

Ю. А. Кечек

## Новая нефелометрическая методика определения белков и белковых фракций в сыворотке или плазме крови

В настоящее время с успехом применяются нефелометрические и фотонейфелометрические методы определения количества ряда веществ.

Эти методы обладают многими преимуществами перед другими аналитическими методами, как быстрота, легкость исполнения в сочетании с удовлетворительной точностью.

В отечественной и иностранной литературе опубликовано множество нефелометрических и фотонейфелометрических методик по определению белков, ферментов и белковых фракций: Рушняк [1], Поюровский [2], Клементьева [3], Клейман и Рона [4], Шмитц [5], Ланге [6], Эллиас [7], Рюсцнайк [8], [9] и др.

Фотонейфелометрические методы еще недостаточно внедрились в практику из-за отсутствия необходимой сложной аппаратуры; что же касается нефелометрических методов, то они до сих пор основывались на одном принципе, а именно: при определении количества какого-либо вещества приготавлился стандартный раствор определенной мутности из того же вещества. Как в стандартных, так и в испытуемых растворах, коагуляция вызывалась одними и теми же методами.

В принципе такая методика может считаться идеальной, ибо при соблюдении тех же условий должны получаться наименьшие ошибки. Однако оказывается, что на практике подобная методика не всегда легко осуществима, так как приготовление стабильных стандартных коллоидных растворов сложно и требует большого разнообразия реактивов, часто защитных коллоидов и т. п. Особенные затруднения возникают при определении количества веществ органического характера, в частности белков, благодаря чему эти методики не получают до сего времени широкого распространения.

Основным затрудняющим моментом следует считать приготовление самого стандартного белкового раствора, так как даже при наличии сухого препарата белка нельзя иметь гарантию в его чистоте, а главное, полученные растворы являются нестойкими и очень быстро портятся и для получения белковых растворов требуются определенные условия.

Из перечисленных методик в практику вошла методика Рушняка [1] для определения белковых фракций с различными модификациями.

Наличие хорошего и легко приготавливаемого стандартного раствора дало бы возможность определить количество белков и их фракций более точно и легко по сравнению с существующими методами.

В этом случае исключались бы все вышеуказанные недостатки и налицо были бы только положительные качества нефелометрического способа, а именно его быстрота и легкость в сочетании с удовлетворительной точностью.

Учитывая вышеизложенное, мы задались целью найти вполне годный мутный стандартный раствор для нефелометрического определения белков и их фракций. Попытки приготовления стандартных растворов из казеина,  $\text{CaC}_2\text{O}_4$ ,  $\text{BaSO}_4$  и др. не увенчались успехом. Наши поиски в этом направлении дали весьма положительный результат при применении мутного стандартного раствора хлористого серебра. Воспользовавшись данными Лэмба, Карлтона и Мельдрума [10], получавшие раствор хлористого серебра при определении хлора, нами был приготовлен таковой с применением этилового спирта и азотной кислоты со значительными видоизменениями и упрощениями. Этот золь отвечал всем требованиям нефелометрии к стандартному раствору [11].

Следующая наша задача заключалась в том, чтобы установить, какой концентрации белка соответствует опалесценция полученного нами стандартного раствора. Для этой цели мы пользовались формулой Ламберга-Бера [12] (как для сильно разведенного раствора).

$$С_{\text{белк.}} \cdot h_{\text{белк.}} = C_{\times} \cdot h_{\times}. \quad (1)$$

При одинаковой опалесценции обоих растворов.

Обозначим условно:

$C_{\times}$  — концентрация стандартного раствора;

$h_{\times}$  — его высота;

$С_{\text{белк.}}$  — концентрация белкового раствора;

$h_{\text{белк.}}$  — его высота.

Найдем что:

$$C_{\times} = \frac{С_{\text{белк.}} \cdot h_{\text{белк.}}}{h_{\times}}. \quad (2)$$

Следовательно, для нахождения  $C_{\times}$  необходимо знать произведение концентрации на высоту белкового раствора  $С_{\text{белк.}} \cdot h_{\text{белк.}}$  при какой-то постоянной высоте  $h_{\times}$  стандартного раствора.

Нетрудно заметить, что при постоянной концентрации и высоте стандартного раствора произведение  $С_{\text{белк.}} \cdot h_{\text{белк.}}$  (белкового раствора) также есть постоянная величина, хотя в отдельности величины  $С_{\text{белк.}}$  и  $h_{\text{белк.}}$  являются переменными. Обозначим это произведение  $С_{\text{белк.}} \cdot h_{\text{белк.}}$  условно через  $K$ .

