



УКРАЇНА

(19) UA (11) 45914 (13) A

(51) B G01N30/00, G01N33/15

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ РИБОКСИНУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ШЛЯХОМ КАПІЛЯРНОГО ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ

1

2

(21) 2001117809

(22) 15.11.2001

(24) 15.04.2002

(46) 15.04.2002, Бюл. № 4, 2002 р.

(72) Варченко В'ячеслав Григорович, Вяткін Олександр Костянтинович, Дзяк Георгій Вікторович, Маматов Валерій Петрович, Дроздов Олексій Леонідович, Рудько Андрій Миколайович

(73) ДНІПРОПЕТРОВСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ, ДНІПРОПЕТРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ЦЕНТР СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ ТА СЕРТИФІКАЦІЇ

(57) Спосіб визначення концентрації рибоксину в сироватці крові шляхом капілярного електрофорезу, який відрізняється тим, що відібрану пробу сироватки крові поляризують шляхом змішування з буферною сумішшю при співвідношенні масових

частин 1:1, дегазують, змішують з дистильованою водою у співвідношенні 1:10 і використовують як форетичне середовище при міграції крізь капілярну трубку та електроліт в бік до анода, детектують оптичну щільність проби, отримують електрофореграму, по термінах виходу сигналів тривалістю 5,00-5,25 хвилин ідентифікують сигнали фракцій рибоксину на фоні сигналів присутніх домішок та визначають концентрацію шляхом співвідношення площ піків фракцій рибоксину в пробі з каліброваними лічильними площинами стандартних концентрацій рибоксину, при цьому для виготовлення буферної суміші як електроліту використовують розчин борної кислоти, тетраборату натрію та води дистильованої у співвідношенні об'ємних частин 5,5:6,5:38,0 см³

Винахід відноситься до досліджень або аналізу матеріалів шляхом розділення на складові частини та досліджень медичних препаратів і може бути використаним в медицині.

Рівень техніки, який досліджений заявником, інформує про відсутність об'єктів, що мають відношення до визначення вмісту рибоксину в сироватці крові.

На підставі відсутності співпадінь призначення відомих об'єктів, до важливішими характеристиками яких є середовище, що утримує фракції шуканого агента (сироватка крові), функція (визначення концентрації) і конкретний вид матеріалу (рибоксин) можливо стверджувати про відсутність аналогів для винаходу, що заявляється.

У основу винаходу поставлена задача розробити спосіб визначення концентрації рибоксину в сироватці крові, який шляхом капілярного електрофорезу забезпечує технологічно сприйнятливую чутливість і ступінь екстракції шуканого агента при використанні.

Поставлена задача вирішується тим, що, згідно з винаходом, спосіб визначення концентрації рибоксину в сироватці крові шляхом капілярного електрофорезу характеризується тим, що відібрану

пробу сироватки крові поляризують шляхом змішування з буферною сумішшю при співвідношенні масових частин 1:1, дегазують, змішують з дистильованою водою у співвідношенні 1:10 і використовують як форетичне середовище при міграції крізь капілярну трубку та електроліт в бік до анода, детектують оптичну щільність проби, отримують електрофореграму, по термінах виходу сигналів тривалістю 5,0 - 5,25 хвилин ідентифікують сигнали фракцій рибоксину на фоні сигналів присутніх домішок та визначають концентрацію шляхом співвідношення площ піків фракцій рибоксину в пробі з каліброваними лічильними площинами стандартних концентрацій рибоксину, при цьому для виготовлення буферної суміші як електроліту використовують розчин борної кислоти, тетраборату натрію та води дистильованої у співвідношенні об'ємних частин 5,5:6,5:38,0 см³.

Для забезпечення означеного технічного результату буферна суміш, з одного боку, являє форетичне середовище, що є необхідним для відтворення капілярного електрофорезу, а з іншого є носієм всіх виділених фракцій. Виділення останніх виконують на підставі поляризації проби, внаслідок чого шуканий агент стає нативним в юнній фо-

(13) A
(11) 45914
(19) UA

рмі, а його нейтральні молекули посилюють зв'язки з зарядженими частками буфера. Від того фракції рибоксину можуть переміщуватися під впливом електричного поля та бути впізнаними засобом детектування. Дегазація зумовлює потрапляння проби в замалий перетин капіляру та безперешкодливе переміщення цього форетичного середовища в його порожнину. Між тим, останні умови істотно впливають на термін виходу рибоксину, спотворення результатів ідентифікації та детектування, об'єктивності й швидкості визначення рибоксину та зумовлюють технологічно сприйнятливу чутливість і ступінь його екстракції. При цьому співвідношення масових частин сироватки крові та буферної суміші в пробі, наприклад в пробірці Еппендорфа, найбільш доцільне в кількості 1

