



УКРАЇНА

(19) UA (11) 33564 (13) A

(51) 6 A61B5/14

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПІДГОТОВКИ ПРОБ БІОРИДИН ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ РЕЧОВИН ЛІПІДНОЇ ПРИРОДИ

(21) 99031324

(22) 11.03.1999

(24) 15.02.2001

(33) UA

(46) 15.02.2001, Бюл. № 1, 2001 р.

(72) Весельський Станіслав Павлович, Лященко Петро Сергійович, Костенко Світлана Іванівна, Горенко Зоя Анатоліївна, Куровська Людмила Францівна

(73) Київський університет імені Тараса Шевченка

(57) Спосіб підготовки проб біорідин для визначення вмісту речовин ліпідної природи, який вклю-

чає відбір біорідини, екстракцію загальних ліпідів і хроматографічне їх розділення в тонких шарах на основні фракції з кількісною оцінкою за допомогою денситометра, який відрізняється тим, що біологічну рідину відбирають в мікродозах, наносять на попередньо розмічений і підписаний фільтрувальний обеззолений чи хроматографічний папір з паралельним позбавленням проб від гідрофільної водної компоненти, а екстракцію загальних ліпідів відтворюють однофазною гідрофобною системою органічних розчинників в яку входять хлороформ - ацетон - етанол у співвідношенні 7:2:1.

Запропонований винахід належить до біохімії і може використовуватись для вивчення обміну ліпідів в організмі людини та тварин, в клінічній медицині для оцінки функціонального стану печінки при певних патологіях і ефективності лікування різними лікарськими препаратами, а також для тестування впливу шкідливих виробництв і при дії специфічних факторів навколишнього середовища безпосередньо на людей чи популяцію тварин великих регіонів.

Відомо багато способів підготовки проб біорідин для визначення речовин ліпідної природи, як спектрофотометрично [1, 2, 3, 4, 5], так і з більш розповсюдженою в останні часи хроматографією в тонких шарах [6, 7, 8, 9, 10, 11, 12], котра дозволяє відносно швидко оцінити не тільки абсолютну кількість, але і якісно-кількісний склад окремих фракцій ліпідів в біологічних рідинах та тканинах.

Ці способи характеризуються такими ознаками: необхідно кількісно відібрати і підготувати певну біологічну рідину чи тканину, провести швидко екстракцію загальної суми ліпідів та оцінити якісно та кількісно вміст окремих фракцій ліпідів. Для екстракції загальних ліпідів використовується запропонована Фолчем (1957р.) суміш розчинників хлороформу та метанолу у співвідношенні 2:1 за об'ємом. Екстракцію ліпідів з відібраної традиційними способами біологічної рідини необхідно проводити негайно за допомогою розподільної лійки чи пробірки з пришліфованою пробкою, яку інтенсивно струшують впродовж 20-45 хвилин. Для більш повної екстракції ліпідів потрібно, щоб об'єм розчинника перевершував об'єм досліджуваної біорідини проби в 20-40 разів, а у випадку екстракції

з інших тканин організму необхідно 2-3 промивання цією сумішшю розчинників.

Потім до об'єданого екстракту додають певний об'єм підкисленої води або фізіологічного розчину для відмивання екстракту від речовин неліпідної природи, перевертаючи не менш 20-25 разів пробірку з вертикального положення в горизонтальне. Чіткого розділення фаз досягають за допомогою центрифуги, або ж простим відстоюванням цієї суміші впродовж ночі.

Нижню хлороформну фазу в розподільній лійці зливають, а при використанні пробірки – відсмоктують шприцем з поліетиленовим кінчиком, потім вносять в попередньо точно зважений бюкс чи центрифужну пробірку. Для прискорення випаровування посуд з хлороформною фазою підігрівають на водяній бані при температурі $t=37-40^{\circ}\text{C}$, або за допомогою роторного випаровувача до постійної ваги. Одержаний матеріал до аналізу зберігають в ексікаторі з оксидом фосфору (P_2O_5).