Эта величина, измеряемая в  $\text{г/см}^3 \text{ мм}$ , может быть выведена, если известна концентрация белкового раствора и его высота по сравнению со стандартным раствором (с постоянной концентрацией и высотой).

Определение  $С_{\text{белк.}}$  надо было производить каким-либо другим методом. Мы выбрали рефрактометрический, как наиболее быстрый и дающий возможность проведения многочисленных исследований.

Близкие по величине значения  $K$  (в пределах ошибки опыта) будут служить доказательством как правильной обработки белковых

растворов, так и удовлетворительной стойкости и стабильности стандартного раствора.

Если, например, значение  $K$ , выведенное по большинству случаев без учета разведения, равно  $130 \text{ г/см}^3 \text{ мм}$ , то

$$C_x = \frac{K}{h_x} = \frac{130}{15} = 8,65 \text{ г/см}^3, \quad (3)$$

а с учетом разведения эту концентрацию надо еще разделить на степень разведения (напр., на 250, если сыворотка разводилась во столько раз). Тогда истинная концентрация стандартного раствора будет:

$$C_x = \frac{8,65}{250} = 0,0346 \text{ г/см}^3. \quad (4)$$

При этом белок с концентрацией  $0,0346 \text{ г/см}^3$  в растворе будет при данном осадителе давать ту же опалесценцию, что и стандартный раствор.

Ввиду того, что сыворотки при обработке также будут разводиться во столько же раз, во сколько и опытные, а нам необходимо знать их концентрацию в неразведенном виде, проще пользоваться (3) формулой для вычисления концентрации какого-либо неизвестного белкового раствора.

Эту же формулу следует применять в обратном порядке

$$C_{\text{белк.}} = \frac{C_x \cdot h_x}{h_{\text{белк.}}} \quad (5)$$

Если  $C_x = 8,65 \text{ г/см}^3$ ,  
 $h_x = 15 \text{ мм}$   
и  $h_{\text{белк.}}$  для данного  
случая равно 20 мм.

тогда 
$$C_{\text{белк.}} = \frac{8,65 \cdot 15}{20} = 6,5 \text{ г/см}^3.$$

Нетрудно заметить, что в формуле (5) в числителе стоят постоянные значения  $C_x$  и  $h_x$ , произведение которых дает то же значение  $K$ .

Таким образом, окончательная формула примет вид:

$$C_{\text{белк.}} = \frac{K}{h_{\text{белк.}}} \quad (6)$$

Итак, для разрешения поставленного вопроса необходимо было определить рефрактометрическим способом концентрации белковых растворов и умножить их на высоты столбов тех же растворов, полученных при нефелометрии, ставя стандартный раствор на определенной высоте. Если величины  $K = (C_{\text{белк.}} \cdot h_{\text{белк.}})$  в большинстве случаев окажутся близкими, возможно будет вывести концентрацию стандартного раствора.

Если же они будут сильно колебаться, значит в нефелометрической методике имеются большие погрешности, ибо рефрактометрическое определение проверено и дает стабильные результаты.

В действительности оказалось, что выведение более или менее

постоянного значения  $K$  является крайне сложной задачей. Для выяснения этого вопроса и уточнения условий для получения относительного постоянства этой величины пришлось поставить несколько серий опытов. Эти опыты производились после того, как мы убедились в отношении достаточной стойкости стандартного раствора.

*1-я серия.* Сыворотки разводились в 10 раз дистиллированной водой (по Клементьевой), 0,1 мл разведенной сыворотки коагулировался 5 мл полунасыщенного кислого сернокислого аммония.

Полученные мутные растворы сравнивались в нефелометре со стандартом, стоящим на определенной высоте. В тех же сыворотках определялись концентрации белков рефрактометрическим способом. Полученные значения  $S_{\text{белк.}}$  и  $h_{\text{белк.}}$  перемножались и выводились значения  $K$ . Подобных исследований было произведено около пятидесяти. Значение  $K$  колебалось в очень широких пределах и поэтому получались большие расхождения в процентах белка.

Таким образом, результаты этой серии оказались неудовлетворительными.

*2-я серия.* Сыворотки обрабатывались так же, как и в первой серии, но коагулировались трихлоруксусной кислотой; предполагалось, что причина погрешностей может исходить от осадителя. Было проведено 270 исследований. Значения  $K$  колебались от 59 до 132 г/см<sup>3</sup> мм, что давало также недопустимое расхождение в процентах белка. Поэтому данные этой серии также сочли неудовлетворительными.

Результаты проведенных опытов первых двух серий говорят о порочности подобного метода разведения белковых растворов, предложенного Клементьевой [3] и примененного Братковским [13].