1, оскільки при збільшенні кількості буфера в пробі знижується чутливість детектора та спотворюються вихідні дані, а при зменшенні погрішуються міграційні можливості виділених фракцій, фізичні властивості форетичного середовища та відбувається виснаження останнього. Змішування проби з дистильованою водою у співвідношенні 1:10 виключає сукупність раптових помилок, що означені вище, і є найбільш оптимальним. Так, при збільшенні концентрації проби, виникають переважно помилки ідентифікації рибоксину з-поміж досить стабільного виходу фракцій, перешкод у потраплянні цього робочого розчину в порожнину капіляру крізь замалий геометричний перетин при міграції до анода, а при зменшенні концентрації – погрішуються міграційні можливості виділених фракцій, фізичні властивості форетичного середовища, виснажується робоче середовище, які належать до чинників низького коефіцієнту корисної дії форетичного процесу. Детектування оптичної щільності дозволяє отримати електрофореграму поляризованих фракцій під час міграції до анода, виявити амплітуду відповідних сигналів й терміни виходу вмісту проби. Ідентифікація збігається до розпізнавання сигналів фракцій рибоксину по тривалості виділення на фоні сигналів інших домішок. Експериментально встановлено, що термін виходу стандартних концентрацій рибоксину в сироватці крові під впливом поляризації сягає 5,00 – 5,25 хвилин і є істотною ознакою сигналів, що притаманні поляризованим фракціям рибоксину в сироватці крові, здатною відрізнити шуканий агент від безлічі присутніх домішок. Використання експериментальних даних про стандартні концентрації рибоксину в сироватці крові, у вигляді площ піків електрофореграм, як каліброваних лічильних одиниць, що насамперед є прямопропорційними до зареєстрованих амплітуд сигналів електрофореграм, найбільш доцільне в обчисленні концентрації екстрагованих часток рибоксину. Кількість об'ємних частин борної кислоти, тетраборату натрію та води дистильованої у буферному розчині, що надана дискретним співвідношенням 5,5 : 6,5 : 38,0 см³ зумовлює необхідну полярність форетичного середовища, виключення систематичних і раптових помилок, спотворення результатів та вважається найбільш доцільною для отримання максимального технічного результату, що заявляється.

Тож, за наявності причинно-наслідкових

зв'язків з технічним результатом сукупність відокремлюючих ознак заявленого об'єкта є істотною.

Відомості, що підтверджують можливість здійснення способу визначення концентрації рибоксину в сироватці крові полягають в наступному:

Для визначення вмісту рибоксину в експериментальній пробі можливо застосування промислової системи капілярного електрофорезу «Капель-103Р» (виробництва Росії), кварцового капіляру Ø 0,075мм довжиною 600мм, ваг лабораторних 2 класу, мір маси, рН метру, дозаторів піпеточних змінних обсягів (5 - 50, 50 - 200 та 200 – 1000мм³), програмного забезпечення «Мультіхром» і комп'ютера мінімальної конфігурації.

Допускається використання приладів і устаткування інших моделей з аналогічними або кращими метрологічними характеристиками.

Допоміжні пристрої: центрифуга, пробірки одноразові типу Еппендорфа, місткістю 1,5см³, фільтри целюлозно-ацетатні, з діаметром пір біля 20мкм, насадки фільтра. Реактиви: вода дистильована, борна кислота, натрій тетраборнокислий.

Спосіб визначення концентрації рибоксину в сироватці крові виконують у наступній послідовності:

Після підготовки сироватки крові у пробірці Еппендорфа додають буферний розчин, витримуючи співвідношення масових частин 1 : 1. При цьому буфер містить борну кислоту, тетраборат натрію та воду дистильовану при співвідношенні об'ємних частин 5,5 : 6,5 : 38,0см³. Приготовлений розчин у подальшому використовують як електролітичне середовище, що розміщується між капіляром та джерелом електричного сили. Аналогічну суміш проби сироватки крові з тим же буфером при співвідношенні масових частин 1 : 1, після відповідної дегазації та змішування з дистильованою водою у співвідношенні 1 : 10, використовують як форетичне середовище у капілярному електрофорезі. Вплив буфером на відібраний аналізат дозволяє поляризувати вміст і виділити фракції у йонному вигляді. Під час електрофорезу поляризовані нейтральні молекули рибоксину мігрують від пробірки з пробою в бік до анодів крізь капілярний провідник та суміш сироватки крові з буфером, як електролітичне середовище, завдяки взаємодії із зарядженими молекулами форетичного середовища, та детектують оптичну щільність проби на довжині хвилі аналізатора 254 нм, який розміщують впритул до капіляру. Отримують електрофореграму та ідентифікують на фоні сигналів присутніх домішок сигнали фракцій рибоксину по терміну виходу в межах 5,00 – 5,25 хвилин. Шляхом зіставлення площ піків електрофореграм з каліброваними лічильними площинами стандартних концентрацій рибоксину, що прямопропорційні до амплітуд сигналів останнього, визначають концентрацію рибоксину в сироватці крові. Програмне забезпечення «Мультіхром» з комп'ютером забезпечують обчислення вихідних даних.

