

**РАЗРАБОТКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПОКРЫТИЯ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОКСИПРОЛИНА
В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ**

**THE DEVELOPMENT OF A FUNCTIONAL COATING
FOR DETERMINATION OF OXIPROLIN
IN BIOLOGICAL MATERIAL**

*К.А. ЕРЗУНОВ, Е.В. РУМЯНЦЕВ, Е.Л. АЛЕКСАХИНА,
Л.С. ПЕТРОВА, В.Е. РУМЯНЦЕВА, О.И. ОДИНЦОВА*

*K.A. ERZUNOV, E.V. RUMYANTSEV, E.L. ALEKSAKHINA,
L.S. PETROVA, V.E. RUMYANTSEVA, O.I. ODINTSOVA*

**(Ивановский государственный химико-технологический университет,
Ивановский государственный политехнический университет,
Ивановская государственная медицинская академия Минздрава Российской Федерации)**

**(Ivanovo State University of Chemistry and Technology,
Ivanovo State Polytechnic University,
Ivanovo State Medical Academy of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation)**

E-mail: erzunovk@mail.ru

Повышенная концентрация гидроксипролина в биологическом материале свидетельствует о протекающих деструктивных процессах белка коллагена в тканях организма. В настоящей работе разрабатывается метод создания функционального покрытия на специальном носителе. Полученный образец представляет собой индикаторную тест-полоску для быстрого и точного определения оксипролина в биологических жидкостях, таких как кровь, моча, слюна. Принцип действия материала основан на цветной реакции Эрлиха – появления яркой окраски при взаимодействии индикаторного реагента (парадиметиламинобензальдегида) с оксипролином. На основании ранее проведенных исследований значений капиллярности и разрывной нагрузки различных носителей в качестве основы тест-полосок выбрали хроматографическую бумагу марки “средняя”. Получение полосок осуществляли методом текстильной печати с использованием метилцеллюлозы в качестве загустителя. Изучены окислительные свойства выбранных химических соединений и определена оптимальная концентрация компонентов системы. Проведено исследование эффективности стабилизаторов пероксида водорода для повышения окислительных свойств состава. Определены технологические параметры текстильной печати тест-полосок.

The increased concentration of hydroxyproline in the biological material indicates the ongoing destructive processes of the collagen protein in the tissues of the body. In this work, a method is developed for creating a functional coating on a special carrier. The resulting sample is an indicator test strip for quick and accurate determination of hydroxyproline in biological fluids such as blood, urine, saliva. The principle of operation of the material is based on the Ehrlich color reaction of the appearance of a bright color when the indicator reagent (paradimethylaminobenzaldehyde) interacts with hydroxyproline. Based on previous studies of the values of capillarity and breaking load of various carriers, chromatographic paper of the "average" brand was chosen as the basis of the test strips. The strips were obtained by textile printing using methylcellulose as a thickener. The oxidizing properties of the selected oxidants have been studied and the optimal concentration of the system components has been determined. A study of hydrogen peroxide stabilizers to increase the oxidizing properties of the composition was carried out. The technological parameters of textile printing of test strips have been determined.

Ключевые слова: функциональное покрытие, послойная хроматография, параметиламинобензальдегид, индикаторные реакции, оксипролин, воспалительные процессы, текстильная печать, тест-полоски.

Keywords: functional coating, layer-by-layer chromatography, paramethylaminobenzaldehyde, indicator reactions, hydroxyproline, inflammatory processes, textile printing, test strips.

Определение оксипролина в биологическом материале (слюне, моче, сыворотке крови и пр.) является важным инструментом при диагностировании целого ряда заболеваний. Увеличение концентрации оксипролина в биологических жидкостях является одним из основных признаков, свидетельствующих о деструктивных процессах основного белка соединительной ткани – коллагена [1]. Известно, что у здорового человека около 20% оксипролинсодержащих пептидов, высвобождаемых из коллагеновых молекул, экскретируется с мочой. При этом содержание свободной фракции оксипролина увеличивается, а содержание связанной фракции уменьшается. Выраженность биохимических изменений мочи коррелирует с тяжестью патологического процесса. Например, воспаление тканей пародонта характеризуется увеличением в слюне уровня оксипролина. В настоящее время выделяют несколько заболеваний пародонта, такие как гингивит, пародонтит, пародонтоз, вызывающие воспалительные и деструктивные процессы в тка-

нях пародонта [2]. Также изменения уровня оксипролина наблюдаются при псориазе [3], приобретенных пороках сердца [4], пиелонефритах у детей [5] и других часто встречающихся заболеваниях. Однако существующие на данный момент методы диагностики являются неточными и трудоемкими, поэтому большинство методов по диагностике заболеваний базируется только на состоянии самого больного.

