



УДК 543.64

Иммобилизация пирогаллолового красного желатиновым гелем и использование композита для определения общего белка

Анисимович П.В.¹, Темердашев З.А.¹, Починок Т.Б.¹, Решетняк Е.А.²

¹Кубанский государственный университет, Краснодар

²Харьковский национальный университет им. В.Н.Каразина, Харьков

Поступила в редакцию 6.02.2015 г.

Изучена возможность использования для спектрофотометрического определения белка в биологических жидкостях твердофазного реагента на основе отвержденного желатинового геля, модифицированного пирогаллоловым красным (ПГК). Исследованы поведение ПГК и закономерности сорбции красителя в отвержденный желатиновый гель, изучен характер изменения кислотных свойств реагента при его переходе из раствора в слой желатинового геля.

Оптимизированы условия взаимодействия иммобилизованного в желатиновый гель ПГК с белком: подобрана концентрация реагента в исходном растворе, время контакта модифицированных желатиновых пленок с раствором белка, состав сукцинатного буфера. Разработана методика сорбционно-спектроскопического определения общего белка в биологических жидкостях, позволяющая детектировать аналит в биологических жидкостях в диапазоне концентраций $7 \cdot 10^{-3}$ до $7 \cdot 10^{-2}$ г/л с пределом обнаружения $6 \cdot 10^{-3}$ г/л. Проведена проверка правильности определения белка на модельных растворах и реальных объектах.

Ключевые слова: пирогаллоловый красный, сорбция, желатин, индикаторная пленка, общий белок, альбумин, глобулин, сорбционно-спектроскопический метод анализа.

Immobilization of pyrogallol red with gelatin gel and appliance the composite for total protein determination

Anisimovich P.V.¹, Temerdashev Z.A.¹, Pochinok T.B.¹, Reshetnyak E.A.²

¹Kuban State University, Krasnodar

²V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv

Reagent immobilization in condensed media can lead to the considerable change in properties of the used reagents and improvement of metrological characteristics of analytical methods. Transparent hard polymeric materials including hardened gelatin gel, which has considerable sorption power, are especially convenient for analytical purposes.

The objective of this work is investigation of regularities of sorption of pyrogallol red (PGR) in hardened gelatin gel and evaluation of possibilities of total protein determination in biological fluids with pyrogallol red, immobilized in gelatin matrix. Behavior of PGR, laws of dye sorption in hardened gelatin gel and changes in reagent acid properties during it transport from solution to the gelatin gel layer are investigated.

Condition of reaction between immobilized in gelatin gel PGR and the protein are optimized. The method of sorption-spectroscopic determination of total protein in biological fluids, which allows expanding of determined concentrations and decreasing of total protein detection limit, is developed. Calculated detection limit of total protein by means of this method is $6 \cdot 10^{-3}$ g/l, calibration curve is linear with analyte

concentration from $7 \cdot 10^{-3}$ to $7 \cdot 10^{-2}$ g/l. Transparency, mechanical durability, simplicity of making and color stability (when storing) of solid-phase reagent, make the developed sensor convenient for sorption-spectrometric and visual-test determination of protein on application for mass analyses.

Keywords: pyrogallol red, sorption, gelatin, indicator film, total protein, albumin, globulin, sorption-spectroscopic method of analysis

Введение

При проведении диагностических исследований важное место занимает определение малых количеств белка в биологических жидкостях. Данный аспект особенно важен при анализе мочи, спинномозговой, синовиальной, слезной и других жидкостей организма, которые характеризуются сложной матрицей и низким содержанием белка [1]. Недостаточная чувствительность большинства известных методик при определении низких содержаний белка в пробах, сложный состав анализируемой матрицы, искажающий результаты анализа, широкое варьирование белкового состава проб при различных заболеваниях, сложность выбора адекватного калибровочного материала и высокая трудоемкость процедуры анализа характерны для ряда известных методик [2,3].

Выбор конкретной методики определения белка для решения конкретных задач до сих пор остается предметом обстоятельных обзоров и исследований [4,5], и на сегодняшний день нет единой методики оценки содержания общего белка в биологических жидкостях. В ряде клиничко-диагностических лабораторий до сих пор используются так называемые «рутинные» методики определения белка, к которым относят турбидиметрический метод, биуретовый и метод Лоури. Однако они далеко не всегда позволяют получать надежные и воспроизводимые результаты [6].