*3-я серия.* Предполагая, что причина погрешностей заключается в методе разведения, в третьей серии оно стало производиться не в воде, а в физиологическом растворе в 10 раз. При этом в первых 85 случаях значения  $K$  колебались от 65 до 90. Из дальнейшей работы выяснилось, что фактор времени имеет большое значение в процессе мутеобразования, а этому обстоятельству до сего времени не придавалось никакого значения, и этот вопрос вовсе не освещен в литературе. Наши опыты показали, что муть, образованная при помощи трихлоруксусной кислоты, немедленно после разведения дает опалесценцию на 25—30% больше, чем муть, полученная из той же разведенной сыворотки уже через 1—2 минуты. После мутеобразования выжидание в течение 3—5 минут уже достаточно для наступления стойкой опалесценции, которая затем держится часами.

После подобной обработки значения  $K = S_{\text{белк.}} \cdot h_{\text{белк.}}$  стали колебаться в меньших пределах. Результаты этих исследований не приведены здесь, потому что мы вновь перешли к коагулированию аммоний сульфатом, как к более удобному и перспективному осадителю.

*4-я серия.* 0,1 мл разведенной сыворотки (10 раз) коагулировалась кислым полунасыщенным раствором аммоний сульфата.

В 80% случаев этой серии значения  $K = S_{\text{белк.}}$ ,  $n_{\text{белк}}$  стали колебаться в пределах от 140 до 160, но в 20% случаев имели больший предел (от 130 до 170), что давало расхождение в процентах белка, по сравнению с рефрактометром, около 1%. Подобную обработку мы также сочли непригодной и продолжили поиски новых способов разведения и коагулирования.

Зеленский [15, 16], выводя кривую высаливания для последующего определения белков фотометрическим способом, находит, что источником ошибок при различных методах высаливания может быть разрушение гидрофильных оболочек белковых частиц, которое, вероятно, происходит неравномерно, отчего вместо гомогенной мути получается коагуляция с образованием грубых частиц. Для борьбы с ней он рекомендует, по возможности, устранить механическое перемешивание. Однако становится непонятным, каким же образом он вызывает гомогенное мутеобразование? Ведь при коагулировании неразведенной сыворотки для образования мути рекомендуется встряхивание во избежание получения хлопьев.

Учитывая лабильность гидрофильных оболочек, мы попробовали разведение производить в 3% растворе поваренной соли, рассчитывая, что это положительным образом отразится на качестве мути.

**5-я серия.** Разведение производилось в 3% растворе поваренной соли в 5 раз; для коагулирования бралось 0,05 мл разведенной сыворотки. Сыворотка всегда центрифугировалась. Было проделано 76 исследований. В 78% случаев значения  $K$  колебались от 165 до 185, что давало при взятии среднего значения  $K$  процент расхождения до 0,5% белка, но в оставшихся 22% случаев расхождение достигло 1%, ибо значение  $K$  колебалось в более широких пределах. Поэтому и данную обработку мы сочли неудовлетворительной и перешли к следующей.

**6-я серия.** Так как результаты 5-й серии дали более удовлетворительные результаты, мы решили еще более повысить концентрацию раствора поваренной соли, поэтому в данной серии разведение производилось в 10% растворе поваренной соли, а в остальном повторялось то же. Всего было произведено 135 исследований. В 80% случаев значение  $K$  колебалось в пределах от 130 до 170, что давало расхождение до 1% при среднем  $K$ , а в оставшихся 20% они были еще выше, так как значение  $K$  колебалось от 130 до 200.

Следовательно, повышение концентрации раствора поваренной соли ухудшило результаты. Поэтому мы начали поиски новых способов разведения. Были испробованы буфера, а затем различные кислоты.

Первые опыты показали, что разведение сыворотки в 0,1 N растворе соляной кислоты резко улучшило результат, уменьшив колебания в значениях  $K$ .

**7-я серия.** Сыворотка разводилась в 0,1 N растворе соляной кислоты в 5 раз и для коагулирования бралось 0,1 мл разведенной

сыворотки, кроме того, сыворотка всегда центрифугировалась и бралась параллельная проба для каждой.

Всего было произведено 160 параллельных исследований. Почти в 95% случаев значение  $K$  колебалось от 110 до 130 и только в 5% случаев давало несколько большее расхождение.

Расхождение между параллельными пробами в большинстве случаев так же не превышало 5—7 единиц значения  $K$ , а иногда и полностью совпадало. Если учесть, что 10 единиц значения  $K$  соответствуют 0,5% белка, как показали наши вычисления, в проведенных в этой серии опытах значения  $K$  колебались от 110 до 130. Можно взять среднее значение 120, и тогда процент ошибки содержания белка по сравнению с рефрактометром не будет превышать 0,5, но, как указывалось выше, в 5% случаев мы имели большее расхождение в значениях  $K$  и поэтому занялись изучением причин этих расхождений.