Попытки упрощения способа определения оксипролина предпринимались неоднократно [6], [7]. Известен способ определения белково-связанного оксипролина, основанный на осаждении его смесью трихлоруксусной и хлорной кислот [8]. При использовании подобных методов возникает необходимость применения дорогостоящей спектрофотометрической аппаратуры и проведения стандартной пробы, что делает невозможным осуществление их в домашних условиях для самоконтроля здоровья пациентов. Повышение точности и объективности, а также оперативность диагностики воспалительных заболеваний

возможно при использовании в качестве маркера величины концентрации оксипролина в биологическом материале.

Целью данной работы является разработка функционального покрытия индикаторных тест-полосок для определения оксипролина в биологических жидкостях.

Определение оксипролина с помощью тест-полосок предполагает нанесение на целлюлозный носитель специального покрытия, включающего последовательно нескольких слоев реагентов, а именно: загуститель, окислитель, специальный реагент (индикатор).

Выбор индикатора для обнаружения оксипролина основан на использовании цветной реакции Эрлиха, в результате которой характерно появление красной окраски в слабокислом растворе при взаимодействии с пара-диметиламинобензальдегидом (п-ДМБА) пирролов, фуранов, индолов и других гетероциклических соединений с незамещенным реакционно-способным положением в кольце. С помощью реакции Эрлиха или ее модификации можно дифференцировать индол-положительные и индол-отрицательные микроорганизмы.

Нанесение покрытия на основу осуществляли методом текстильной печати. На основании ранее проведенных исследований в качестве носителя для печатной композиции была выбрана хроматографическая бумага марки "средняя". Для загу-

щения предложенной композиции применяли загуститель метилцеллюлозу (МЦ) [9], [10].

В качестве окислителей оксипролина в работе использовали пероксид водорода и хлорит натрия. Данные окислители обладают высокой окислительной активностью и не оказывают воздействия на материал носителя. Для поддержания pH среды использовали различные добавки: щавелевая кислота, аскорбиновая кислота и солевые растворы. Покрытие наносили послойно так, чтобы при опускании материала в раствор биологической жидкости оксипролин за счет капиллярных сил поднимался вверх, окислялся и взаимодействовал с параметиламинобензальдегидом.

С целью достижения более четкого отпечатка и предотвращения размытия пятна при его проявлении наносили слой гидрофобизатора, в качестве которого был выбран парафин.

Поскольку композиция для определения оксипролина является многокомпонентной и требует послойного нанесения, значительное уменьшение капиллярности существенно сужает выбор окислителя и его концентрационный диапазон. Скорость проявления окраски характеризуется буферным периодом, который представляет собой время, необходимое для прохождения реакции Эрлиха. В табл. 1 представлена оценка окислительных свойств перекисных соединений и хлорита натрия.

Т а б л и ц а 1

Состав композиции (слоями)	Концентрация	Буферный период
1. 0,5 см – пустое поле; 2. МЦ + щавелевая к-та + H ₂ O ₂ (37%); 3. Щавелевая к-та + H ₂ O; 4. МЦ + щавелевая к-та + H ₂ O + п-ДМБА + C ₂ H ₅ ОН	1. - 2. 0,75г+0,25г+25мл 3. - 4. 1,5г+0,5г+23мл+1г+20мл	Для свежизготовленной полоски – 2...3 с
1. 0,5 см – пустое поле; 2. МЦ + аскорбиновая к-та + NaClO ₂ + H ₂ O; 3. Аскорбиновая/щавелевая к-та + H ₂ O; 4. МЦ+аскорбиновая к-та+H ₂ O+п-ДМБА + C ₂ H ₅ ОН.	1. - 2. 0,75г+0,25г + 1,5г + 22,5 мл 3 - 4. 0,5г+0,25г+24мл+0,5г+10мл	Нестабильный, при нагревании до 60°С - 30 мин