Наиболее перспективными являются методы, основанные на связывании белка с органическими красителями. В результате реакции молекул белка с органическим красителем образуется окрашенное соединение, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации белка в пробе [1]. В качестве красителей используют кумасси бриллиантовый синий (КБС) [7], бромфеноловый синий (БФС) [8], бромкрезоловый зеленый (БКЗ) [9], но наиболее распространенным и универсальным реагентом для определения белка можно считать краситель пирогаллолсульфоталеин (пирогаллоловый красный) [10]. В основу данного метода положено связывание в кислой среде (pH 2.5) белками комплекса «пирогаллоловый красный (ПГК) - ионы молибдена (VI)», в результате чего наблюдается сдвиг максимума поглощения образующегося комплекса с 400 нм до 600 нм, что позволяет проводить определение белка в широком диапазоне концентраций. Комплекс устойчив к воздействию многих соединений, в том числе лекарственных препаратов, солей, оснований, кислот. Широкое применение данный метод получил после публикации [11], авторам которой удалось оптимизировать условия реакции и состав реакционной среды [12].

Недостатком данного подхода к определению белка в биологических жидкостях является различная чувствительность красителя к белкам разной природы, что приводит к ошибкам, связанным с различием в белковом составе анализируемой пробы и используемого калибратора (в качестве которого обычно используют стандартный раствор альбумина), а также недостаточная чувствительность методики.

В качестве подхода, позволяющего устранить мешающее влияние матрицы и увеличить чувствительность определения аналита, может быть использование твердофазных сорбентов, обеспечивающих концентрирование реагентов.

Иммобилизация реагентов в конденсированные среды может приводить к заметному изменению свойств используемых реагентов и метрологических характеристик аналитических методик. Одним из перспективных твёрдых носителей является отвержденный желатиновый гель, нанесенный на прозрачную полимерную основу, который, благодаря особенностям строения полимерной сетки желатина, обладает рядом важных аналитических свойств [13] и позволяет проводить измерения оптической плотности при инструментальных измерениях и визуальное тест-определение аналита.

Целью данной работы является исследование закономерностей сорбции пирогаллолового красного в отвержденный желатиновый гель и оценка возможности определения общего белка в биологических жидкостях с помощью ПГК, иммобилизованного в желатиновую матрицу.

Для разработки методики определения общего белка в биологических жидкостях изучены сорбционная способность желатина по отношению к пирогаллоловому красному и закономерности протекания реакции между белком и реагентом, иммобилизованным в отвержденный желатиновый гель.

Эксперимент

Приборы и реагенты. Методика проведения эксперимента. В работе использовали пирогаллоловый красный (ПГК) квалификации «чда» фирмы «ACROS organics», концентрированную соляную кислоту «х.ч», едкий натр «х.ч», хлорид натрия «х.ч», уксусную кислоту «х.ч», ацетат натрия «х.ч», янтарную кислоту «чда», натрий молибденовокислый 2-водный «чда», оксалат натрия «чда», этиловый спирт 95 об.%, калибратор «Общий белок» с концентрацией 60 г/л фирмы ООО «АГАТ – МЕД».

Растворы ПГК готовили растворением точной навески в дистиллированной воде. Растворы «общего белка» готовили непосредственно перед работой последовательным разбавлением исходного стандартного раствора с добавлением хлористого натрия. Для проведения реакции определения белка в биологической жидкости использовали сукцинатный буферный раствор с рН 2.5, содержащий янтарную кислоту 40-50 ммоль/л, оксалат натрия 1.0 ммоль/л, молибдат натрия 30-40 мкмоль/л.

Индикаторную пленку изготавливали из фотографического материала для офсетной печати фирмы AGFA с толщиной желатинового слоя ~20 мкм [14], из которого предварительно удалялись галогениды серебра коммерческими растворами Agfa Graphics NV (Belgium). Подготовленный таким образом фотографический материал был прозрачным, бесцветным и механически прочным. Извлечение ПГК из раствора в желатиновый слой проводили, выдерживая образцы пленки размером 24×14 см в титановой кювете с раствором красителя. После высушивания на воздухе пленку разрезали на полоски размером 0.7×2.0 см. Полученные равномерно окрашенные в красный цвет пленки хранили при комнатной температуре в темном закрытом месте. Как показали наши исследования, срок хранения пленок в указанных условиях весьма продолжителен (не менее 5 лет).