Причины расхождений могут зависеть от обеих методик (рефрактометрической и нефелометрической), но в данном случае нам необходимо было, по возможности, исключить ошибки нефелометрического способа. Источником этих ошибок, по нашему мнению, могут быть: 1) степень разведения: наши исследования показывают, что увеличение степени разведения всегда ухудшает результат исследования; 2) характер разбавителя, причем кислая среда оказалась наиболее благоприятной; 3) время от момента разведения до момента коагулирования, ибо даже при данном способе разведения уже через 2 минуты степень мутности падала на 20—25%; 4) неоднородность сывороток (в особенности при малых количествах) может стать источником ошибок ввиду крайней чувствительности реакции. Это предположение подтверждается тем, что в случаях обработки несвежих или нецентрифугированных сывороток получались худшие результаты; 5) не совсем точная калибровка микропипеток может также быть причиной ошибки ввиду крайней чувствительности реакции (поэтому при проведении последней серии опытов пользовались одной и той же микропипеткой); 6) источником ошибок может быть и стандартный раствор.

Проведенная работа показывает, что при приготовлении стандартов точно, по всем правилам, указанным в методике, они дают вполне одинаковую опалесценцию, что неоднократно проверялось как сравнением стандартов между собой, так и сравнением различных стандартов с одними и теми же белковыми мутными растворами. Однако нарушение концентраций (в особенности основных) растворов, входящих в состав стандарта, перемена чередования реактивов, недостаточное перемешивание, промедление и другие неточные соблюдения метода его приготовления, безусловно, могут быть причиной его неправильности, что повлечет за собой изменение опалесценции.

Если к этим причинам прибавить также случайные, чисто технические, то станет понятной и причина имеющихся колебаний. Поэтому надо, по возможности, исключить их различными приемами.

Для выведения окончательного значения  $K$  (так как подсчет по-

казывал их колебания в большинстве случаев от 115 до 130) были выбраны три К со значениями 120, 122,5 и 125.

По этим коэффициентам нефелометрическим способом вычислялось количество белка и затем вновь сравнивались с данными рефрактометрии.

При всех трех коэффициентах в 70% случаев расхождение не превышало 0,5, в 25—28% расхождение получалось выше 0,5 и в 2—3% случаев расхождение немного превысило 1%. Наиболее подходящим оказался  $K=120$ , давший меньший процент расхождений, как по количеству случаев, так и по точности. Хотя процент ошибки намного уменьшился по сравнению с предыдущими методами обработки, но для получения более точных результатов мы прибегли к новым способам обработки.

С этой целью был применен новый прием, заключающийся в следующем: коагулируются 2 параллельные пробы совершенно одинаково. вышеописанным способом, а затем перед нефелометрированием они перемешиваются и образуется общая мутная взвесь. Подобная обработка сразу резко улучшила результаты, дав нам основание применить ее при разведении физиологическим раствором. Дело в том, что при разведении в кислоте отпала возможность определения также и фракций, ввиду того, что в кислой среде правильную фракционировку произвести невозможно, поэтому применение физиологического раствора было необходимо для создания именно комбинированной методики.

Для определения эффективности модификации, а также для доказательства правильности обработки таким способом была поставлена 8-я серия опытов.

*8-я серия.* Разведение производилось параллельно: и в кислоте и в физиологическом растворе, ставились всегда парные пробы, которые перемешивались перед нефелометрированием. При расчетах брались 2 значения К (120 и 125). Параллельно при разведении в физиологическом растворе, почти во всех случаях, определялась также глобулиновая фракция. Результаты представлены в сводной таблице 1.

При разведении в кислоте получены следующие данные:

При  $K=120$  в 90—92% случаев расхождения не превышали 0,2%, причем во многих из них совпадали. В оставшихся 8—9% случаев расхождения колебались от 0,2 до 0,5%. Выше этого расхождения не наблюдалось ни в одном случае.

При  $K=125$  в 90% случаев расхождения не превышали 0,5, а в 10% превысили 0,5%.

При разведении в физиологическом растворе.

При  $K=120$  в 67% случаев не превышали 0,2%, а в 20% колебались от 0,2 до 0,5%, а в 2—3% (именно в одном из 36) расхождение составило 0,53%.

При  $K=125$  в 66% случаев расхождение не превышало 0,5, а в оставшихся 34% превышало 0,5%.