Але всі ці способи визначення ліпідів в біологічних рідинах і тканинах мають цілу низку особливостей і недоліків, які обмежують їх широке застосування. Зокрема при спектрофотометричному визначенні різних класів ліпідів необхідні значні кількості рідин поряд із застосуванням рідкісних дорогих барвників. Згідно з описаними методиками, потрібно негайно аналізувати відібраний біологічний матеріал і призупинити аналіз можливо лише після повної екстракції ліпідів, тобто на етапі повного випаровування розчинника і доведення витяжки до постійної ваги. В екстрагуючій суміші є метанол, який потребує спеціальних лабораторних умов для екстракції ліпідів. Наведена схема аналізу су-

проводжується включенням у витяжку значної кількості речовин неліпідної природи, що потребує додаткової операції промивання цього екстракту та значної затрати часу на розділення фаз.

Найбільш близьким до запропонованого винаходу за сукупністю ознак є спосіб підготовки проб біорідин [11] - прототип. Цей спосіб включає: відбір біологічної рідини і екстракцію загальної суми ліпідів з послідуною кількісною оцінкою окремих фракцій ліпідів за допомогою тонкошарової хроматографії та денситометрії. Для екстракції загальних ліпідів використовують суміш розчинників хлороформу та метанолу у співвідношенні 2:1 по об'єму. З точно відібраної кількості плазми чи сироватки крові необхідно швидко екстрагувати загальні ліпіди, користуючись розподільною лійкою, яку інтенсивно струшують впродовж 30 хвилин. Відмивши екстракт від речовин неліпідної природи підкисленою водою, досягають центрифугуванням чіткого розділення фаз. Хлороформну фазу переносять в попередньо зважену центрифужну пробірку і швидко випаровують в роторному випаровувачі. До аналізу отриманий матеріал зберігають в ексікаторі з оксидом фосфору.

Хроматографічне розділення загальних ліпідів проводять в тонких шарах силікагелю фабричного виготовлення (Silufol, ЧССР) за допомогою системи розчинників гексан-діетиловий ефір-уксусна кислота у співвідношенні 76:23:1. Вміст окремих фракцій ліпідів кількісно визначають в більшості випадків денситометрією після фарбування хроматограм 5-10%-ним розчином фосфорномолібденової кислоти в етанолі. Хроматограми проявляють впродовж 4-5 хвилин при температурі 90-110°C.

Але, на відміну від запропонованого, цей спосіб має такі недоліки: потрібно негайно аналізувати відібрану біологічну рідину, що різко обмежує кількість відібраних проб для аналізу; в екстрагуючій суміші використовується метанол, що потребує спеціальних лабораторних умов для проведення цієї роботи; включення в екстракт значної кількості речовин неліпідної природи потребує додаткової операції промивання витяжки із певною затратою часу на розділення фаз; застосована при цьому способі схема аналізу біологічних рідин супроводжується значним розкидом даних і знижує достовірність отриманих результатів.

В основу винаходу поставлено завдання створити спосіб підготовки проб біорідин для визначення вмісту речовин ліпідної природи шляхом адсорбції досліджуваних біорідин безпосередньо на фільтрувальний знезолений чи хроматографічний папір з паралельним позбавленням води і екстракцією загальних ліпідів в однофазну систему розчинників без включення метанолу, що забезпечило можливість необмеженого відбору кількості проб за умов будь-якої лабораторії, в тому числі і в експедиції, і дозволяє працювати з мікрокількостями біологічного матеріалу, зменшує кількість операцій в пробі і усуває контакт працюючого з особливо небезпечним розчинником.

Поставлене завдання досягається тим, що в способі підготовки проб біорідин для визначення вмісту речовин ліпідної природи відібрана в мікродозах біологічна рідина наноситься на попередньо розмічений і підписаний фільтрувальний знезоле-

ний чи хроматографічний папір з паралельним позбавленням проб від гідрофільної водної компоненти, а екстракція загальних ліпідів відтворюється однофазною гідрофобною системою органічних розчинників в яку входять хлороформ - ацетон - етанол у співвідношенні 7:2:1.

Сукупність суттєвих ознак запропонованого винаходу усуває недоліки відомих способів і забезпечує можливість відтворення способу підготовки проб біорідин для визначення вмісту речовин ліпідної природи в умовах більшості лабораторій, в тому числі експедиційних, при тому знімає обмеження в кількості відбору проб при обстеженні певних популяцій тварин чи великих груп людей, зайнятих в шкідливих виробництвах, або які мешкають в екологічно забруднених районах.