Для выбора оптимальных условий проведения индикаторной реакции варьировали концентрацию ПГК в модифицирующем растворе от $5.0 \cdot 10^{-5}$ до $1.0 \cdot 10^{-3}$ М.

Зависимость степени извлечения и сорбционной емкости желатина от времени изучали, выдерживая индикаторные пленки в растворах красителя. По

истечении установленного времени пленки извлекали из растворов и после высушивания фотометрировали при длине волны 540 нм. Аналогичный эксперимент проводили, исследуя зависимость степени извлечения и сорбционной емкости желатина от концентрации модифицирующего раствора в условиях фиксированного времени контакта индикаторных пленок с растворами реагента. Спектры поглощения растворов и индикаторных пленок регистрировали на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu). Пленки закрепляли в держателе непосредственно в кюветном отделении прибора.

Влияние кислотности среды на процесс сорбции проводили путем выдерживания сорбента в растворе красителя при различных рН в течение 50 минут. Кислотность растворов контролировали рН-метр-иономером «Эксперт-001» с комбинированным электродом, предварительно проградуированным по стандартным буферным растворам. Кислотность растворов варьировали добавлением соляной кислоты и едкого натра к исходному буферному раствору.

Влияние желатиновой матрицы на протолитические свойства пирогаллолового красного изучали спектрофотометрическим методом. Для этого измеряли оптические плотности растворов ПГК с различной кислотностью при различных длинах волн, а также оптические плотности пленок после их выдерживания в растворах ПГК с рН от 0 до 13, после чего рассчитывали константы кислотности красителя в водном растворе и «кажущиеся» константы кислотности в желатиновом геле.

Исследование реакции взаимодействия молекул белка с пирогаллоловым красным, иммобилизованным в желатиновую матрицу, проводили в присутствии сукцинатного буфера при рН 2.5. Для этого предварительно модифицированные пленки погружали в растворы белка с концентрациями от 0.01 до 2.00 г/л и выдерживали 20 минут. В зависимости от содержания белка в растворе они приобретали синюю окраску различной интенсивности. Фотометрирование индикаторных пленок проводили при $\lambda=600$ нм относительно модифицированной пленки, выдержанной в буферном растворе.

Проверку правильности определения общего белка проводили на модельных растворах и реальном объекте, в качестве которого использовали образцы плазмы крови.

Обсуждение результатов

Оптимизация условий иммобилизации металлоиндикатора в желатиновую пленку. В зависимости от кислотности среды ПГК может находиться в растворах в молекулярной форме, а также в виде депротонированного аниона или протонированных ионов. Для установления диапазонов преобладающего существования конкретных форм реагента были рассчитаны мольные доли всех возможных форм существования этой четырехосновной кислоты при различных рН с использованием величин констант кислотности [15,16]. Анализ спектров поглощения ПГК, иммобилизованного в желатиновую пленку из растворов с различным рН, указывает на смещение максимумов поглощения λ_{\max} на 15-20 нм, что является подтверждением взаимодействия красителя со средой желатинового геля. Оптическая плотность пленок после иммобилизации реагента из растворов с различной кислотностью максимальна в диапазоне рН от 2.8 до 4.3 (рис.1), что позволяет предположить, что в желатиновую матрицу преимущественно сорбируется форма H_3Ynd^+ .

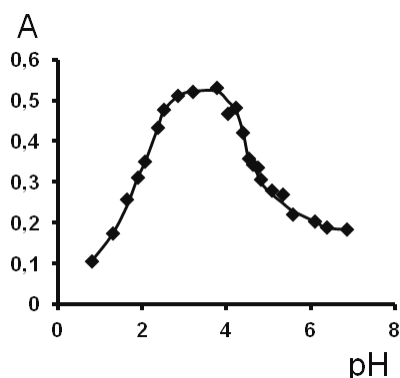


Рис. 1. Зависимость оптической плотности желатиновых пленок от pH раствора при λ 540 нм

