения может быть 3-х кратной. В присутствие глобулинов заниженным оказывается не только общее содержание белка в пробе, но и концентрация находящегося в ней альбумина. Не вызывает сомнения, что с клинико-диагностической точки зрения, такие погрешности недопустимы.

Чтобы уменьшить ошибку до естественной аналитической вариации, целесообразно определять белок двумя разными методами по одному

калибратору. Принцип подхода состоит в том, что разница между выявленными концентрациями зависит от A/G соотношения образца, зная которое можно вычислить ошибку каждого метода. В этом случае, расчет концентрации производится по формуле:

$$D = aX + bY, \text{ где:}$$

"a" и "b" — некоторые пересчетные коэффициенты, а X и Y — концентрации белка, полученные определенным методом.

Методы Брэдфорд, сульфосалициловый, пирогаллоловый и Лоури образуют шесть возможных комбинаций, для которых путем статистической обработки методом наилучшего приближения были найдены пересчетные коэффициенты.

Если, B — результат измерения с Кумасси G-250;
L — результат измерения с реактивом Лоури;
P — результат измерения с молибдатом пирогаллола;
S — результат измерения с сульфосалициловой кислотой;

Тогда, $D = 0,4799 B + 0,5230 L$;
 $D = 1,0748 P - 0,0986 B$;
 $D = 1,5484 B - 0,4825 S$;
 $D = 1,0104 P - 0,0289 S$;
 $D = 0,2167 S + 0,7579 L$;
 $D = 0,8959 P + 0,0845 L$;

С учетом всей значимости проблемы, особое внимание в нашем исследовании было уделено унифицированному для использования в клиничко-диагностических лабораториях сульфосалициловому методу.

Анализируя уротеинограммы здоровых и больных людей, мы пришли к выводу, что в подавляющем большинстве случаев белковый спектр мочи как в норме, так и при патологии, характеризуется A/G коэффициентом 0,6-3,0. "Нефротический тип" уротеинограммы, когда белковый спектр мочи представлен почти одним альбумином, встречается редко [16].

Зависимость ошибки анализа от A/G коэффициента опытной пробы может привести к тому, что у двух пациентов с совершенно различным содержанием белка в моче, лабораторно будут определяться одинаковые или близкие концентрации. Такое возможно, если пробы мочи этих пациентов имеют различный белковый спектр.

Все вышеизложенное позволяет сделать вывод, что в существующем ныне виде унифицированный сульфосалициловый метод неприемлем для оценки не только макропротеинурических, но, что особенно важно, также, и микропротеинурических состояний. Известно, что достоверное и своевременное выявление микропротеинурии имеет важное клиническое значение для диагностики метаболического синдрома, формирующейся артериальной гипертензии, ранней диагностики диабета и гиперлипидемических состояний [4,17-19]. В популяционных исследованиях микроальбуминурия выявлена у пациентов с лабильной гипертензией без диабета и нарушения толерантности к глюкозе, у практически здоровых людей с гиперлипидемией, у 10% здоровых людей старше 40 лет [20,21].

Применение простейшего математического аппарата позволяет

минимизировать аналитическую ошибку, которая возникает при определении концентрации общего белка в образцах с неизвестным A/G соотношением сульфосалициловым методом.

Исходя из практических соображений, при математической обработке результатов измерения [22-24] целесообразно ограничиться наиболее простой формой зависимости в виде линейной комбинации случайных величин X и Y , где X — концентрация общего белка, определенная относительно некоторого калибратора с минимальным значением A/G соотношения, а Y — концентрация общего белка, определенная относительно стандартного водного раствора альбумина. Тогда истинная концентрация D теоретически может быть вычислена по формуле $D = aX + bY$, в которой " a " и " b " — есть некоторые неизвестные коэффициенты. Эти коэффициенты должны быть такими, чтобы минимизировать ошибку вычисленной концентрации при любом ее значении. Для нахождения приемлемых значений " a " и " b " требовалось рассчитать так называемое "математическое ожидание" случайной величины X/Y . При расчете, мы использовали экспериментально полученные концентрации общего белка во всех приготовленных растворах (см. выше). С учетом количества сделанных измерений (по 11 A/G соотношений для каждого из 5 растворов, $n=55$) математическое ожидание при всех концентрациях от 0,1 до 2,7 г/л было равно $1,65 \pm 0,07$. Другими словами, результат измерения X был приблизительно в 1,65 раз "тяжелее" результата измерения Y . Для приведения системы материальных точек X и Y в равновесие за " a " принимается величина $1/2,65$ и за " b " величина $1,65/2,65$. Таким образом, $a = 0,377$ и $b = 0,623$. Из этого следует, что истинное значение концентрации D может быть вычислено по формуле:

$$D = 0,377 X + 0,623 Y.$$

Расчитанное таким образом значение концентрации будут находится на линии [AB] (рис. 2а). Это положение справедливо для всех анализируемых концентраций.

