



УКРАЇНА

(19) UA (11) 48335 (13) U
(51) МПК (2009)
G01N 30/00
G01N 33/483
B01D 15/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ХРОМАТОГРАФІЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ОКРЕМИХ КЛАСІВ ЛІПІДІВ У БІОЛОГІЧНОМУ МАТЕРІАЛІ

1

(21) u200910523

(22) 16.10.2009

(24) 10.03.2010

(46) 10.03.2010, Бюл.№ 5, 2010 р.

(72) РІВІС ЙОСИП ФЕДОРОВИЧ, ШЕЛЕВАЧ АНДРІЙ ВАСИЛЬОВИЧ, ХРАБКО МАРІЯ ІВАНІВНА, ФРІШТАК ОЛЕНА МИРОСЛАВІВНА, ЦАП МАРІЯ МИХАЙЛІВНА, САРАНЧУК ІВАН ІВАНОВИЧ

(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН УААН

(57) Спосіб хроматографічного визначення концентрації окремих класів ліпідів у біологічному матеріалі, який включає екстрагування, розділення на окремі фракції, які визначають біхроматним методом, який **відрізняється** тим, що після калібрування, яке проводять методом внутрішнього нор-

2

мування, досліджувані концентрації фракцій визначають за формулою:

$$X = \frac{A \cdot K_1}{S \cdot K_1 + B \cdot K_2 + C \cdot K_3 + D \cdot K_4} \times 100 ,$$

де X - концентрація досліджуваної фракції, %;

A - оптична густина досліджуваної фракції;

K₁ - поправочний коефіцієнт для досліджуваної фракції;

S - сума концентрацій усіх ліпідних фракцій;

B, C, D - оптичні густини решти ліпідних фракцій;

K₂, K₃, K₄ - поправочні коефіцієнти для решти ліпідних фракцій;

100 - коефіцієнт переведення, %.

Корисна модель належить до галузі біологічних наук, зокрема до біохімії, а саме до способів хроматографічного визначення концентрації фосфоліпідів, неетерифікованого та етерифікованого холестеролу, моно-, ди- і триацилгліцеролів, неетерифікованих жирних кислот у рослинних і тваринних тканинах і рідинах (Методи биохимических исследований. Учеб. пособие /Под ред. М.И. Прохоровой. Ленинград. Изд-во Ленингр. ун-та. 1982. С. 66, 69, 74, 97-98; А.В. Нечеткий, В.И. Воронянский, Г.Г. Покусай, Н.И. Карташов, Н.Л. Докторович, И.В. Кириченко /Практикум по биохимии сельскохозяйственных животных. - М. Высш. Школа, 1980. С. 108).

Відомі хімічні способи визначення концентрації фосфоліпідів, неетерифікованого та етерифікованого холестеролу, моно-, ди- і триацилгліцеролів, неетерифікованих жирних кислот у рослинних і тваринних тканинах і рідинах (Методи биохимических исследований. Учеб. пособие /Под ред. М.И. Прохоровой. Ленинград. Изд-во Ленингр. ун-та. 1982. С. 66, 69, 74, 97-98; А.В. Нечеткий, В.И. Воронянский, Г.Г. Покусай, Н.И. Карташов, Н.Л. Докторович, И.В. Кириченко /Практикум по биохимии сельскохозяйственных животных. - М. Высш. Школа, 1980. С. 108).

Загальними недоліками зазначених способів є те, що класи ліпідів визначаються окремо, хімічними методами. На їх здійснення витрачається велика кількість часу та реактивів.

Найбільш близьким по суті до способу, що заявляється, є спосіб використання пластинок з тонким шаром силікагелю, хроматографічної системи петролейний ефір - діетиловий ефір - оцтова кислота, проявлення пластинок у парах йоду та біхроматне визначення вмісту окремих фракцій ліпідів (Стефаник М.Б. Тонкослойная и газожидкостная хроматография липидов [Текст]: методические указания /М.Б. Стефаник, В.И. Скороход, О.Г. Елисеева и др. - Львов, 1985. - 27с.).