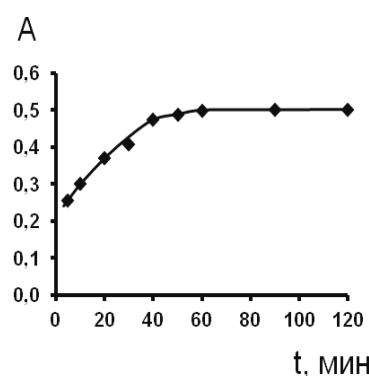
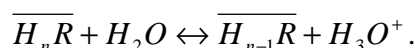


Рис. 2. Зависимость оптической плотности пленок от времени выдерживания в растворах ПГК (С (ПГК) = $1.9 \cdot 10^{-4}$ М, pH 4.0, λ 540 нм)

Для оценки влияния среды желатинового геля на протолитические свойства ПГК были рассчитаны «кажущиеся» константы диссоциации красителя в двухфазной системе «вода/желатиновая пленка» для реакции (чертой над формулами обозначены частицы, находящиеся в фазе желатина; заряд частиц красителя опущен)



В табл. 1 приведены значения констант протолитиза ПГК в водных растворах в двухфазной системе «вода/желатиновая пленка», константы кислотности красителя в водных растворах, а также значения pK'_a для индикатора в растворе и в пленке в присутствии катионного ПАВ (КПАВ) – цетримониум хлорид.

Полученные результаты показывают, что сорбция в желатиновый слой приводит к усилению кислотных свойств ПГК, особенно по второй константе кислотности, этот эффект среды коррелируют с влиянием катионного ПАВ на протолитические свойства красителя.

Оптическая плотность прозрачных носителей достигает предельного значения через 50 минут контакта сорбента с раствором (рис.2), аналогичный характер имеет зависимость степени извлечения ПГК от времени контакта фаз.

Таблица 1. Константы протолитиза пирогаллолового красного в различных средах

Константа	Среда	pK'_a ($p=0.95, n=7-11$)	pK'_a (КПАВ) ($p=0.95, n=7-11$)
pK'_{a1}	раствор	2.8 ± 0.1	2.6 ± 0.1
	желатиновая пленка	2.3 ± 0.1	2.2 ± 0.1
pK'_{a2}	раствор	6.6 ± 0.1	5.6 ± 0.3
	желатиновая пленка	4.7 ± 0.1	4.8 ± 0.2
pK'_{a3}	раствор	10.5 ± 0.3	10.8 ± 0.1
	желатиновая пленка	Не сорбируется в щелочной среде	Не сорбируется в щелочной среде

С увеличением концентрации ПГК в модифицирующем растворе степень извлечения реагента возрастает. Изотерма сорбции в исследуемом интервале концентраций имеет вид, характерный для непористых сорбентов с однородной

поверхностью (рис. 3), при дальнейшем увеличении концентрации красителя в модифицирующем водном растворе начинает выпадать осадок.

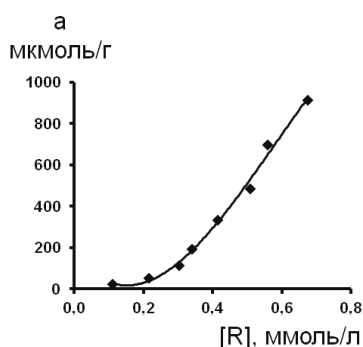


Рис. 3. Зависимость сорбционной емкости желатина от равновесной концентрации ПГК [R] (рН 4.0, λ 540 нм)

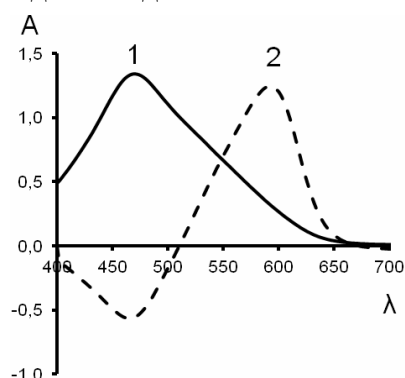


Рис. 4. Спектры поглощения растворов.
1 – Комплекс ПГК- Mo(VI) (Сукцинатный буфер с рН 2.5, $C_{\text{Mo(VI)}}=4.0 \cdot 10^{-5}\text{M}$; $C_{\text{ПГК}}=6.0 \cdot 10^{-5}\text{M}$);
2 - Комплекс ПГК-Mo(VI)-белок (Сукцинатный буфер с рН 2.5, $C_{\text{белка}}=1.0$ г/л ; $C_{\text{Mo(VI)}}=4.0 \cdot 10^{-5}\text{M}$; $C_{\text{ПГК}}=6.0 \cdot 10^{-5}\text{M}$)