Проверочные расчеты показали удовлетворительную точность вычисления концентрации общего белка по приведенной формуле. В диапазоне A/G соотношения от 2 до 16 отклонение от правильного результата после коррекции с использованием данной методологии составляет не более 20 %.

Таким образом, уменьшение аналитической ошибки унифицированного метода в 15 раз может быть достигнуто за счет определения белка по двум калибровочным графикам с последующим пересчетом результата.

Представляет интерес кинетика процессов, которые развиваются после добавления к пробе преципитирующего агента.

Установлено, что учитываемое для расчета концентрации значение поглощения, отражает только определенное временное состояние реакционной среды. Исходя из общих теоретических соображений, поглощение реакционной среды в любой момент времени является результирующей одновременно протекающих процессов образования и укрупнения агрегатов, сорбции на них белковых и небелковых компонентов, осаждения образовавшихся комплексов и их дезагрегации.

Показано, что при использовании сульфосалициловой кислоты время окончания реакции зависит от концентрации белка в реакционной среде (рис. 3). Эта зависимость подчиняется степенной функции с отрицательным показателем:

$t = K/c^n$, где: t - время реакции, необходимое для такого изменения экстинкции, которое прямо пропорционально концентрации белка в реакционной среде; c -

концентрация белка; K и n - переменные, определяющиеся условиями реакции. При $t = 37^\circ\text{C}$, $K = 153$; $n = 1,28$. С понижением температуры реакции " K " уменьшается, а " n " увеличивается. При $t = 25^\circ\text{C}$, $K = 84$; $n = 1,77$.

После достижения конечной точки, изменение абсорбции, преимущественно, обусловлено осаждением белковых преципитатов. Возникающая аналитическая ошибка тем больше, чем выше концентрация белка и чем дальше отстоит фиксированное время измерения от момента завершения реакции (рис. 3). Как следствие, нарушается прямая пропорциональность между сигналом фотопреобразователя и концентрацией белка (рис. 4). Начиная с некоторого "пикового" содержания белка в пробе, осаждение преципитатов настолько выражено, что еще большее увеличение концентрации характеризуется не ростом, а, наоборот, снижением поглощения. Калибровочная зависимость, построенная путем аппроксимации результатов по нелинейному алгоритму, принимает, в этом случае, куполообразную форму, схожую с иммунотурбидиметрической кривой Хейдельбергера-Кендала.

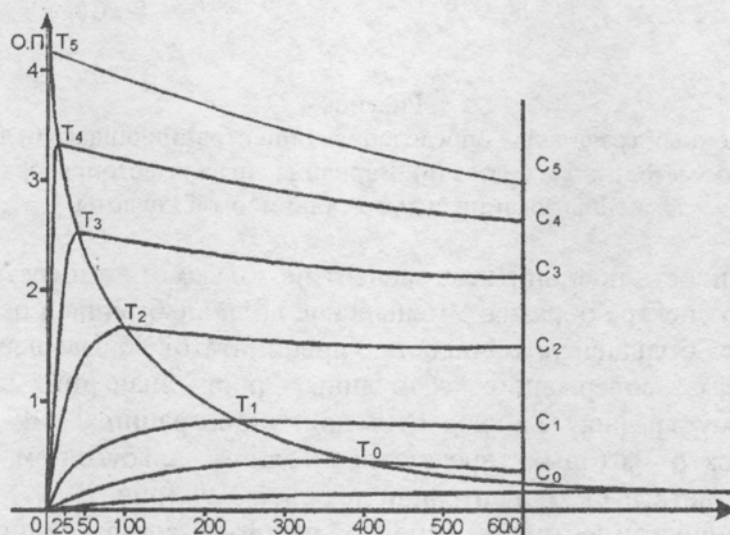


Рисунок 3.