Применение пероксида водорода значительно ускоряет время протекания реакции окисления оксипролина, наблюдается быстрое интенсивное окрашивание тест-полоски. Однако скорость и интенсивность

проявления окраски значительно снижается в зависимости от периода времени, прошедшего после приготовления полоски. Это обусловлено ослаблением окислительных свойств пероксида водорода на

воздухе. Для ограничения контакта пероксида водорода с кислородом воздуха на слой, содержащий окислитель, был дополнительно нанесен защитный фрагмент хроматографической бумаги. Было установлено, что нанесенный слой хроматографической бумаги не мешает определению оксипролина, так как не снижает капиллярных свойств носителя.

При использовании в качестве окислителя оксипролина хлорита натрия проявление окраски протекает около 5 ч в зависимости от концентрации окислителя. Таким образом, для всех исследованных в качестве окислителей соединений необходим поиск стабилизаторов или интенсификаторов.

Чтобы стабилизировать пероксид, опробовали ряд концентраций Трилона-Б, динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты и метасиликат натрия – применяемый в отделочном производстве стабилизатор пероксида водорода [11...14]. В таблице 2 представлено влияние добавки стабилизатора на окислительную способность пероксида водорода, исследуемую в течение четырех месяцев.

Пероксид водорода, стабилизированный Трилоном-Б, сохраняет свои окислительные свойства по отношению к оксипролину в течение не менее 4 месяцев (табл. 2 – характеристика стабилизирующего действия Трилона-Б).

Т а б л и ц а 2

№	Состав композиции	Концентрация	Технология нанесения	Качество отпечатка
1	H ₂ O ₂ + трилон-Б	0,75г МЦ + 25мл 37% H ₂ O ₂ + 1,4 г трилон-Б	Интенсивное перемешивание композиции, печать с помощью мягкой ракли	свежеизготовленная (четкий, яркий)
3	H ₂ O ₂ + трилон-Б	0,75г МЦ + 25мл 37% H ₂ O ₂ + 1,4 г трилон-Б		1 месяц (четкий, яркий)
4	H ₂ O ₂ + трилон-Б	0,75г МЦ + 25мл 37% H ₂ O ₂ + 1,4 г трилон-Б		4 месяца (четкий, яркий)

Стабилизирующее действие добавки метасиликата натрия характеризуют данные табл. 3. Окислительная стабильность пероксида водорода в присутствии мета-

силиката натрия значительно ниже, отпечаток становится нечетким через месяц после приготовления полоски.

Т а б л и ц а 3

№	Состав композиции	Способ нанесения	Время проявления окраски	Время после изготовления полоски	Качество отпечатка
1	H ₂ O ₂ + Na ₂ SiO ₃	Интенсивное перемешивание композиции, печать с помощью мягкой ракли	1...2 мин	свежеизготовленная	четкий, яркий
2	H ₂ O ₂ + Na ₂ SiO ₃			1 месяц	четкий, менее яркий
3	H ₂ O ₂ + Na ₂ SiO ₃			4 месяца	почти не проявляется

Для достижения наибольшей эффективности тест-полосок определяли основные технологические параметры печати на целлюлозном носителе. Для увеличения скорости окисления оксипролина варьировали величину слоя окислителя от 0,5 до 1 см при неизменной максимально возможной концентрации наносимого на носитель раствора. Однако при этом снижалась четкость отпечатка, поскольку время на подъем столбика жидкости увеличивается, и

фронт поднимающейся жидкости искривляется. Поэтому для достижения более четкого отпечатка постепенно добавляли парадиметилбензальдегид (2...3 мм) от слоя окислителя, увеличивая концентрацию индикаторного реагента. При этом окрашенное пятно проявлялось более ровно и четко. За 10 мин поднимающийся равномерный окрашенный слой доходил до слоя парафина и наблюдался в виде яркой полосы.

ВЫВОДЫ

Таким образом, изучены окислительные свойства окислителей, таких как пероксид водорода и хлорит натрия по отношению к оксипролину. Наиболее быстрое проявление окраски наблюдается для покрытий, в состав которых входят перекисные соединения. При использовании в качестве окислителя хлорита натрия окисление проходит значительно медленнее с дополнительным нагреванием полоски.