Проведенная дифференцировка показывает, что последнюю пред-

Таблица 1

| К и с л о т а      |     |                       |                       | Физиологический раствор |     |                       |                                         |
|--------------------|-----|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-----|-----------------------|-----------------------------------------|
| Количество случаев | К   | Расхождение при К=120 | Расхождение при К=125 | Количество случаев      | К   | Расхождение при К=120 | Расхождение при К=125                   |
| 2                  | 115 | 0,25                  | 0,5                   | 5                       | 115 | 0,25                  | 0,5                                     |
| 2                  | 116 | 0,2                   | 0,45                  | 3                       | 116 | 0,2                   | 0,45                                    |
| 2                  | 117 | 0,15                  | 0,40                  | 5                       | 117 | 0,15                  | 0,4                                     |
| 6                  | 118 | 0,1                   | 0,35                  | 4                       | 118 | 0,1                   | 0,35                                    |
| 7                  | 119 | 0,05                  | 0,3                   | 5                       | 119 | 0,05                  | 0,3                                     |
| 4                  | 120 | —                     | 0,25                  | 5                       | 120 | —                     | 0,25                                    |
| 7                  | 121 | 0,05                  | 0,3                   | 3                       | 121 | 0,05                  | 0,3                                     |
| 4                  | 122 | 0,1                   | 0,35                  | 4                       | 122 | 0,1                   | 0,35                                    |
| 3                  | 123 | 0,15                  | 0,4                   | —                       | 123 | 0,15                  | 0,4                                     |
| 2                  | 124 | 0,2                   | 0,45                  | —                       | 124 | 0,23                  | 0,45                                    |
| —                  | 125 | —                     | —                     | 2                       | 125 | 0,25                  | 0,5. Сыво-<br>ротки гемо-<br>лизированы |
| Всего 39           | —   | —                     | —                     | 36                      | —   | —                     | —                                       |

ложенную обработку сыворотки следует считать вполне удовлетворительной и ее можно применить при обеих модификациях при значении  $K=120$ .

Альбумин-глобулиновый коэффициент, вычисленный при разведении в физиологическом растворе, также получался в пределах нормы.

## ОПИСАНИЕ МЕТОДИКИ

*1-я модификация.* При разведении кислотой. В данной модификации возможно определение только общего содержания белков нефелометрическим способом.

1. Приготовление раствора для определения общего количества белков (А+9).

В 2 колбочки наливается по 2,5 мл насыщенного раствора сульфата аммония с рН 6,5—6,8 и по 2,5 мл  $N/5 HCl$ . Реактивы наливается непосредственно перед определением. В 2 пробирки наливается по 0,4 мл 0,1N раствора  $HCl$  и туда же пропускается 0,1 мл сыворотки, перемешивается и той же микропипеткой набирается 0,1 мл разведенной сыворотки, которая немедленно пропускается в осадитель при энергичном перемешивании. Пипетка ополаскивается тем же раствором.

Через 3—5 минут образовавшиеся мутные растворы перемешиваются, и общая мутная взвесь сравнивается в нефелометре со стандартным раствором, стоящим на уровне 15 мм.

2. Приготовление стандартного раствора хлористого серебра. В чистую сухую колбочку наливается 1 мл 96% этилового спирта и 1 мл концентрированной азотной кислоты в разведении 1:4, смешивается и туда же прибавляется 4 мл 0,1 N раствора поваренной соли, снова хорошо взбалтывается и прибавляется точно 0,5 мл 0,002 N

$\left(\frac{N}{500}\right)$  раствора азотнокислого серебра, вновь хорошо смешивается и ставится на 10 минут в водяную баню с температурой 40°.

По истечении этого срока немедленно переливается в нефелометрический стаканчик и переносится в гнездо нефелометра.

**Примечание:** Для получения правильного стандарта рекомендуем придерживаться следующих правил:

1. За основной раствор принять 0,1N хлористый натрий, который готовится из химически чистого препарата точно. Затем следует иметь 0,1N раствор  $\text{AgNO}_3$ , который надо проверить по 0,1N  $\text{NaCl}$ . Точно так же количество  $\text{AgNO}_3$ , которое пошло на связывание, в 1 мл 0,1N  $\text{NaCl}$  налить мерную колбочку на 50 мл и долить водой до метки. Раствором 0,002N  $\text{AgNO}_3$  можно пользоваться в течение 10—15 дней, а раствором поваренной соли гораздо дольше. 2. Стандартным раствором можно пользоваться в течение 15—20 минут, если же исследование затягивается, рекомендуется либо приготовить новый стандарт, либо проверить старый первым или вторым белковым раствором.

**Расчет.** Для вычисления общего количества белка Сбелк. надо  $K=120$  разделить на высоту столба  $h_{\text{белк}}$ , полученную при сравнении со стандартом, стоящим на уровне 15 мм.