Спосіб ґрунтується на тому, що із біологічного матеріалу (рослинних і тваринних тканин і рідин) екстрагують ліпіди. Далі, ліпіди хроматографічно розділяють на окремі фракції (фосфоліпіди, неетерифікований холестерол, неетерифіковані жирні кислоти, моноацилгліцероли, диацилгліцероли, триацилгліцероли і етерифікований холестерол). Розділення екстрагованих ліпідів проводять на пластинках з тонким шаром силікагелю за допомогою системи петролейний ефір - діетиловий ефір - оцтова кислота. Пластинки з фракціями ліпідів проявляють у парах йоду. Концентрацію окремих фракцій ліпідів визначають біхроматним методом.

Недоліком цього способу є те, що він не забезпечує кількісного визначення окремих фракцій ліпідів (фосфоліпідів, неетерифікованого холестеролу, неетерифікованих жирних кислот, моноацил-

(19) UA (11) 48335 (13) U

гліцеролів, диацилгліцеролів, триацилгліцеролів і етерифікованого холестеролу).

Спосіб, що заявляється, усуває недоліки найближчого аналога та забезпечує шляхом калібрування, яке проводять методом внутрішнього нормування, кількісне хроматографічне визначення концентрації фосфоліпідів, неетерифікованого та етерифікованого холестеролу, неетерифікованих жирних кислот, моно-, ди- і триацилгліцеролів у рослинних і тваринних тканинах і рідинах.

В основу корисної моделі покладено завдання знайти високоефективний, простий та точний, придатний для використання в практиці, спосіб кількісного хроматографічного визначення концентрації фосфоліпідів, неетерифікованого та етерифікованого холестеролу, неетерифікованих жирних кислот, моно-, ди- і триацилгліцеролів у біологічному матеріалі (рослинних і тваринних тканинах і рідинах).

Технічний результат досягають шляхом калібрування, яке проводять методом внутрішнього нормування, та введення поправочних коефіцієнтів у формулу розрахунку концентрації фосфоліпідів, неетерифікованого холестеролу, неетерифікованих жирних кислот, моноацилгліцеролів, диацилгліцеролів, триацилгліцеролів і етерифікованого холестеролу.

При проведенні патентно-інформаційного пошуку авторами і заявником знайдено технічне рішення (Стефаник М.Б. Тонкослойная и газожидкостная хроматография липидов [Текст]: методические указания /М.Б. Стефаник, В.И. Скороход, О.Г. Елисеева и др. - Львов, 1985. - 27с.), який містить суттєві ознаки, спільні із заявленим рішенням - використання скляних пластинок з тонким шаром силікагелю, хроматографічної системи петролейний ефір - діетиловий ефір - оцтова кислота, проявлення пластинок у парах йоду та біхроматне визначення вмісту окремих фракцій ліпідів. Але наявність зазначених ознак, спільних з найближчим аналогом, не забезпечує технічний результат, що досягається заявленим способом.

Заявлений спосіб належить до галузі біологічних наук, зокрема до біохімії, а саме до способів хроматографічного визначення концентрації фосфоліпідів, неетерифікованого та етерифікованого холестеролу, неетерифікованих жирних кислот, моно-, ди- і триацилгліцеролів у біологічному матеріалі (рослинних і тваринних тканинах і рідинах) і може бути використаний в лабораторних дослідженнях.

Реалізацію заявленої корисної моделі здійснюють наступним чином. Спочатку із біологічного матеріалу (рослинних і тваринних тканин і рідин) екстрагують ліпіди. Далі, ліпіди хроматографічно розділяють на окремі фракції (фосфоліпіди, неетерифікований холестерол, неетерифіковані жирні кислоти, моноацилгліцероли, диацилгліцероли, триацилгліцероли і етерифікований холестерол). Розділення екстрагованих ліпідів проводять на пластинці з тонким шаром силікагелю за допомогою системи петролейний ефір - діетиловий ефір - оцтова кислота. Пластинку з фракціями ліпідів проявляють у парах йоду. Концентрацію окремих фракцій ліпідів визначають біхроматним методом.

