



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **50870** (13) **U**
(51) МПК (2009)
G01N 30/00
G01N 30/96 (2006.01)
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

2

(21) u200913657

(22) 28.12.2009

(24) 25.06.2010

(46) 25.06.2010, Бюл.№ 12, 2010 р.

(72) РІВІС ЙОСИП ФЕДОРОВИЧ, ШЕЛЕВАЧ АНДРІЙ ВАСИЛЬОВИЧ, ХРАБКО МАРІЯ ІВАНІВНА, ДЛЯБОГА ЮЛІЯ ЗИНОВІЇВНА, 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 використання скляних пластинок з тонким шаром силікагелю, хроматографічної системи: петролейний ефір-діетиловий ефір-оцтова кислота, проявлення пластинок у парах йоду, біхроматне визначення вмісту окремих фракцій ліпідів і калібрування отриманих результатів методом внутрішнього стандарту за який викорис-

товують неетерифікований (вільний) холестерол, який **відрізняється** тим, що концентрацію досліджуваних фракцій визначають в абсолютних одиницях (г/кг або л) за формулою:

$$X = \frac{K \cdot C \cdot K_{\text{ст}}}{P} \cdot 100$$

де X - концентрація досліджуваної фракції ліпідів;
H - оптична густина досліджуваної фракції ліпідів;
C - кількість внутрішнього стандарту (неетерифікованого - вільного холестеролу), мг;

K - поправочний коефіцієнт для досліджуваної фракції ліпідів;

H_{ст} - оптична густина внутрішнього стандарту (фракція неетерифікованого - вільного холестеролу);

P - наважка досліджуваного матеріалу, г або мл, при необхідності наведений вище показник легко може бути перерахований в молярні одиниці.

Корисна модель 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) та може бути використаний в лабораторних дослідженнях, спрямованих на об'єктивну інтерпретацію хроматографічних досліджень фракційного складу ліпідів.

Відомі хроматографічні способи визначення концентрації фосфоліпідів, неетерифікованого та етерифікованого холестеролу, неетерифікованих жирних кислот, моно-, ди- і триацилгліцеролів у рослинних і тваринних тканинах і рідинах. Ці способи передбачають використання пластинок з тонким шаром силікагелю, хроматографічної системи петролейний ефір - діетиловий ефір - оцтова кислота, проявлення пластинок у парах йоду та біх-

роматне 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. - 27 с; Стапай П.В. Исследование липидного обмена в коже овец [Текст]: методические указания / П.В Стапай, И.А. Макар. - Львов, 1988. -15 с).

Загальними недоліками зазначених способів визначення концентрації фосфоліпідів, неетерифікованого та етерифікованого холестеролу, неетерифікованих жирних кислот, моно-, ди- і триацилгліцеролів у біологічному матеріалі є те, що вони не є кількісними.

Найбільш близьким по суті до способу, що за-являється, є кількісний хроматографічний спосіб визначення концентрації фосфоліпідів, неетерифікованого та етерифікованого холестеролу, неетерифікованих жирних кислот, моно-, ди- і триацилгліцеролів у біологічному матеріалі (Рівіс Й.Ф.

(13) **U**

(11) **50870**

(19) **UA**

Спосіб хроматографічного визначення концентрації окремих класів ліпідів у біологічному матеріалі. МПК⁸ G01N30/00 - 30/96; 33/483; B01D15/00. Заявка держпатенту України № u 200910523 від 16.10.2009 [Текст]: / Й.Ф. Рівіс, А.В. Шелевач, М.І. Храбко, О.М. Фріштак, М.М. Цап, І.І. Саранчук).

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, моноацилгліцеролі, диацилгліцеролі, триацилгліцеролі 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 біохроматним методом. Кількісні дані отримують за рахунок калібрування, яке проводять методом внутрішнього нормування.

Недоліком цього способу є те, що він не дає змоги визначати концентрацію окремих фракцій ліпідів (фосфоліпідів, неетерифікованого холестеролу, неетерифікованих жирних кислот, моноацилгліцеролів, диацилгліцеролів, триацилгліцеролів і етерифікованого холестеролу) в абсолютних одиницях.

Спосіб, що заявляється, усуває недоліки прототипу та забезпечує, шляхом використання методу внутрішнього стандарту, отримання результатів хроматографічного визначення концентрації фосфоліпідів, неетерифікованого та етерифікованого холестеролу, неетерифікованих жирних кислот, моно-, ди- і триацилгліцеролів у біологічному матеріалі (рослинних і тваринних тканинах і рідинах) в абсолютних одиницях (г/кг або л).