В качестве стабилизаторов пероксида водорода опробованы Трилон-Б и метасиликат натрия. Установлено, что Трилон-Б и метасиликат натрия стабилизируют окислительное действие пероксида водорода во времени. Однако при использовании в качестве стабилизатора пероксида водорода метасиликата натрия четкость отпечатка сохраняется в течение месяца, тогда как система, включающая Трилон-Б, позволяет добиться четкого отпечатка даже после четырех месяцев.

Для защиты окислителя от внешних воздействий слой, содержащий окислитель, был заклеен хроматографической бумагой.

Получены модельные индикаторные тест-полоски с функциональным покрытием для определения оксипролина в биологических средах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ignateva N.Yu., Danilov N.A., Averkiev S.V., Obrezkova M.V., Lunin V.V., Sobol E.N. Determination of hydroxyproline in tissues and the evaluation of the collagen content of the tissues // *Journal of Analytical Chemistry*. – V. 62, 2007. P. 51...57.
2. Вавилова Т.П. Биохимия тканей и жидкостей полости рта. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008.
3. Загртдинова Р.М., Шараев П.Н., Колясева Н.А. Показатели обмена соединительной ткани при псориазической болезни // *Вестник дерматологии и венерологии*. – 2001, № 5. С. 47...48.
4. Чурилина А.В., Москалюк О.Н. Нарушение метаболизма соединительной ткани при некоторых патологических состояниях у детей // *Здоровье ребенка*. – 2006. Т. 1, № 1.
5. Сафина А.И., Мальцев С.В., Захарова Н.Р., Шараев П.Н. Клиническое значение показателей обмена соединительной ткани у детей с пиелонефритом // *Российский педиатрический журнал*. – 2005, №1. С. 44...47.

6. Большакова С.Б., Дроздова Л.Н., Лада Е.В. Определение содержания оксипролина в моче больных системным остеохондрозом // *Лабораторное дело*. – 1982, №9. С. 27...29.

7. Шарарев П.Н., Ботникова Е.А., Иванов В.М., Зубарев О.М., Калинин О.В., Зубкова С.В. Определение свободного и связанного оксипролина в моче // *Лабораторное дело*. – 1990, №12. С. 23...25.

8. Cissell D.D., Link J.M., Hu J.C., Athanasiou K.A. Modified Hydroxyproline Assay Based on Hydrochloric Acid in Ehrlich's Solution Accurately Measures Tissue Collagen Content // *Tissue Engineering Part C: Methods*. – V. 23, №4, 2017. P. 243...250.

9. Ерзунов К.А., Есина О.А., Петрова Л.С., Алексахина Е.Л., Одинцова О.И. Разработка тест-полоски для диагностики воспалительного процесса тканей пародонта // В кн.: *Инновационные направления развития науки о полимерных волокнистых и композиционных материалах* // Тез. докл. Междунар. научн. конф. – Санкт-Петербург, 2020. С. 33...34.

10. Ерзунов К.А., Есина О.А., Алексахина Е.Л., Петрова Л.С., Одинцова О.И. Разработка тест-полосок для определения оксипролина в биологических жидкостях // *Вестник технологического университета*. – 2021. Т. 24, № 1. С. 5...9.

11. Лазарев Н.В., Левина Э.И. Вредные вещества в промышленности // *Справочник для химиков, инженеров, врачей*. – В 3-х томах. – Т.1...3, изд. 7, перераб. и доп.

12. Галашина В.Н. и др. Белотекс МС – эффективный стабилизатор беления тканей // *Текстильная промышленность*. – 1996, №6. С.30...32.

13. Калдыбаев Р.Т., Набиев Д.С., Калдыбаева Г.Ю., Жунисбекова Д.А., Такибаева Г.А., Темиришников К.М., Жолаева Н. Исследование возможности стабилизации и снижения скорости разложения пероксида водорода в процессе отбеливания хлопковой целлюлозы // *Изв. вузов. Технология текстильной промышленности*. – 2019, №1. С. 214...218.

14. Калдыбаев Р.Т., Набиев Д.С., Калдыбаева Г.Ю., Елдияр Г.К., Махмудова М.А., Турганбаева А.А. Исследование влияния стабилизаторов пероксида водорода на качество целлюлозной продукции // *Изв. вузов. Технология текстильной промышленности*. – 2019, №6. С. 165...170.