**2-я модификация.** Определение общего количества белка и его фракций.

1. Приготовление раствора для определения общего количества белков (альбуминов и глобулинов. А + 9).

Точно так же, как и в первой модификации, готовятся параллельно 2 пробы, только разведение сыворотки производится в 0,4 мл физиологического раствора.

2. Приготовление раствора для определения глобулинов (9) или глобулинов с фибриногеном в случае плазмы.

Также готовятся 2 параллельные пробы следующим образом:

2,5 мл насыщенного аммония сульфата и 2,5 мл дистиллированной воды наливаются в чистую сухую колбочку и туда же пропускается сыворотка, разведенная в 5 раз в физиологическом растворе. Затем пробы также сливаются и нефелометрируются со стандартом.

**Примечание:** При приготовлении 2 первых растворов в каждом случае необходимо произвести новое разведение и ни в коем случае не пользоваться повторно той же сывороткой. Кроме того, лучше пользоваться той же микропипеткой, по ее следует каждый раз промывать физиологическим раствором, а затем неразведенной сывороткой.

3. Приготовление раствора для определения фибриногена (F).

Его лучше готовить из неразведенной плазмы следующим образом:

1,35 мл насыщенного аммония сульфата с pH 6,5—6,8; 3,65 мл дистиллированной воды смешивается, пропускается 0,1 мл неразведенной плазмы. Фракция фибриногена получается в разведении 1:50, тогда как остальные все фракции — в разведении 1:250. Это обстоятельство следует учесть при расчетах.

Ввиду того, что сыворотка здесь не разводится, можно пользоваться одной пробой

4. Приготовление стандартного раствора. Готовится точно так же, как в первой модификации.

#### Расчет:

1. Для вычисления общего количества белка нефелометрическим способом, зная  $h_{\text{белк.}}$ , полученную при сравнении со стандартом.

$$С_{\text{белк. неф.}} = \frac{K}{h_{\text{белк.}}} = \frac{120}{h_{\text{белк.}}}$$

2. Для вычисления концентрации глобулинов

$$С_{\text{глоб.}} = \frac{K}{h_{\text{глоб.}}} = \frac{120}{h_{\text{глоб.}}}$$

или в случае определения фракций этим способом.

$$С_{\text{глоб.}} = \frac{С_{\text{белк. реф.}} \cdot h_{\text{белк.}}}{h_{\text{глоб.}}}, \text{ где } С_{\text{белк. реф.}} \text{ — это концентрация}$$

общего количества белка, определенная рефрактометрически.

Примечание: Если не удастся пронефелометрировать данный раствор со стандартом, стоящим на 15 мм, высоту стандарта надо уменьшить и сделать соответствующий пересчет.

3. Для вычисления концентрации фибриногена в случае плазмы, зная  $h_{\text{фибр.}}$

$$С_{\text{фибр.}} = \frac{K}{h_{\text{фибр. 5}}}; \text{ или } С_{\text{фибр.}} = \frac{С_{\text{белк. реф.}} \cdot h_{\text{белк.}}}{h_{\text{фибр. 5}}}$$

Результаты делятся на 5, чтобы приравнять к высотам других белковых растворов, которые были разведены в 5 раз больше, чем фибриноген.

#### Обсуждение результатов

Выработанная комбинированная методика имеет ряд преимуществ перед другими нефелометрическими методами благодаря применению стандартного раствора.

При определении белковых фракций существенным моментом в предложенной нами методике является сравнение обеих фракций со стандартом, а не между собой, что создает техническое удобство, так как стандарт, с одной стороны, остается неподвижным и меняется только содержимое одного стаканчика. Это упрощение намного ускоряет работу, особенно при массовых определениях. Так как данные здесь являются сравнительными, даже при нарушении точности стандарта, результаты будут правильными при правильной калибровке нефелометра, что также очень важно, ибо длительная работа с нефелометром показывает, что нарушение калибровки может произойти от перемены стаканчика, а главное от вращения лампочки и других причин.

Другим важным моментом следует считать обработку самих белковых растворов. Опыт нашей работы показывает, что разведение для получения из сыворотки нефелометрической взвеси, безусловно, необходимо, однако нельзя ни в коем случае пользоваться ранее предложенными методами разведения.

Обработка сыворотки, немедленно после разведения, а также сливание 2 параллельных проб, конечно, несколько увеличивает

объем работы по обработке, но, с другой стороны, значительно улучшает результат, что подтверждается нашими данными, которые всегда контролировались рефрактометром в случае коагулирования всех фракций.