Кинетика формирования преципитатов в растворе сульфосалициловой кислоты в зависимости от концентрации белка. ОП- оптическая плотность.

Поскольку скорость седиментации преципитатов подвержена значительной вариации, воспроизводимость калибровочной кривой, особенно в области высоких концентраций, очень невелика (рис. 4а). С другой стороны, при невысоких концентрациях белка, преципитация замедлена и ранняя остановка реакции приводит к занижению результата. Таким образом, приемлемое значение максимально допустимой ошибки и воспроизводимость измерений, могут быть обеспечены в определенном интервале концентраций, которым и определяется линейность метода. По нашим данным, при концентрации белка в исследуемых образцах от 0,1 до 2 г/л, температуре 37°C , длине волны считывания 600 нм и времени инкубации 250-400 секунд, ошибка анализа не превышает 10%.

С повышением температуры инкубации конечная точка при одной и той же концентрации достигается позднее, что, очевидно, объясняется меньшей скоростью седиментации преципитатов (рис. 5). Поэтому, повышение температуры, позволяет несколько увеличить линейность метода.

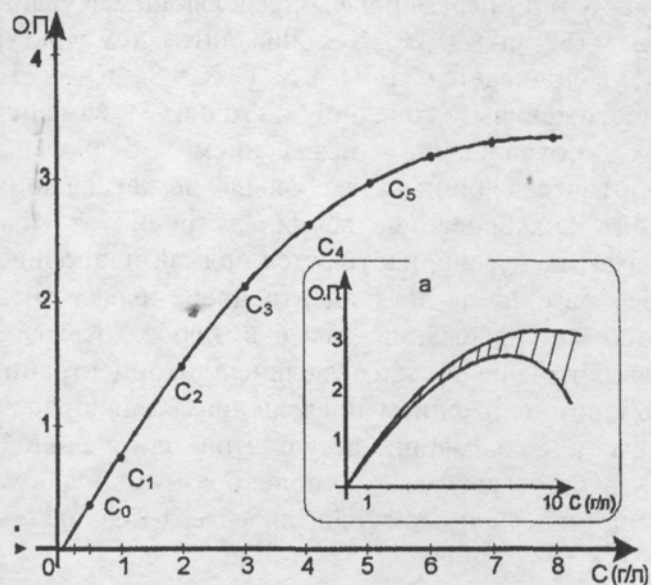


Рисунок 4.

Калибровочный график для определения концентрации общего белка сульфосалициловым методом. На врезке (а): Вариация сигнала фотопреобразователя при использовании сульфосалициловой кислоты.

Устойчивость преципитатов зависит не только от температуры (рис. 6), но и от белкового спектра образца. Уменьшение доли альбумина в белковом спектре сопровождается большей устойчивостью преципитатов во взвешенном состоянии. Так, в пробах, содержащих глобулины, рост значений поглощения по калибровочному графику наблюдается до концентраций 11-12 г/л. В пробах, белковый спектр которых представлен одним альбумином, максимальная абсорбция соответствует концентрации не более 8 г/л (рис. 7).

Изменение концентрации рабочего раствора сульфосалициловой кислоты от 3 до 20% и соотношения проба/реактив от 1/3 до 1/4, не влияет на получаемые результаты.

Важным аналитическим параметром является чувствительность методики, понимаемая как способность достоверно различать две близкие концентрации. Применительно к фотометрии, чувствительность метода прямо зависит от разницы значений абсорбции, характеризующих две близлежащие концентрации. Еще одним важным параметром — это погрешность, привносимая возможными интерферирующими агентами.

Были построены 2 калибровочных графика. Для одного из них значения поглощения, соответствующие определенным концентрациям, считывались на длине волны 340 нм. Для другого калибровочного графика и тех же концентрациях использовалась длина волны 600 нм. Показано что, при прочих равных условиях величины поглощения примерно в 2 раза выше на длине волны считывания 340 нм. Величина сигнала фотопреобразователя при использовании 3% сульфосалициловой кислоты и детекцией на 340 нм. оказывается сравнимой с фотосигналом, полученным для тех же концентраций методом Брэдфорд.