Тож, спосіб дозволив шляхом капілярного електрофорезу забезпечити технологічно сприйнятливий чутливість і ступінь екстракції шуканого агента з можливістю проведення адекватних терапевтичних втручань у подальшому.

Додаткові характеристики нового об'єкта ін-

формують про повноту визначення аналізата в пробі, забезпечення високої швидкості визначення його концентрації, обмеження використання токсичних засобів в дослідженнях, низьку вартість базового обладнання та допоміжних матеріалів, досягнення технологічних зручностей та спрощень при відтворенні способу, високу об'єктивність визначення вмісту, можливість визначення фракцій інших елементів водночас з визначенням вмісту рибоксину тощо

На прикладі конкретного використання концентрацію рибоксину визначали наступним чином

Для виготовлення буферного розчину, що використовували як електролітичне середовище, до мірної колби місткістю 50см³ додавали 5,5см³ розчину борної кислоти при концентрації 0,2 моль/дм³, 6,5см³ розчину тетраборату натрію при концентрації 0,05 моль/дм³ і доводили обсяг до мітки дистильованою водою

Для виготовлення буферного розчину, що використовували для поляризації сироватки крові, до мірної колби місткістю 50см³ аналогічним чином додавали 5,5см³ розчину борної кислоти при концентрації 0,2 моль/дм³, 6,5см³ розчину тетраборату натрію при концентрації 0,05 моль/дм³, а потім дистильованою водою обсяг доводили до мітки

Поляризація 0,3см³ сироватки крові збігалася до вміщення в пробірку Еппендорфа 0,3см³ буферного розчину та перемішування

Після поляризації й дегазації аналізату на центрифугі протягом 4 хвилин зі швидкістю 3200 об/хв приготували робочий флоретичний розчин з раніш поляризованої пробі шляхом десятикратного зменшення її концентрації дистильованою водою

На ділянці між пробіркою з пробією, як флоретичним середовищем, і анодом встановлювали капілярну трубку, а за нею розміщували пробірку з електролітом. Перед підведенням електричного живлення (близько 20кВ) в порожнині капіляра утворювали тиск біля 30мБар, що сприяло потраплянню аналізату в замалий перетин капілярної трубки. Після комутації ланцюгів живлення нейтральні молекули рибоксину під впливом електричного струму рухались до анода у флоретичному середовищі крізь капіляр. На довжині хвилі детектора 254нм, що контактував із капілярною труб-

кою, визначали оптичну щільність вмісту. Сигнал з приладу надходив до комп'ютера та відбивався у вигляді електрофореграми, що характеризувалася наявністю амплітудних спалахів присутніх домішок у вигляді піків кривої, з прямопропорційною залежністю до їх концентрацій в аналізаті. На фоні сигналів присутніх домішок сигнали фракцій рибоксину були ідентифіковані по терміну виходу в межах 5,00 - 5,25 хвилин. Шляхом зіставлення площ піків електрофореграми з каліброваними лічильними площинами стандартних концентрацій рибоксину визначали його концентрацію у відібраній сироватці крові. Програмне забезпечення «Мультіхром» з комп'ютером забезпечували обчислення та обробку вихідних даних

Загальна межа виявлення рибоксину (чутливість) у пробі сироватки крові становила 30нг/мл, його екстракція сягала 100%, час виходу - 5 хв, а термін аналізу - 7 хв

Отже, на прикладі конкретного використання об'єкта доведена можливість відтворення процесу, пов'язаного з визначенням концентрації рибоксину у сироватці крові, який шляхом капілярного електрофорезу забезпечив технологічно сприйнятливую чутливість визначення та ступінь екстракції шуканого агента. Використання об'єкту науково-дослідними лабораторіями медичних підприємств допоможе своєчасно корегувати вміст даного фармакологічного засобу в крові

Таблиця

Техніко-економічні характеристики способу визначення концентрації рибоксину в сироватці крові шляхом капілярного електрофорезу

Показники та одиниці виміру	Заявлене рішення задачі
Чутливість визначення рибоксину в пробі, нг/мл	30
Ступінь екстракції рибоксину, %	100
Загальна тривалість підготовки пробі, хв	7
Термін аналізу, хв	7
Термін виходу рибоксину, хв	5
Загальна вартість обладнання, ум од	11000

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)

вул. Сим'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна

(044) 456 – 20 – 90

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»

вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна

(044) 216 – 32 – 71