Наряду с этим нами обрабатывались сыворотки другими методами, как методом Рушняка [1] (без разведения), так и по методу Братковского [13] с разведением по Клементьевой [3]. Как в том, так и в другом случае значения  $K$  колебались в очень широких пределах, в методике Рушняка от 180 до 280 и в методике Братковского от 160 до 350. Причиной ошибок при обработке сывороток без разведения (метод Рушняка) является образование хлопьев, которое наступает даже при тщательном соблюдении одних и тех же условий.

Следовательно, не все белки коагулируются в одинаковой степени и, даже при равномерной коагуляции глобулиновой фракции, результат, очевидно, будет неправильным.

При разведении по методу Братковского-Клементьевой [3, 13] ошибки получаются в еще больших пределах, поэтому этот метод следует считать непригодным, во-первых, потому, что разведение нельзя производить в воде, а главное, ни в коем случае нельзя пользоваться первым разведением при коагулировании глобулинов, как предлагают авторы, потому, что степень мутности при малейшем промедлении падает на 25—30%.

Следовательно, в этом случае неправильно обрабатываются обе фракции, почему результаты и не могут быть правильными.

В нашем способе мутная взвесь, содержащая общую сумму белков, поддается контролю и, если правильна фракционировка, результаты будут также вполне правильными, так как исключены источники ошибок, хотя было-бы весьма желательно подвергнуть контролю и глобулиновую фракцию, что мы не смогли сделать, за неимением электрофоретической установки.

В случае определения, наряду с фракциями и общего содержания белка, стандарт должен быть приготовлен тщательно, так как здесь мы имеем дело с абсолютными данными, причем тогда отпадает необходимость рефрактометрирования. Это имеет особо важное значение в тех случаях, когда по каким-либо методическим причинам сыворотки приходится разводить, ибо наши опыты показывают, что рефрактометрия при разведении сыворотки или плазмы начинает давать искаженные результаты [14]. Нефелометрия дает вполне удовлетворительные результаты, если разведение и обработку производить по правилам, указанным в методике. Кроме того, рефрактометрия совершенно не применима при исследовании растворов чистого белка с малой концентрацией (ниже 3‰), так как данные получаются либо совершенно искаженными, либо полученные коэффициенты преломления не попадают в область показаний таблицы. Нефелометрия и в этом случае дает вполне удовлетворительные результаты.

В данной методике можно также комбинировать приемы, поль-

зуюсь одновременно и нефелометром и рефрактометром, которые проверяют друг друга.

Это особенно важно для неопытных работников, почему и на первых порах овладения данной методикой рекомендуется проверять свои данные обоими аппаратами, не забывая при этом о всех правилах, указанных в методике, как в отношении стандартного раствора, так и при обработке белковых растворов.

### В ы в о д ы

1. Описан метод приготовления стандартного раствора, вполне пригодного для нефелометрирования белковых растворов. Стандартный раствор готовится в виде взвеси хлористого серебра и приготовление его может быть выполнено в любой лаборатории.

2. Разработанная комбинированная методика дает возможность определения общего количества белка, а также белковых фракций исключительно нефелометрическим способом, причем общее количество белков может быть произведено двумя модификациями.

3. При разработке методики с применением стандартного раствора выяснилось, что падение степени мутности получаемых растворов зависит от времени, истекающего от момента разведения до момента коагулирования. Изменение дисперстности и оптического эффекта коллоидной системы, безусловно, указывает на изменение структуры белковых мицелл, происходящих, вероятно, вследствие лабильности их гидрофильных оболочек.

4. Разработанная комбинированная методика позволила выявить недостатки ныне применяемых способов определения белковых фракций как без разведения, так и с разведением (Рушняк, Братковский), дающих не менее 30—40% ошибок.

5. Применение стандартного раствора позволило выявить ряд косвенных причин, влияющих на мутеобразование белковых растворов, также создающих погрешность нефелометрических способов, и дать правильный способ обработки белковых растворов.

6. Разработанная методика позволила значительно сократить количество расходуемых реактивов и применить совсем несложную аппаратуру, доступную любой лаборатории.

6. Длительная работа с нефелометром показывает, что показания нефелометра отличаются большой чувствительностью, значительно превышающую чувствительность колориметра, следовательно ошибки при самом процессе нефелометрирования крайне ничтожны при отсутствии посторонних оттенков.

