



УКРАЇНА

(19) UA (11) 41118 (13) A

(51) 7 G01N1/38

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДЕПРОТЕЇНІЗАЦІЇ РОЗЧИНІВ

(21) 2001021120

(22) 16.02.2001

(24) 15.08.2001

(46) 15.08.2001, Бюл. № 7, 2001 р.

(72) Ільченко Олександр Володимирович, Гунько Ірина Петрівна, Заїчко Наталія Валентинівна, Пен-
тюк Наталія Олександрівна, Дудник Вероніка Ми-
хайлівна

(73) ІЛЬЧЕНКО ОЛЕКСАНДР ВОЛОДИМИРОВИЧ

(57) Спосіб депroteїнізації розчинів шляхом дода-
вання до них ацетонітрилу, який **відрізняється**
тим, що після додавання ацетонітрилу та вида-
лення осаду додають такий органічний розчинник,
щоб коефіцієнт розподілу ацетонітрилу між водою
та цим розчинником наближався до нуля, після
чого суміш рідин після ретельного перемішування
розділяють на водний депroteїнізований шар та
шар органічних розчинників.

Винахід відноситься до аналітичної хімії, а
саме до підготовки біологічних зразків до дослі-
дження.

Рівень техніки

При визначенні ряду речовин у біологічних
рідинах заважаючим фактором є присутність білка,
який здатний впливати на точність визначення.

Традиційними методами видалення білків з
сироватки або плазми крові є їх обробка розчи-
нами солей важких металів (ртуті, свинцю, урану),
осадження гідрооксидами (гідроксиди цинку, міді,
заліза), мінеральними кислотами (азотна, ме-
тафосфорна), вольфрамом натрію, молібде-
новою кислотою, фосфовольфрамом натрію,
фосфомолібдатом натрію, органічними кислотами
(трихлороцтова, оцтова, пікрінова, сульфосалі-
цілова), органічними розчинниками (метанол, ета-
нол, ацетон) [Биохимические методы исследова-
ния в клинике.- Под ред. А.А.Покровского.- Ме-
дицина, М.: 1969.- 652 с.]. Відомі методи видален-
ня білків додаванням перхлорної кислоти з по-
дальшим усуненням перхлорату осаженням у
вигляді калійної солі.

Всі ці методи характеризуються низкою не-
доліків, а саме - після їх здійснення розчин, що за-
лишається, збільшується в об'ємі, що знижує чут-
ливість методу, також в розчині з'являються до-
даткові іони або молекули, наявність яких може
негативно впливати на подальше визначення у
розчині речовин.

Найбільш придатним є метод із застосуван-
ням солянокислого ацетону [Там же, стор. 91], але
він потребує занадто багато часу, а внаслідок його
застосування у концентраті залишається значна
кількість домішок.

Осаження білків розчинами кислот веде до
значного зниження рН розчину, підвищення його
іонної сили, призводить до деякого збільшення
об'єму.

Осаження білків додаванням органічних
розчинників збільшує об'єм розчину у кілька разів,
що у відповідному відношенні знижує чутливість
методу визначення. Осаження білків органічними
розчинниками є не зовсім кількісним: за наявності
гемоглобіна розчин одержують з деяким забарв-
ленням.

Усунення цього потребує переекстрагування
(2 додаткових операцій), не завжди можливо, збіль-
шує час виконання аналізу, збільшує втрати реч-
овини, що визначається.

Найбільш близьким за сукупністю ознак до
винаходу є метод видалення білків з біологічної рі-
дини, який набув поширення в останні десятиріч-
чя, особливо для подальшого використання проб в
рідинно-хроматографічному аналізі, а саме з ви-
користанням ацетонітрилу [Comparison of Cyto-
chrome P-450-Dependent Metabolism and Drug In-
teractions of the 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Re-
ductase Inhibitors Lovastatin and Pravastatin in the
Liver / W.Jacobsen, G.Kirchner, K.Hallensleben at al.
// Drug Metab Dispos.-1999.- Feb; 27(2), P. 173-179].
Недоліками цього методу є значне розведення
проби органічним розчинником, а також не кількіс-
не видалення білків з розчину.

Суть винаходу

При використанні методу-прототипу до 1 мл
біологічної рідини (сироватки або плазми крові) до-
дають 3 мл ацетонітрилу, та після ретельного пе-
ремішування осад видаляють центрифугуванням.
Але при цьому не досягається повного видалення

білків - частина їх залишається в надосадовій рідині. При введенні такої рідини до хроматографічної колонки, остання може бути пошкоджена - білкові молекули здатні незворотно осідати в колонці унеможливаючи проходження елюенту з необхідною швидкістю при достатньо низькому тиску. Крім того, об'єм рідини збільшується вчетверо, що у відповідну кількість разів зменшує концентрацію речовин, присутніх у біологічній рідині. Це зменшує чутливість хроматографічного визначення у обробленій таким чином біологічній рідині.

В основу винаходу поставлено задачу поліпшити повноту осадження білків з біологічної проби, не збільшуючи при цьому об'єм рідини, яка залишається після такого осадження, а саме

шляхом додаткової обробки, націленої на видалення остаточної кількості білків та ацетонітрилу, яким проводилася первинна обробка проби,

забезпечити практичну відсутність білків та ацетонітрилу в пробі, призначеної для подальшого аналізу.

Для вирішення цієї задачі пробу після осадження частини білків за допомогою ацетонітрилу додатково обробляють органічним розчинником, здатним видалити ацетонітрил з водного середовища (наприклад хлороформ, діхлорметан, тетрахлорид вуглецю, диетиловий ефір, бензол та ін.) та центрифугують. При цьому в інтерфазі осад-

жуються залишкові кількості білка, а ацетонітрил повністю переходить у шар органічного розчинника. На поверхні залишається шар водного розчину, якій містить водорозчинні компоненти біологічної рідини практично у вихідних концентраціях.

Відомості, які підтверджують можливість здійснення винаходу

До 1 мл сироватки або плазми крові додають 3 мл ацетонітрилу. Суміш ретельно перемішується стряхуванням протягом 30-60 секунд. Суміш центрифугують при 1000-1500 об/хв протягом 10-20 хвилин. Рідина зливається у чисту пробірку, куди до неї додається 10 мл хлороформу. Після ретельного стряхування протягом 30-60 секунд суміш центрифугують при 1500 об/хв протягом 15-30 хвилин.

Після цього вміст пробірки розділяється на 3 шари:

нижній - суміш хлороформа з ацетонітрилом,
середній - інтерфаза, утворена залишковою кількістю білків,
верхній - водний, об'єм якого не перевищує 0,9 мл.

У водному шарі практично відсутні білкові молекули, але концентрація гідрофільних речовин, які не екстрагуються у хлороформ, практично не відрізняється від їх початкової концентрації у сироватці (плазмі).

Тираж 50 екз.

Відкрите акціонерне товариство «Патент»
Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101
(03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03