REFERENCES

1. Ignateva N.Yu., Danilov N.A., Averkiev S.V., Obrezkova M.V., Lunin V.V., Sobol E.N. Determination of hydroxyproline in tissues and the evaluation of the collagen content of the tissues // *Journal of Analytical Chemistry*. – V. 62, 2007. P. 51...57.
2. Vavilova T.P. Biokhimiya tkaney i zhidkostey polosti rta. – M.: GEOTAR-Media, 2008.
3. Zagrtdinova R.M., Sharaev P.N., Kolyaseva N.A. Pokazateli obmena soedinitel'noy tkani pri psoriaticheskoy bolezni // *Vestnik dermatologii i venerologii*. – 2001, № 5. S. 47...48.

4. Churilina A.V., Moskalyuk O.N. Narushenie metabolizma soedinitel'noy tkani pri nekotorykh patologicheskikh sostoyaniyakh u detey // Zdorov'e rebenka. – 2006. T. 1, № 1.
5. Safina A.I., Mal'tsev S.V., Zakharova N.R., Sharaev P.N. Klinicheskoe znachenie pokazateley obmena soedinitel'noy tkani u detey s pielonefritom // Rossiyskiy pediatricheskiy zhurnal. – 2005, №1. S.44...47.
6. Bol'shakova S.B., Drozdova L.N., Lada E.V. Opredelenie sodержaniya oksiprolina v moche bol'nykh sistemnym osteokhondrozom // Laboratornoe delo. – 1982, №9. С. 27...29.
7. Shararev P.N., Botnikova E.A., Ivanov V.M., Zubarev O.M., Malinin O.V., Zubkova S.V. Opredelenie svobodnogo i svyazannogo oksiprolina v moche // Laboratornoe delo. – 1990, №12. S. 23...25.
8. Cissell D.D., Link J.M., Hu J.C., Athanasiou K.A. Modified Hydroxyproline Assay Based on Hydrochloric Acid in Ehrlich's Solution Accurately Measures Tissue Collagen Content // Tissue Engineering Part C: Methods. – V. 23, №4, 2017. P. 243...250.
9. Erzunov K.A., Esina O.A., Petrova L.S., Aleksakhina E.L., Odintsova O.I. Razrabotka test-poloski dlya diagnostiki vospalitel'nogo protsessa tkaney parodonta // V kn.: Innovatsionnye napravleniya razvitiya nauki o polimernykh voloknistykh i kompozitsionnykh materialakh // Tez. dokl. Mezhdunar. nauchn. konf. – Sankt-Peterburg, 2020. S. 33...34.
10. Erzunov K.A., Esina O.A., Aleksakhina E.L., Petrova L.S., Odintsova O.I. Razrabotka test-polosok dlya opredeleniya oksiprolina v biologicheskikh zhidkostyakh // Vestnik tekhnologicheskogo universiteta. – 2021. T. 24, № 1. S. 5...9.
11. Lazarev N.V., Levina E.I. Vrednye veshchestva v promyshlennosti // Spravochnik dlya khimikov, inzhenerov, vrachey. – V 3-kh tomakh. – T.1...3, izd. 7, pererab. i dop.
12. Galashina V.N. i dr. Beloteks MS – effektivnyy stabilizator beleniya tkaney // Tekstil'naya promyshlennost'. – 1996, №6. S.30...32.
13. Kaldybaev R.T., Nabiev D.S., Kaldybaeva G.Yu., Zhunisbekova D.A., Takibaeva G.A., Temirshikov K.M., Zholaeva N. Issledovanie vozmozhnosti stabilizatsii i snizheniya skorosti razlozheniya peroksida vodoroda v protsesse otbelki khlopkovoy tsellyulozy // Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedenii, Seriya Teknologiya Tekstil'noi Promyshlennosti. – 2019, №1. S. 214...218.
14. Kaldybaev R.T., Nabiev D.S., Kaldybaeva G.Yu., Eldiyar G.K., Makhmudova M.A., Turganbaeva A.A. Issledovanie vliyaniya stabilizatorov peroksida vodoroda na kachestvo tsellyuloznoy produktsii // Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedenii, Seriya Teknologiya Tekstil'noi Promyshlennosti. – 2019, №6. S. 165...170.

Рекомендована кафедрой естественных наук и технологической безопасности ИВГПУ. Поступила 20.08.21.