7. Разработанная комбинированная методика создает перспективы применения стандартного раствора для определения как органических, так и неорганических веществ.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Рушняк. Руководство по лабор. методам исследования, стр. 176. Предтеченский В. и др., 1950.
2. Пожоровский С. Биохимия, 3, 6, 713, 1938.
3. Клементьева А. Лабораторная практика, 11, 16, 1941.
4. Kliman und Rona. Цит. Die Methoden der Fermentforschung, Band I, 4363, 915, 1943.
5. Schmitz A. Biochem. Z. 273, 132—134, 1934.
6. Lange C. Koll. Z. 68, 69, 1934.
7. Elias. Цит. Die Methoden der Fermentforschung, Band I, 1164, 921, 1943.
8. Rusznayk Biochem Z. 141, 476, 479, 1923.
9. Rusznayk. Химия белка. Сборник статей, 28—40, 1949.
10. Лэмб, Карлсен и Мелдрум-Йоу. Нефелометрия, 134, 1936.
11. Йоу. Нефелометрия, 44, 1936.
12. Ламберт, Бер. Цит. по Йоу. Нефелометрия, 69, 1936.
13. Братковский Р. Практические занятия по биохимии, Астанин П. 1902, 1951.
14. Позднеева Н. и Газенко Г. Лабораторная практика, 11, 20, 1941.
15. Зеленский Н. Медитичный журнал, 20, 3, 62, 1950.
16. Зеленский Н. Медитичный журнал, 21, 1, 84, 1951.

## Յու. 2. Գեյել

ՆՈՐ ՆԵՖԵԼՈՍԵՏՐԻԿ ՄԵԹՈԴ ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ԵՎ ՆՐԱՆՑ  
ՖՐԱԿՑԻԱՆԵՐԻ ՈՐՈՇՄԱՆ ԱՐՅԱՆ ՇԻՃՈՒԿԻ ԿԱՄ ՊԼԱՋՄԱՅԻ ՄԵՋ

## Ա Մ Փ Ո Փ Ո Ւ Մ

Դրականության մեջ նկարագրված են մի շարք փոփոխությունների և ֆոֆոնների ֆեյլմետրիկ քանակական անալիզի մեթոդներ, որոնք մեծ տարածում չունեն ապարատուրայի բարդ լինելու պատճառով: Նեֆելոմետրիկ (պղտորաչափ) քանակական անալիզի մեթոդներն ունեն մի շարք առավելություններ մյուս քանակական մեթոդների հանդեպ, բայց միաժամանակ ունեն և թերություններ, որոնց պատճառով մինչև այժմ քիչ են կիրառվում: Այդ թերությունները լիսում են նրանից, որ տվյալ որոշումը կատարելիս պահանջվում է ունենալ պղտոր ստանդարտ լուծույթ, որը պատրաստվում է նույն ձևով, ինչ որ հետազոտելի լուծույթը: Որոշ օրգանական նյութերի քանակական որոշումը, օրինակ սպիտակուցների, շատ է դժվարանում ստանդարտ լուծույթի պատրաստման բարդ մեթոդիկայի պատճառով: Բացի դրանից պատրաստված ստանդարտ լուծույթները շատ անկայուն են, ուստի արդյունքները ճիշտ չեն լինում:

Մատչելի նեֆելոմետրիկ մեթոդ ստեղծել հնարավոր է այնպիսի պղտոր լուծույթ պատրաստելով, որը փոխարինի ստանդարտ լուծույթին և բավարարի նեֆելոմետրիայի պահանջներին:

Երկարատև հետազոտություններից հետո մենք կարողացանք պատրաստել արծաթ քլորիդի կոլլոիդ լուծույթ, որը միանգամայն փոխարինում էր սպիտակուցային ստանդարտ լուծույթին: Նրա կոնցենտրացիան մենք որոշեցինք հայտնի քանակներով սպիտակուցային շիջուկների միջոցով և այն օգտագործեցինք արյան պլազմայի և շիջուկի մեջ սպիտակուցների քանակը և նրանց ֆրակցիաները որոշելու համար: Փորձերի ժամանակ

։իսնանձվր վմտդրակգիդդ ղրտվրվր մմդդդվնկումք նդումդ դ մկադ  
-տք վմդդնրսկտավնո լգճնմս իսչմտտուդտս աշդս ղվդտկտիտմ դ տշվք իսդգ  
-նգտո ղրսքրսմսիտմտդս իստվտտոմս ։իսքվդր մսդ ղրտիտշր վմվդքրսդրս  
ղվմտնրսկտավնո քվվնդիմաճտտ քդդր իստադտտոմս վմդդդաիճն մմդի

։իսնանձվր վմտդրստկտմքդս դ վքրսդրս  
տմտնդտտո քդդ լգմդմտդտայ նդմս ։մդդքդրսնմտ լտվո չ սվտտո մրսկ  
-տշր վքրսդրս ղվմտնրսկտավնո քտիճն ճդր ղրտվրսդրսկտմն մս