



УКРАЇНА

(19) UA (11) 45336 (13) U  
(51) МПК (2009)  
A61B 5/145

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СПОСІБ МІКРОКІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЛІПІДІВ В ТКАНИНАХ ГІДРОБІОНТІВ

1

(21) u200904150

(22) 27.04.2009

(24) 10.11.2009

(46) 10.11.2009, Бюл.№ 21, 2009 р.

(72) БАСОВА МАРИНА МИХАЙЛІВНА, ТЕМУР'ЯНЦ НАТАЛІЯ АРМЕНАКІВНА, МАКСИМОВ СЕРГЕЙ АЛЕКСЕЄВИЧ, АНТИПЕНКО АЛЛА ОЛЕКСАНДРІВНА

(73) ТАВРІЙСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. В.І. ВЕРНАДСЬКОГО

(57) Спосіб мікрокількісного визначення ліпідів у тканинах гідробіонтів, що включає калориметричний аналіз ліпідів у тканинах гідробіонтів, при якому ліпіди екстрагують із тканин різними розчинниками, потім розчинники випарюють, додають концентровану сірчану кислоту, спалюють ліпіди в

2

термостаті, пробірки охолоджують і проводять спектрофотометричне визначення оптичної щільності пофарбованих розчинів ліпідів при довжині хвилі 375мкм, який **відрізняється** тим, що стандартні розчини ліпідів готують у хлороформі в концентрації 10, 20, 25, 30, 35, 40 і 60мкг/мол, використовують аліквоти 0,2мол, розчинники видаляють із ліпідних зразків без потоку азоту в термостаті при температурі близько 80-100°C протягом 15-20 хвилин, після охолодження пробірок і додавання концентрованої сірчаної кислоти в ліпіди вміст ретельно обмивають на дні й струшують вміст пробірки, а після виміру оптичної щільності на спектрофотометрі розрахунок вмісту ліпідів здійснюють по рівнянню  $y=87,403x+6,21$ , де  $x$  - оптична щільність, а  $y$  - кількість ліпідів у мкг.

Корисна модель, що заявляється, ставиться до прикладної гідробіології й фізіології гідробіонтів і може бути використана для оцінки ролі ліпідів у метаболізмі гідробіонтів у природному середовищі, в експерименті й при культивуванні.

Особлива увага в еколого-фізіологічних дослідженнях належить ліпідам, що в значній мірі визначають структурно-функціональну цілісність і адаптаційний потенціал як клітки, так і організму в цілому. Ліпіди надзвичайно різноманітні по хімічній будові й властивостям, для них характерний тісний взаємозв'язок з метаболізмом різних класів з'єднань, багато хто з них мають біологічну активність. У цей час ліпідам приділяється особлива увага у зв'язку з дослідженням неспецифічних відповідних реакцій організму на дію несприятливих факторів середовища. В умовах впливу різних несприятливих факторів (підвищені концентрації токсикантів, порушення температурного й кисневого режиму) кількісні і якісні показники ліпідного складу можуть виступати інформативними й адекватними біомаркерами для оцінки фізіологічного стану гідробіонтів і середовища їхнього перебування. У цьому зв'язку, вивчення ліпідів (загальних ліпідів, фракційного й жирнокислотного складу) гідробіонтів представляє значний практичний інтерес.

Кількісне визначення ліпідів є важливою ланкою в дослідженні хімічного складу, енергетичних запасів, метаболічної активності й адаптаційного потенціалу організму. Серед величезного числа відомих методик кількісного визначення ліпідів у тканинах живих організмів і гідробіонтів, зокрема, особливе місце належить мікрометодам. Це обумовлено тим, що мікрометоди кількісного визначення ліпідів найбільш часто використовуються в гідробіології, і тому мікрометод повинен бути досить простим, надійним і відтвореним. Незважаючи на те, що існує багато мікрометодів кількісного визначення ліпідів, що застосовуються в гідробіології, завдання пошуку високоточного й простого способу такого визначення залишається вкрай актуальним.

Відомий спосіб спалювання ліпідів для їхнього кількісного визначення (Julian B.Marsh and David B.Weinstein. Simple charring method for determination of lipids // Journal of Lipid Research. - 1966. - vol 7. - P. 574-576), обраний нами як прототип. Відповідно до прототипу, ліпіди, використовувані як стандарти для побудови каліброваної кривої, були попередньо очищені методом препаративної тонкошарової хроматографії на пластині Silica Gel G, промитих розчинниками для поділу ліпідів. Стандартні розчини були приготовлені в хлороформі й далі для побудови каліброва-

UA (19) 45336 (13) U

ної кривої використали концентрації 30, 60, 90, 120, 150 і 180мкг/мол. Розчинники були вилучені з ліпідних зразків під струмом азоту в алюмінієвій жаровій шафі при температурі 80-100°C. Після охолодження пробірок у кожному додавали по 2 мол концентрованої сірчаної кислоти. Через 15сек пробірки були поміщені в алюмінієву жарову шафу при 200°C на 15хв. Температура усередині пробірок у жаровій шафі повинна відслідковуватися в діапазоні 2°C у період спалювання. Потім пробірки були поміщені у воду кімнатної температури на 15сек., а потім перенесені в крижану лазню на 5хв. Після охолодження пробірки були витягнуті із крижаної лазні й залишені на 10хв. або до зникнення всіх пухирців. Оптична щільність вимірялася на спектрофотометрі при 375мкм. Відомий спосіб володіє рядом недоліків:

- ліпіди, використовувані як стандарти, попередньо були очищені методом препаративної тонкошарової хроматографії на пластинках Silica Gel G, що вимагає додаткових витрат праці, часу й токсичних реактивів;

- метод призначений для спалювання 5-300мкг ліпідів у пробі, без тонкої розбивки й пророблення найбільш важливого для дослідження мікродіапазону до 30мкг ліпідів у пробі;

- розчинники видаляють із ліпідних зразків під струмом азоту в алюмінієвій жаровій шафі при температурі 80-100°C, що трудомістоко;

- температура усередині пробірок у жаровій шафі повинна відслідковуватися в діапазоні 2°C у період спалювання, що висуває високі вимоги до технічних характеристик шафи й вносить додаткові витрати праці.

Ціль дійсної роботи - вдосконалити відомий метод кількісного визначення ліпідів у тканинах риб і інших гідробіонтів для характеристики ліпідного статусу, що відбиває енергетичний потенціал гідробіонтів і їхню пристосованість до умов середовища. Попередні результати свідчать про надійність, простоту, репрезентативність і перспективність застосування цього методу для гідробіологічних та інших досліджень.

В основу корисної моделі "Спосіб мікрокількісного визначення ліпідів у тканинах риб і інших гідробіонтів" поставлене завдання шляхом зміни технологічних режимів забезпечити дослідників простим і надійним способом мікрОВизначення ліпідів у тканинах риб і інших гідробіонтів.

Поставлене завдання досягається наступним шляхом. У способі мікрОВизначення ліпідів у тканинах гідробіонтів ліпіди екстрагують із тканин різними розчинниками, потім розчинники випарюють, спалюють висушені ліпіди в концентрованої сірчаної кислоти й проводять спектрофотометричне визначення оптичної щільності пофарбованих розчинів ліпідів. Спосіб, що заявляється, відрізняється тим, що ліпіди, використовувані як стандарти для побудови каліброваної кривої, попередньо не очищують. Стандартні розчини готують у хлороформі й для побудови каліброваної кривої використовують концентрації 10, 20, 25, 30, 35, 40 і 60мкг/мол. Розчинники видаляють із ліпідних зразків без струму азоту в термостаті при температурі 80-100°C протягом 15-20 хвилин, а після охоло-

дження пробірок і додавання в кожен концентрованої сірчаної кислоти вміст обов'язково ретельно обмивають на дні й струшують. Після цього пробірки витримують у термостаті при 200°C у плині 15 хвилин, потім поміщають спочатку - на короткий час - у воду кімнатної температури, й потім - на 5хв. у крижану лазню, вимірюють оптичну щільність на спектрофотометрі при довжині хвилі 375мкм і розрахунок змісту ліпідів здійснюють по рівнянню  $y=87,403x+6,21$ , де  $X$  - оптична щільність, а  $y$  - кількість ліпідів у мкг.

Приклад.

Ліпіди екстрагують із різних тканин (печінки, м'язів) риб (йорша, султанки, зеленухи) сумішшю гексана й ізопропанола. Суміш гексана й ізопропанола видаляють із ліпідних екстрактів у термостаті при температурі 80-100°C протягом 15-20 хвилин. Після охолодження пробірок, у кожен додають по 2 мол концентрованої сірчаної кислоти й вміст дуже ретельно обмивають на дні й обережно струшують. Потім пробірки поміщають у термостат при 200°C на 15хв. Після цього пробірки поміщають у воду кімнатної температури на короткий час, а потім відразу переміщають у крижану лазню на 5хв. Потім вимірюють оптичну щільність на спектрофотометрі при довжині хвилі 375мкм. Для побудови як можна більш адекватної каліброваної кривої були опробовані різні види ліпідів (холестерин, масло виноградних кісточок). У розчини холестерину обов'язково додають небагато антиоксиданту ВНТ для запобігання процесів перекисного окислювання ліпідів. Стандартні розчини холестерину й масла виноградних кісточок були приготовлені в хлороформі й для побудови каліброваної кривої використали концентрації 10, 20, 25, 30, 35, 40 і 60мкг/мол. Далі все кількісне визначення ліпідів проводили за описаною схемою. Рівняння для розрахунку змісту ліпідів  $y=87,403x+6,21$ .

Запропонований спосіб володіє рядом переваг:

- запропонований простий, ефективний і репрезентативний спосіб кількісного визначення ліпідів у тканинах риб і інших гідробіонтів;

- даний спосіб застосовуємо для точного визначення мікрокількостей ліпідів 10-60мкг у мол, що підтверджується характером і рівнянням каліброваної кривої;

- розчинники видаляють із ліпідних зразків без струму азоту в термостаті при температурі близько 100°C 15-20 хвилин;

- температуру усередині пробірок у жаровій шафі можна не відслідковувати в діапазоні 2°C у період спалювання.

Даний спосіб може бути застосовуємо для точного визначення мікрокількостей ліпідів до 60мкг також у тканинах теплокровних тварин і людини.

Заявлений спосіб може бути використано як експрес-метод для оцінки фізіологічного статусу живих організмів, зокрема гідробіонтів, в умовах забруднення.