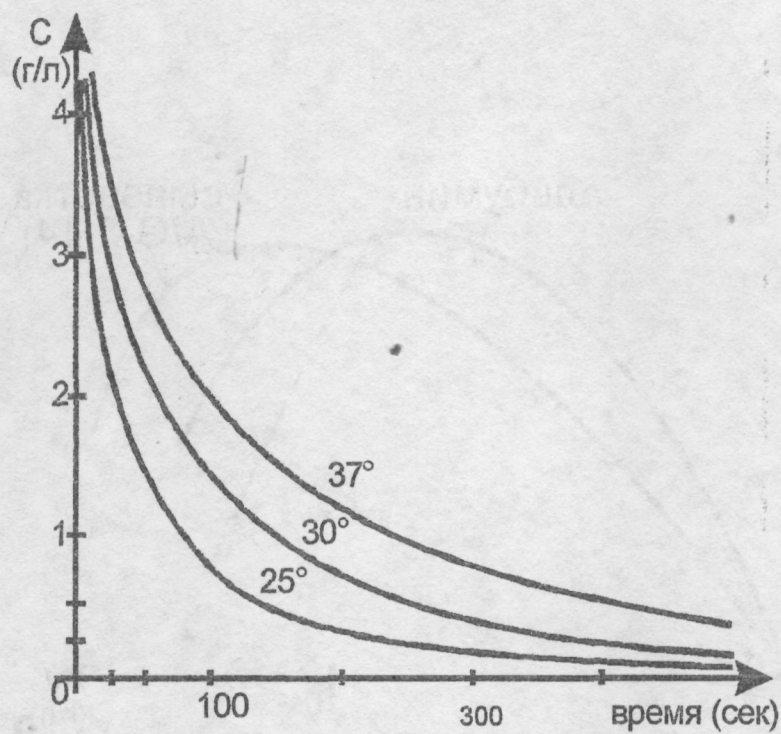


Рисунок 5.
Время завершения реакции преципитации в зависимости от температуры.

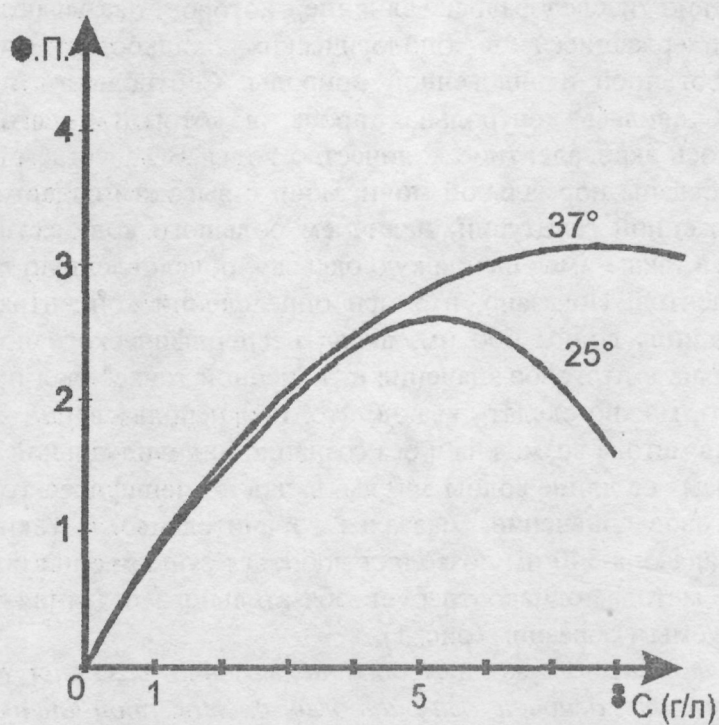


Рисунок 6.
Устойчивость преципитатов в растворе сульфосалициловой кислоты при различной температуре.