Исследование реакции белка с ПГК в растворе. Анализ литературных данных для методик определения общего белка по реакции с ПГК показал, что на чувствительность реакции заметное влияние оказывает природа буферного раствора и специальные добавки, среди которых чаще всего в литературе упоминаются ионы Mo(VI) [10-12,17-18], которые образуют комплекс ПГК:Mo(VI), при связывании которого с молекулами белка в кислой среде (рН 2.5) происходит батахромный сдвиг до 600 нм [2].

Изучение спектров поглощения растворов (рис.4) с использованием сукцинатного буфера показывает, что в присутствии молибдат-ионов наиболее заметное изменение оптической плотности растворов при добавлении белка наблюдается при длине волны 600 нм. Градуировочный график линеен в диапазоне концентраций белка от 0.10 до 1.20 г/л, предел обнаружения 0.05г/л.

Исследование реакции белка с ПГК, иммобилизованным в желатиновую матрицу. В процессе исследования взаимодействия белка с ПГК, иммобилизованным в желатиновую матрицу, было отмечено, что после контакта модифицированных красных пленок с растворами белка, содержащими сукцинатный буфер с рН 2.5 и молибдат-ионы, сохраняется прозрачность пленок, они приобретают синюю окраску, интенсивность которой уменьшается с увеличением концентрации белка в растворе. Данный факт позволяет предположить, что макромолекулы белка не проникают в среду желатинового геля, а взаимодействие между реагентом и молекулами белка происходит в растворе. Закономерное уменьшение оптических плотностей пленок с увеличением концентрации белка в растворе позволило сделать предположение о возможности создания прозрачного чувствительного элемента на основе модифицированных ПГК желатиновых пленок для косвенного сорбционно-спектрофотометрического и визуального тест-определения белка в биологических жидкостях.

С учетом динамики формирования аналитического сигнала для дальнейших исследований выбрано время контакта модифицированных желатиновых пленок с раствором белка 20 мин. (рис.5).

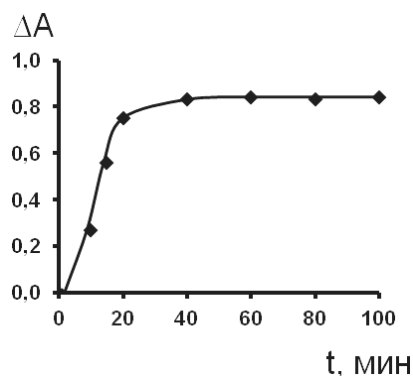


Рис. 5. Зависимость оптической плотности плёнок, модифицированных ПГК, от времени выдерживания в растворе белка (сукцинатный буфер с pH 2.5; $C_{Mo(VI)}=4.0 \cdot 10^{-5} M$, $C_{\text{белка}} 0.1 \text{ г/л}$; $\lambda=600 \text{ нм}$; $C_{\text{ПГК исх.}}=1.0 \cdot 10^{-3} M$)

Для удобства графического представления градуировочных зависимостей в качестве аналитического сигнала предложено использовать ΔA – т.е. разность оптических плотностей фоновой пленки и пленки после выдерживания в растворе аналита.