В основу корисної моделі покладено завдання знайти точний, придатний для використання в лабораторній практиці, спосіб 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 при проведенні хроматографічних досліджень фосфоліпідів, неетерифікованого холестеролу, неетерифікованих жирних кислот, моноацилгліцеролів, диацилгліцеролів, триацилгліцеролів і етерифікованого холестеролу досягають шляхом визначення концентрації досліджуваних фракцій в абсолютних одиницях (г/кг або л) за формулою:

$$X, \text{ г/кг або л} = \frac{N \cdot C \cdot K}{P} \cdot N_{\text{СТ}} \cdot 100$$

де X - концентрація досліджуваної фракції ліпідів, г/кг або л;

N - оптична густина досліджуваної фракції ліпідів;

C - кількість внутрішнього стандарту (неетерифікованого - вільного холестеролу), мг;

K - поправочний коефіцієнт для досліджуваної фракції ліпідів;

$N_{\text{СТ}}$ - оптична густина внутрішнього стандарту (фракція неетерифікованого - вільного холестеролу);

P - наважка досліджуваного матеріалу, г або мл.

При необхідності наведений вище показник легко може бути перерахований в молярні одиниці.

При проведенні патентно-інформаційного пошуку авторами і заявником знайдено технічне рішення (Рівіс Й.Ф. Спосіб хроматографічного визначення концентрації окремих класів ліпідів у біологічному матеріалі. МПК⁸ G01N30/00 -30/96; 33/483; B01D15/00. Заявка держпатенту України №u200910523 від 16.10.2009 [Текст]: / Й.Ф. Рівіс, А.В. Шелевач, М.І. Храбко, О.М. Фріштак, М.М. Цап, І.І. Саранчук), 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, біхроматне визначення вмісту окремих фракцій ліпідів і калібрування отриманих результатів. Але наявність зазначених ознак, спільних з прототипом, не забезпечує технічний результат, що досягається заявленим способом. Технічних рішень, які б за сукупністю ознак повністю співпадали із заявленим - не виявлено. Це дозволяє зробити висновок про відповідність заявленого технічного рішення критерію винаходу "Новизна".

У патентній і науково-технічній інформації не знайдено технічних рішень, в яких були б описані відомості про ознаки, що відрізняють заявлений спосіб від прототипу та забезпечують досягнення технічного результату (кількісного - в абсолютних одиницях - хроматографічного визначення концентрації фосфоліпідів, неетерифікованого холестеролу, неетерифікованих жирних кислот, моноацилгліцеролів, диацилгліцеролів, триацилгліцеролів і етерифікованого холестеролу в біологічному матеріалі). Отже, заявлене технічне рішення не впливає явним чином з рівня техніки, що дозволяє зробити висновок про відповідність його критерію "винахідницький рівень".

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, а тому відповідає критерію "Промислова придатність".

Таким чином, заявлене технічне рішення є новим, промислово придатним, має винахідницький рівень, тобто відповідає всім умовам патентоспроможності винаходу згідно статті 7 розділу II закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі" № 1771-III.

Реалізацію заявленого винаходу здійснюють наступним чином. Спочатку до певної кількості досліджуваного біологічного матеріалу (рослинних і тваринних тканин і рідин) в флаконі додають аліквотну кількість внутрішнього стандарту (неетери-

фікованого - вільного холестеролу). Далі, із досліджуваного матеріалу екстрагують ліпіди. Згодом, 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. Результати досліджень калібрують.

Досліджували концентрацію фосфоліпідів, неетерифікованого холестеролу, неетерифікованих жирних кислот, моно- та диацилгліцеролів, триацилгліцеролів і етерифікованого холестеролу в скелетних м'язах гусей. Для цього, до першого флакону з кольорового скла додають 1г тканини та 20мл хлороформ-метанольної суміші (2:1 за об'ємом), а до другого - 1г тканини, 0,25г неетерифікованого - вільного холестеролу та 20мл хлороформ-метанольної суміші. Флакони закривають притертим поліетиленовим корком і ставлять на шуттель-аппарат, на якому протягом 2-х годин їх вмістиме інтенсивно перемішується. Далі, до вмістимого флаконів доливають 7мл дистильованої води. Після розділення вмістимого флаконів водоструминною помпою відбирають верхній водно-метанольний шар і відкидають, а нижній - піпеткою переносять на паперові фільтри з синьою смужкою та фільтрують у попередньо зважені пробірки розміром 8x160мм. Хлороформ із пробірок випаровують у вакуумній шафі. Згодом, пробірки з ліпідами зважують та визначають їх масу. Після цього ліпіди в пробірках розчиняють в 1мл кількості гексану.