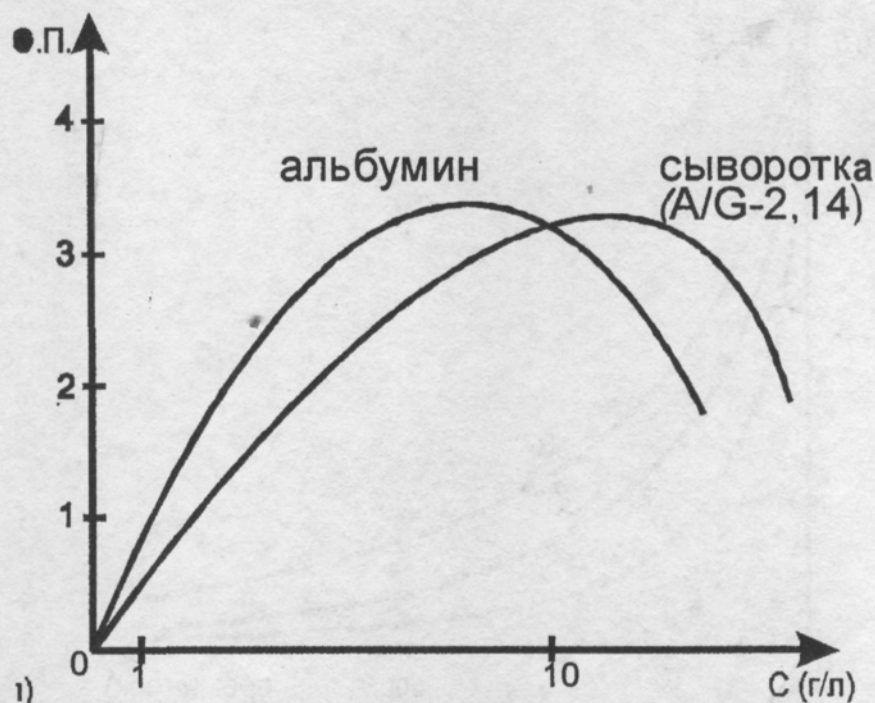


Рисунок 7.

Устойчивость преципитатов в растворе сульфосалициловой кислоты в зависимости от структуры белка.

Одновременно исследовалось влияние, которое оказывают на разных длинах волн содержащиеся в биологических жидкостях потенциальные интерференты экзогенной и эндогенной природы. Соотношение проба/реактив составляло 1/4. Ставилась контрольная проба, в которой вместо реактива к образцу добавлялось эквивалентное количество воды. В качестве опытных проб использовались образцы нормальной мочи, мочи с высоким содержанием белка, признаками выраженной гематурии, наличием большого количества клеточных элементов, солей, а также имеющей яркую окраску, обусловленную присутствием красящих компонентов. Показано, что при определении концентрации белка с использованием длины волны 600 нм, вклад неспецифического поглощения за счет окраски образца в итоговое значение в "конечной точке" был пренебрежимо мал. Учитывая это, можно сделать вывод, что, при использовании длины волны 600 нм, реализация метода возможна и без создания индивидуальной контрольной пробы. В то же время на длине волны 340 нм, вклад неспецифического поглощения образца в итоговое значение оказался значительным. Таким образом, использование диапазона 340 нм позволяет добиться существенно более высокой чувствительности метода, однако требует обязательного создания контрольной пробы с анализируемым образцом (рис. 1).

Как показало настоящее исследование, именно различия в структуре белков могут служить основой для наиболее достоверной оценки их общей концентрации.

По результатам данной работы сформулированы следующие методические рекомендации по определению низких концентраций белка в различных биологических жидкостях:

1) Для устранения аналитической ошибки низкие концентрации общего белка в биологических жидкостях необходимо определять двумя различными методами с

одним калибратором. Правильный результат может быть получен по одной из шести приведенных формул.

2) Предлагается использовать модификацию унифицированного сульфосалицилового метода. Рекомендуемая температура реакции — 37 °С; время инкубации от 250 до 400 секунд; линейность метода при длине волны считывания 600 нм от 0,1 до 2 г/л. Рекомендуется использовать 2 калибратора, один из которых приготовлен на основе человеческой сыворотки с минимальным значением А/Г соотношения, а другой представляет собой водный раствор альбумина. Расчет концентрации выполняется с использованием двух калибровок по формуле: $D = 0,377 X + 0,623 Y$, где:

X — концентрация общего белка, определенная относительно сывороточного калибратора с минимальным значением А/Г соотношения;

Y — концентрация общего белка, определенная относительно стандартного водного раствора альбумина.

Аналитическая ошибка, связанная с различным белковым составом проб, будет по-прежнему сохраняться, однако ее величина существенно уменьшится, что сделает получаемые результаты приемлемыми для клиницистов. Для измерения концентраций общего белка менее 0,1 г/л и уменьшения аналитической вариации целесообразно считывать экстинкцию при длине волны 340 нм. В этом случае, обязательно создание индивидуальной контрольной пробы с опытным образцом. Измеряемый диапазон при рабочей длине волны 340 нм от 0,01 до 1 г/л.