Исследование концентрационной зависимости аналитического сигнала показывает, что на чувствительность определения белка заметное влияние оказывает концентрация ПГК, иммобилизованного в пленку. Установлено, что для сорбционно-спектроскопического определения общего белка оптимальным является диапазон концентраций красителя в исходных растворах от $5.0 \cdot 10^{-4}$ до $1.0 \cdot 10^{-3} M$. С увеличением концентрации растворов ПГК, используемых для модифицирования желатиновых пленок, чувствительность методики возрастает. В случае модифицирования пленок из насыщенного раствора ПГК с концентрацией $1.0 \cdot 10^{-3} M$ тангенс угла наклона почти в два раза выше по сравнению с аналогичной величиной для концентрации красителя $5.0 \cdot 10^{-4} M$. В случае использования концентраций, меньших $5.0 \cdot 10^{-4} M$, пленки оказывались слишком бледными, а при концентрациях выше $1.0 \cdot 10^{-3} M$ реагент начинал выпадать в осадок. Присутствие этилового спирта (8 об. %) в буферном растворе приводит к незначительному снижению тангенса угла наклона градуировочной зависимости и сужению диапазона определяемых концентраций. Применение сукцинатного буфера с добавкой только молибдат-ионов обеспечивает наилучший коэффициент чувствительности градуировочных зависимостей ΔA от концентрации белка.

Рассчитанное значение предела обнаружения общего белка по данной методике составляет $6 \cdot 10^{-3}$ г/л, градуировочный график линеен в диапазоне концентраций аналита от $7 \cdot 10^{-3}$ до $7 \cdot 10^{-2}$ г/л.

В зависимости от содержания общего белка в исследуемых биологических жидкостях разбавление проб можно варьировать в соотношениях 1:(2-200), что позволяет определять аналит в биологических жидкостях в широком диапазоне концентраций.

Полученные нами экспериментальные данные показывают, что методика сорбционно-спектроскопического определения общего белка с использованием в качестве твердофазного реагента модифицированного желатинового геля по чувствительности превосходит аналогичную спектрофотометрическую методику определения общего белка для растворов, что позволяет использовать ее для клинического анализа проб с низким содержанием белка.

Проверка правильности разработанной методики на модельных растворах и реальных образцах плазмы крови показывает возможность использования данной методики для определения общего белка в биологических жидкостях (табл. 2 и 3).

Таблица 2. Проверка правильности методики определения общего белка на модельных растворах

Проба	Добавки к сукцинатному буферу с pH 2.5:	Введено общего белка·10 ² , г/л	Найдено общего белка·10 ² , г/л
1	Mo(VI)	2.0	2.2±0.2
	Mo(VI)+спирт (8 об.%)	2.0	2.3±0.3
2	Mo(VI)	4.0	3.8±0.3
	Mo(VI)+спирт (8 об.%)	4.0	4.3±0.3
3	Mo(VI)	5.0	4.8±0.3
	Mo(VI)+спирт (8 об.%)	5.0	5.2±0.3

Таблица 3. Проверка правильности методики определения общего белка в плазме крови методом «введено-найденно»*

Образец плазмы крови	Введено белка, г/л	Найдено белка, г/л
1	—	43±3
	30	67±5
2	—	40±3
	20	53±6
3	—	41±4
	10	49±4

*Данные таблицы приведены в пересчете концентраций на реальный объект.

Заключение

Полученные в работе результаты исследований показывают возможность использования прозрачного сорбента на основе отвержденного желатинового геля, модифицированного пирогаллоловым красным, для определения общего белка в сложных биологических объектах. Предлагаемая методика позволяет расширить диапазон определяемых концентраций и снизить предел обнаружения общего белка в биологических жидкостях. Прозрачность, механическая прочность твердофазного реагента, простота изготовления и стабильность окраски твердофазного реагента при его длительном хранении делают разработанный чувствительный элемент удобным не только для сорбционно-спектроскопического, но и визуально-тестового определения белка при массовых анализах.

Работа выполнена в рамках задания (проект 359) на выполнение государственных работ в сфере научной деятельности в рамках базовой части государственного задания с использованием научного оборудования ЦКП «Эколого-аналитический центр» и при финансовой поддержке гранта РФФИ № 13-03-96505-р_юг_а.