Поряд з наведеним вище на дві скляні пластинки розміром 9x12см наносять 6мл водної суспензії силікагелю з гіпсом. Для цього до 12г силікагелю марки L 5x40мк (Chemapol) додають 6г силікагелю марки LC 5x40 мк (Chemapol) та доливають 45 мл дистильованої води. Пластинки 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 пластинки 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 пластинки з активованим і охолодженим тонким шаром силікагелю. Нанесення проводять у вигляді лінії на відстані 1,5см від нижнього краю пластинки. Після цього гексан із пластинок 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 40x70°C.

Пластинки з нанесеними на неї ліпідами ставлять під невеликим кутом до стінки камери з таким розрахунком, щоб стартова лінія ліпідів не торкалася налитої 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 пластинках. Вона не повинна бути меншою 1см від верхнього краю пластинки. Одночасно готують ексикатор для прояву пластинок у парах йоду. Для цього на його дно накипають близько 2г кристалічного йоду. Згодом ексикатор накривають притертою скляною кришкою.

Після цього пластинки виймають із хроматографічної камери та звільняють від залишків системи шляхом висушування при кімнатній температурі. Далі, пластинки з розділеними ліпідами ставлять на 20-30хв. в насичений парами йоду ексикатор. Після цього, пластинки із ексикатора 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 електрофотокolorиметрі при довжині хвилі 615nm.

Для отримання кількісних даних (в абсолютних одиницях) результати хроматографічних досліджень калібрують. 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 калібрування використовують суміші хімічно чистого фосфатидилхоліну (лецитину), хімічно чистого неетерифікованого (вільного) холестеролу, хімічно чистих моно- та диацилгліцеролу (пальмітату та пальмітолеату в відношенні 1:1), хімічно чистих неетерифікованих жирних кислот (пальмітинової, олеїнової та лінолевої в відношенні 1:1:1), хімічно чистого триацилгліцеролу (пальмітолеатолінолеату), хімічно чистого етерифікованого холестеролу (з пальмітиновою кислотою).

Перед тим як розрахувати концентрацію (в абсолютних одиницях) окремої ліпідної фракції з оптичної густини фракції неетерифікованого - вільного холестеролу вираховують ту частку густини, яка припадає на добавлений холестерол. Це роблять із співвідношень. В першому флаконі, до якого не добавляли неетерифікований - вільний холестерол оптична густина цієї фракції до оптичної густини фракції фосфоліпідів становила Y. В другому флаконі, в який добавляли неетерифікований - вільний холестерол оптична густина цієї

фракції до оптичної густини фракції фосфоліпідів становила Z . Далі, з величини Z вираховують величину Y . Отримане значення (H_{CT}) використовують в наступній формулі:

$$X, \text{ г/кг або л} = \frac{H \cdot C \cdot K}{P} H_{CT} \cdot 100$$

де X - концентрація досліджуваної фракції ліпідів, г/кг або л;

H - оптична густина досліджуваної фракції ліпідів;

C - кількість внутрішнього стандарту (неетерифікованого - вільного холестеролу), мг;

K - поправочний коефіцієнт для досліджуваної фракції ліпідів;

H_{CT} - оптична густина внутрішнього стандарту (фракція неетерифікованого - вільного холестеролу);

P - наважка досліджуваного матеріалу, г або мл.

При необхідності наведений вище показник легко може бути перерахований в молярні одиниці.

Способом прототипу та заявленим способом хроматографії в тонкому шарі силікагелю визначали концентрацію ліпідних фракцій в скелетних м'язах гусей. Результати досліджень показані в табл.

Таблиця

Концентрація ліпідних фракцій в скелетних м'язах гусей

Ліпідні фракції	Спосіб визначення	
	прототип, %	заявлений спосіб, г/кг
Фосфоліпіди	23,49	5,24
Неетерифікований холестерол	6,14	1,37
Моно- та диацилгліцероли	9,57	2,14
Неетерифіковані жирні кислоти	4,64	1,04
Триацилгліцероли	26,12	5,82
Етерифікований холестерол	30,04	6,70

Отримані експериментальні дані вказують на те, що заявлений спосіб, порівняно зі способом прототипу, дає більш інформативні дані. З резуль-

татів досліджень, отриманих заявленим способом, розрахунковим шляхом можна отримати дані, які визначаються за способом прототипу.