3) Использование биуретового метода, ввиду его низкой чувствительности, может быть рекомендовано только при наличии прецезионной аппаратуры. Калибровка должна выполняться непосредственно перед анализом серии опытных образцов.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Загребельный С.Н., Пупкова В.И. (1986) Количественные методы определения белка. Обзорная информация ВНИИ СЭНТИ, Москва.
- 2 Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. (1991) "Справочник биохимика", Мир, Москва, с. 464-467.
- 3 Туц.Н. (1997) Энциклопедия клинических лабораторных тестов, Москва, с.76-79.
- 4 Юренив А.П., Коздоба О.А., Вухерт А.М.(1986) Тер. архив, №6, 128-132.
- 5 Apperlo A.I., de Leenw D., Shuiter H.(1991), Brit. Med. J., **249**, 374-389.
- 6 Mac-Elderry L.A. et all (1982) Clinical. Chem., **28**, 356-360.
- 7 Mary V., O'Grady and Peter D (1990) Clinical Chem., **36**, 996-999.
- 8 Тодоров Й. (1961) Клинические лабораторные исследования в педиатрии, София, с. 50-51.
- 9 Bradford J.K.(1976) Anal. Biochem., **72**, 248-254.
- 10 Wantanabe N. et al. (1986) Clinical. Chem., **32**, 1551-1554.
- 11 Bergert J., Anderson R., Wilson D. et all (1990) Clinical Chem., **36**, 997-999.
- 12 McCormic C.P., Shihabi Z.K. et all (1990) Clinical chem., **36**, 999-1001.
- 13 Lowry O.H. et al (1951) Jornal Biol. Chem., **193**, 265-270.
- 14 Atlas of Chemical Laboratory Procedures (1989) Clinical Chem., NJ, **5**, 235-238.
- 15 Ван-дер-Варден В.Л. (1960) Математическая статистика, Изд. Иностр. лит., Москва, & 52;54, 257-272.
- 16 Кост Е.А.(1975) Справочник по клиническим лабораторным методам

- исследования, Москва.
- 17 *Башарова Н.Г., Шатило С.Б., Раков С.С. и др.* (1994) Клин. лаб. диагностика, №2, 25-27.
 - 18 *Раков С.С. и соавт.* (1994) Клин. лаб. диагностика, №2, 24-25.
 - 19 *Mogensen C.E., Christensen C.K.* (1984) N.Engl.J.Med., **311**, 89-93.
 - 20 *Apperloo A.I. et all.* (1994) Kidney Int., **45**, 174-178.
 - 21 *Maki D.D. et all.* (1995) Arch. Intern. Med., **155**, 1073-1080.
 - 22 *Ллойд Дж.* (1990) Справочник по прикладной статистике., Москва.
 - 23 *Поллард Дж.* (1982) Справочник по вычислительным методам статистики, Москва.
 - 24 *Урбах В.Ю.* (1963) Математическая статистика для биологов и медиков. Изд. АН СССР, Москва.

Поступила 02.04.00.

DETERMINATION OF LOW PROTEIN CONCENTRATION IN BIOLOGICAL FLUIDS. METHODOLOGICAL ASPECTS. (USAGE OF EXPERIENCE OF MATEMATICAL ANALYSIS)

B.Y. ALTCHOULER¹, S.S. RAKOV², G.A. TKACHEV³

¹Bauman Clinical Hospital №29, Hospital sq., 2, 111020, Moscow,
tel: (095) 263-06-47, fax (095) 263-26-30;

²Russian Academy of Postgraduate Education, Chair of Clinical Laboratory Diagnostics, 2nd Botkinsky prd, 5, 125101, Moscow, tel: (095) 945-84-00, fax: (095) 945-82-22;

³Moscow State University of Nature Development, Chair of Higher Mathematics, Pryanishnicova st, 19, Moscow, tel: (095) 976-16-50.

We investigated the effect of albumin/globulin ratio on the analytic error of protein determination. Several methods were used: Bradford, Lowry, pyrogallol-red, biuret, and sulfosalicylic acid.

Reagents used in Lowry method exhibit higher affinity to globulins, whereas reagents used in other methods have higher affinity to albumins. Although the biuret method demonstrated equal efficiency in determining concentrations of various proteins low sensitivity of this method limits its clinical applicability. For other methods there was non-linear dependence of the analytic error on protein composition in the sample. Combination of two methods for protein determination (using one calibrator) completely removes the analytic error.

Key words: total protein, concentration, laboratory methods, photometry, calibration, proteinuria.