Досліджували концентрацію фосфоліпідів, неетерифікованого холестеролу, неетерифікованих жирних кислот, моно- та диацилгліцеролів, триацилгліцеролів і етерифікованого холестеролу в скелетних м'язах гусей. Для цього, до 1г тканини в флаконі з кольорового скла додають 20мл хлороформ-метанольної суміші (2:1 за об'ємом). Флакон закривають притертим поліетиленовим корком і ставлять на шуттель-аппарат, на якому протягом 2-х годин його вмістиме інтенсивно перемішують. Згодом, до вмістимого флакону доливають 7мл дистильованої води. Після розділення вмістимого флакону водоструминною помпою відбирають верхній водно-метанольний шар і відкидають, а нижній - піпеткою переносять на паперовий фільтр з синьою смужкою та фільтрують у попередньо зважену пробірку розміром 8 × 160мм. Хлороформ із пробірки випаровують в вакуумній шафі. Далі, пробірку з ліпідами зважують та визначають їх масу. Після цього ліпіди в пробірці розчиняють в 1мл гексану.

Поряд з наведеним вище на скляну пластинку розміром 9×12см наносять 6мл водної суспензії силікагелю з гіпсом. Для цього до 12г силікагелю марки L 5×40мк (Chemapol) додають 6г силікагелю марки LC 5×40мк (Chemapol) та доливають 45мл дистильованої води. Пластинку з нанесеною на неї водною суспензією силікагелю з гіпсом висушують при кімнатній температурі та ставлять в сушильну шафу для активації. Остання триває 30хв при температурі 110°C. Після цього пластинку виймають та ставлять в ексикатор для охолодження.

Аліквотну частину гексанового розчину, який містить біля 10мг ліпідів, за допомогою скляної піпетки з відтягнутим носиком наносять на пластинку з активованим і охолодженим тонким шаром силікагелю. Нанесення проводять у вигляді лінії на відстані 1,5см від нижнього краю пластинки. Після цього гексан із пластинки випаровують в вакуумній шафі.

Поряд з цим готують хроматографічну камеру з прозорого скла. Дно та стінки хроматографічної камери вистилають фільтрувальним папером. Далі, в камеру вливають хроматографічну систему, яка складається з петролейного ефіру - діетилового ефіру - оцтової кислоти (70:30:1 по об'єму). Система не повинна бути мутною. Крім того, використовують петролейний ефір марки 40×70°C.

Пластинку з нанесеними на неї ліпідами ставлять під невеликим кутом до стінки камери з таким розрахунком, щоб стартова лінія ліпідів не торкалася наливої в неї хроматографічної системи. Далі, камеру накривають притертим склом. Хроматографія ліпідів у камері, залежно від кімнатної температури триває 40-60хв. Час завершення хроматографії визначається верхньою межею підняття системи на пластинці. Вона не повинна бути меншою 1см від верхнього краю пластинки. Одночасно готують ексикатор для прояву пластинки у парах йоду. Для цього на його дно насаплюють близько 2г кристалічного йоду. Згодом ексикатор накривають притертою скляною кришкою.

Після цього пластинку виймають із хроматографічної камери та звільняють від залишків системи шляхом висушування при кімнатній темпера-

турі. Далі, пластинку з розділеними ліпідами ставлять на 20-30хв в насичений параами йоду ексікатор. Після цього, пластинку із ексікатора виймають та обводять голкою проявлені плями ліпідних фракцій. Згодом, плями, що містять ліпіди, переносять в термостійкі пробірки, до яких доливають 0,25мл 1N $K_2Cr_2O_7$ і 0,4мл концентрованої H_2SO_4 . Останню доливають безпосередньо перед електричною банею. Далі, пробірки на 20хв ставлять в електричну баню при температурі 160°C. Під час цього через кожні 5хв вмістиме пробірок перемішують. Після закінчення термостатування пробірки охолоджують шляхом опускання у баню з протічною водопровідною водою. Далі, до пробірок доливають 1,2мл дистильованої води та його вміст перемішують. Через 1-2 години, необхідних для осадження силікагелю, в 1см кюветах вимірюють оптичну густину вмістимого пробірок на електрофотоколориметрі при довжині хвилі 615 нм.

Для отримання кількісних даних проводять їх калібрування. Останнє проводять методом внутрішнього нормування. За норму приймають оптичну густину фракції неетерифікованого холестеролу. До неї прирівнюють оптичну густину фракцій фосфоліпідів, неетерифікованих жирних кислот, моноацилгліцеролів, диацилгліцеролів, триацилгліцеролів і етерифікованого холестеролу. Для цього готують вагові калібрувальні суміші хімічно чистого фосфатидилхоліну (лецитину), хімічно чистого неетерифікованого (вільного) холестеролу, хімічно чистих моно- та диацилгліцеролу (пальмітату та пальмітоолеату в відношенні 1:1), хімічно чистих неетерифікованих жирних кислот (пальмітинової, олеїнової та лінолевої в відношенні 1:1:1), хімічно чистого триацилгліцеролу (пальмітоолеатолінолеату), хімічно чистого етерифікованого холестеролу (з пальмітиновою кислотою) у співвідношеннях, наведених у таблиці 1.