Список литературы

1. Пупкова В.И., Прасолова Л.М. Определение белка в моче и спинномозговой жидкости: Информационно-методическое пособие. Кольцово. 2007. 43 с.
2. 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 24-31.
3. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. М.: Медицина. 2000. 554 с.
4. Меньшиков В.В. Методики клинических лабораторных исследований. Том III. Клиническая микробиология. М.: Лабора, 2009. 880 с.
5. Ким Ю.В., Потехин О.Е., Токар М.И., Шибанов А.Н. Что мы измеряем в моче сульфосалициловым методом? // Лабораторная медицина. 2003. № 6. С 94-98.
6. Шибанов А.Н. Официальный сайт компании «Юнимед АО» <http://www.unimedao.ru/articles/6826/9674>. Дата обращения: 14.01.2015.
7. Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. pp. 248-254.
8. Стрелец Е.В., Егорова Е.Н. Способ количественного определения муцина // Патент РФ № 2250465, опублик. 20.04.2005.
9. Инструкция по применению набора реагентов для определения содержания альбумина в сыворотке и плазме крови человека АЛЬБУМИН ФС // Утверждена Приказом Росздравнадзора от 15 апреля 2009 г. № 3004 – Пр/09 РУ № ФСР 2009/04712 от 06.02.2009 г.
10. Fujita Y., Mori I., Kitano S. Color reaction between Pyrogallol Red – molybdenum (VI) complex and protein // Bunseki Kagaku. 1983. Vol. 32. pp. 379-386.
11. Watanabe N. Kamei 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. pp. 1551-1554.
12. 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. pp. 2233-2236.
13. Решетняк Е.А., Ивченко Н.В., Никитина Н.А. и др. Б. Индикаторные пленки на основе отвержденного желатинового геля с иммобилизованными металлоиндикаторами // Методы и объекты химического анализа. 2012. Т. 7. № 4. С. 192-201.
14. Темердашев З.А., Починок Т.Б., Тарасова П.В. и др. Исследование иммобилизации бромпирогаллолового красного в желатиновую матрицу и оценка возможности создания на ее основе оптически прозрачного сенсора для определения металлов // Аналитика и контроль. 2012. Т. 16. № 1. С. 39-45.
15. Suk V. Chemische indikatoren VI. Saurebasische eigenschaften von pyrogallol – und brompyrogallolred // Collect. Czechoslov. Chem. Commun. 1966. Vol. 31. No 8. pp. 3127.
16. Иванов В.М., Мамедова А.М. 3,4,5-тригидроксифлуороны как аналитические реагенты // Журнал аналитической химии. 2006. Т. 61. № 11. С. 1128-1151.
17. Шибанов А.Н., Свистов А.Е., Ким Ю.В. и др. Способ количественного определения белка в биологических жидкостях // Патент РФ № 2268476, заявл. 30.03.2004; опублик. 20.01.2006.
18. 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) // Утверждена Приказом Росздравнадзора от 20 июля 2010 г. № 6830 – Пр/10.

References

1. Pupkova V.I., Prasolova L.M. Opreделение belka v moche i spinnomozgovoi zhidkosti: Informatsionno-metodicheskoe posobie [Protein determination in urine and cerebrospinal fluid. Workbook] Kol'tsovo, 2007. 43 p.