Таблиця 1

Вагове співвідношення окремих ліпідних фракцій у досліджуваних сумішах

| Ліпідні фракції | Суміші | | | | | | |
|--|--------|----|----|----|----|----|----|
| | №1 | №2 | №3 | №4 | №5 | №6 | №7 |
| Фосфатидилхолін (лецитин) | 8 | 4 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Неетерифікований (вільний) холестерол | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 4 | 8 |
| Моно- та диацилгліцерол (пальмітат та пальмітоолеат) | 8 | 4 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Неетерифіковані жирні кислоти (пальмітинова, олеїнова та лінолева) | 8 | 4 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Триацилгліцерол(пальмітоолеатолінолеат) | 8 | 4 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Етерифікований холестерол (з пальмітиновою кислотою) | 8 | 4 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Почергово, описаним вище хроматографічним методом, аналізують отримані калібрувальні суміші ліпідних фракцій, визначають оптичну густину кожної з них. Далі, після перерахування наведених вище співвідношень в співвідношення 1:1, визначають поправочні коефіцієнти для кожної з ліпід-

них фракцій. Оптична густина фракції неетерифікованого холестеролу служить внутрішньою моєю, умовно прийнятою за 1. Ліпідні фракції та їх поправочні коефіцієнти, визначені методом внутрішнього нормування, наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

Ліпідні фракції та їх поправочні коефіцієнти

| Ліпідні фракції | Поправочний коефіцієнт |
|-------------------------------|------------------------|
| Фосфоліпіди | 0,91 |
| Неетерифікований холестерол | 1,00 |
| Моно- та диацилгліцероли | 0,32 |
| Неетерифіковані жирні кислоти | 0,34 |
| Триацилгліцероли | 1,16 |
| Етерифікований холестерол | 1,10 |

Концентрацію (%) досліджуваної фракції визначають за формулою:

$$X = \frac{A \cdot K_1}{S \cdot K_1 + B \cdot K_2 + C \cdot K_3 + D \cdot K_4} \times 100$$

де X - концентрація досліджуваної фракції, %;
A - оптична густина досліджуваної фракції;
K₁ - поправочний коефіцієнт для досліджуваної фракції;

S - сума концентрацій всіх ліпідних фракцій;
B, C, D - оптичні густини решти ліпідних фракцій;

K₂, K₃, K₄ - поправочні коефіцієнти для решти ліпідних фракцій;

100 - коефіцієнт переводу в %;

Способом за найближчим аналогом та заявленим способом хроматографії в тонкому шарі силікагелю визначали концентрацію ліпідних фракцій.

кцій в скелетних м'язах гусей. Результати досліджень показані в табл. 3.

Таблиця 3

Концентрація ліпідних фракцій в скелетних м'язах гусей

| Ліпідні фракції | Прототип, % | Заявлений спосіб, % |
|-------------------------------|-------------|---------------------|
| Фосфоліпіди | 22,76 | 23,49 |
| Неетерифікований холестерол | 17,21 | 6,14 |
| Моно- та диацилгліцероли | 7,52 | 9,57 |
| Неетерифіковані жирні кислоти | 11,48 | 4,64 |
| Триацилгліцероли | 19,47 | 26,12 |
| Етерифікований холестерол | 21,56 | 30,04 |

Отримані експериментальні дані вказують на те, що концентрація ліпідних фракцій в скелетних м'язах гусей, визначена способом за найближчим аналогом та заявленим способом, суттєво відрізняється (табл. 3). Заявленим способом, порівняно до способу найближчого аналога, в досліджувано-

му матеріалі визначається більша концентрація фосфоліпідів і, особливо, триацилгліцеролів і етерифікованого холестеролу, але менша - моно- та диацилгліцеролів і, особливо, неетерифікованого холестеролу та неетерифікованих жирних кислот.