2. Laricheva E.S., Andreev Yu.N., Kozlov A.V. Sposoben li metod opredeleniya belka v moche pirogallolovym krasnym pretendovat' na rol' osnovnogo? [Can method of protein determination in urine with pyrogallol red be a main?], *Laboratornaya diagnostika*, 2009, No 1, pp. 24-31.
3. Nazarenko G.I., Kishkun A.A. Klinicheskaya otsenka rezul'tatov laboratornykh issledovaniy [Clinical assessment of laboratory research results], M.: Meditsina, 2000, 554 p.
4. Men'shikov V.V. Metodiki klinicheskikh laboratornykh issledovaniy. Tom III. Klinicheskaya mikrobiologiya [Methods of clinical laboratory researches. Volume III. Clinical microbiology], M.: Labora, 2009. 880 p.
5. Kim Yu.V., Potekhin O.E., Tokar M.I. et al. Chto my izmeryaem v moche sul'fosalitsilovym metodom? [What do we measure in urine with sulfosalicylic method?], *Laboratornaya meditsina*, 2003, No. 6, pp. 94-98.
6. Shibanov A.N. Ofitsial'nyi sait kompanii «Yunimed AO» <http://www.unimedao.ru/articles/6826/9674>. Data obrashcheniya: 14.01.2015.
7. Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 1976, Vol. 72, pp. 248–254.
8. Strelets E.V., Egorova E.N. Sposob kolichestvennogo opredeleniya mutsina [The method of mucin quantitative determination], Patent RF № 2250465, opubl. 20.04.2005.
9. Instruktsiya po primeniyu nabora reagentov dlya opredeleniya sodержaniya al'bmina v syvorotke i plazme krovi cheloveka AL"BUMIN FS [Application instruction for reagent set for determination of albumin content in serum and blood plasma. ALBUMIN FS.], Utverzhdena Prikazom Roszdravnadzora ot 15 aprelya 2009 g. № 3004 – Pr,09 RU № FSR 2009/04712 ot 06.02.2009 g.
10. Fujita Y., Mori I., Kitano S. Color reaction between Pyrogallol Red – molybdenium (VI) complex and protein, *Bunseki Kagaku*, 1983, Vol. 32, pp. 379-386.
11. Watanabe N. Kamei 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, pp. 1551-1554.
12. J.L. Orsonneau, P. Douet, C. Massoubre et al. An improved pyrogallol red-molybdate method for the determining total urinary protein, *Clin. Chem.*, 1989, Vol. 35, pp. 2233–2236.
13. Reshetnyak E.A., Ivchenko N.V., Nikitina N.A. et al. Indikatornye plenki na osnove otverzhdennogo zhelatinovogo gelya s immobilizovannymi metalloindikatorami [Indicator films on the basis of gelatin gel with immobilized metal indicators], *Metody i ob"ekty khimicheskogo analiza*, 2012, Vol. 7, No 4, pp. 192-201.
14. Temerdashev Z.A., Pochinok T.B., Tarasova P.V. et al. Issledovanie immobilizatsii brompirogallolovogo krasnogo v zhelatinovuyu matritsu i otsenka vozmozhnosti sozdaniya na ee osnove opticheski prozrachnogo sensora dlya opredeleniya metallov [Study of immobilization of brompirogallolic red in the gelatinous matrix and evaluation the ability to create on its basis an optically transparent sensor for determination of metals], *Analitika i kontrol'*, 2012, Vol. 16, No 1, pp. 39-45.
15. Suk V. Chemische indikatoren VI. Saurebasische eigenschaften von pyrogallol – und brompyrogallolred, *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.*, 1966, Vol. 31, No 8, p.3127.
16. Ivanov V.M., Mamedova A.M. 3,4,5-trigidroksifluorony kak analiticheskie reagent [3,4,5-Trigidroksifluorony as analytical reagents], *Zhurnal analiticheskoi khimii*, 2006, Vol. 61, No 11, pp. 1128-1151.
17. Shibanov A.N., Svistov A.E., Kim Yu.V. et al. Sposob kolichestvennogo opredeleniya belka v biologicheskikh zhidkostyakh [The method of protein quantitative determination in biological fluids], Patent RF № 2268476, zayavl. 30.03.2004; opubl. 20.01.2006.
18. Instruktsiya RU №FSR 2007/01435 po primeniyu nabora reagentov dlya kolichestvennogo opredeleniya obshchego belka v moche i spinnomozgovoi zhidkosti s pirogallolovym krasnym (OBSHCHII BELOK PGK FS) [Application instruction for reagent set for determination of total protein in urine and cerebrospinal fluid with pyrogallol red (TOTAL PROTEIN PGK FS)], Utverzhdena Prikazom Roszdravnadzora ot 20 iyulya 2010 g. № 6830Pr,10.

Анисимович Полина Владимировна – аспирант факультета химии и высоких технологий Кубанского государственного университета, Краснодар

Темердашев Зауаль Ахлоович – д.х.н., профессор, зав. кафедрой аналитической химии Кубанского государственного университета, Краснодар

Починок Татьяна Борисовна – к.х.н. доцент, доцент кафедры аналитической химии Кубанского государственного университета, Краснодар

Решетняк Елена Александровна – к.х.н., доцент, доцент кафедры химической метрологии Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина, Харьков

Anisimovich Polina V. – postgraduate student, chemistry department, division of analytical chemistry, Kuban State University, Krasnodar

Temerdashev Zauual A. – Dr. Sn., professor, chief of analytical chemistry department, Kuban State University, Krasnodar

Pochinok Tatiana B. – PhD division of analytical chemistry, Kuban State University, Krasnodar; e-mail pochinokt@chem.kubsu.ru

Reshetnyak Elena A. – Ph.D., Associate Professor, Department of Chemical Metrology Kharkiv National University named after VN Karazin, Kharkiv