Таким чином, запропонований винахід за допомогою нових суттєвих ознак забезпечує можливість працювати з мікродозами біологічних рідин без обмеження кількості відібраних проб в умовах будь-якої лабораторії з послідуною необмеженою в часі певними термінами екстракцією загальних ліпідів з фіксованого біологічного матеріалу значно менш шкідливою сумішшю розчинників і виключаючи операцію відмивання екстракту від речовин неліпідної природи.

Спосіб відтворюється таким чином.

Відібрану традиційними методами біологічну рідину з організму людини та тварин невеликими аліквотами - в більшості випадків дуже зручно напівавтоматичними піпетками по 20-50 мкл наносять, адсорбуючи на попередньо розмічений наприклад квадратами (35x35 мм) і підписаний простим олівцем фільтрувальний знезолений чи хроматографічний папір.

Цей папір кладеться на сітчасту підставку, щоб випаровування води було можливим як з верхньої, так і з нижньої площини. Бажано, щоб цей сітчастий каркас стояв у місці, де немає прямих сонячних променів і впродовж протягу повітряних мас чи з підключенням вентилятору, щоб скоротити час випаровування води. В залежності від вмісту органічних компонентів в досліджуваній біологічній рідині в плямі концентрують в межах 40-300 мкл матеріалу. Відібрані для аналізу проби зручно зберігати в поліетиленових планшетах в морозильному відділенні побутового холодильника і поступово відбирати для аналізу в лабораторних умовах.

Досліджувану пробу у вигляді плями на папері подрібнюють ножицями на невеликі лоскутки (2x3 мм²) і засипають у пробірку з притертою пробкою. Екстракцію загальних ліпідів проводимо однофазною системою органічних розчинників в такому співвідношенні: хлороформ - ацетон - етанол (7:2:1).

Як видно з табл. 1, ця суміш найбільш повно екстрагує всі фракції загальних ліпідів. Кількість суміші розчинників екстрагуючої системи беруть у відношенні до проби (20:1). Так, наприклад, на 0,1 мл (100 мкл) сироватки крові потрібно взяти 2 мл (200 мкл) розчинника. Для більш повної екстракції ліпідів ця суміш додається до проби частинами. Так, в наведеному варіанті спочатку в пробірку до подрібненої проби доливають 1 мл розчинника і впродовж 15 хвилин ставлять в коливний апарат. Потім зливають в точно зважений бюкс чи конусо-

подібну пробірку, а до проби ще два рази додають по 0,5 мл суміші з 5-хвилинним інтервалом перебування в коливному апараті. Екстракт після випарювання розчинника готовий для подальшого аналізу.

Зберігання проб біорідин, адсорбованих на папері впродовж шести місяців, достовірно не змінює спектра основних фракцій екстрагованих ліпідів, що видно з табл. 2 на прикладі сироватки крові.

Хроматографічне розділення загальних ліпідів проводять на фабрично виготовлених пластинах Silufol (ЧССР) розміром 15x15 см, попередньо активуючи їх впродовж 1 години в термостаті при 110°C. В цей же час в хроматографічну камеру для кращого насичення вносять фільтрувальний папір і наливають суміш розчинників: гексан - діетиловий ефір - оцтова кислота (7:23:1). Сухий залишок ліпідів розчиняють в хлороформно-бензольно-ацетонній суміші (1:2:1) в 20-100 мкл (в залежності від аналізованої біорідини) і наносять на розмічену хроматограму мікрошприцем.

Розподіл ліпідів на основні фракції, якими є фосфоліпіди, вільний холестерин, вільні жирні кислоти, тригліцериди та ефірозв'язаний холестерин, відбувається впродовж 11-14 хвилин. Після видалення з хроматограм у витяжній шафі розчинника, їх фарбують з допомогою скляного лабораторного обприскувача 10%-ним розчином фосфомолібденової кислоти в етанолі. І ще вологими кладуть в термостат, підігрітий до 110°C, для проявлення плям ліпідів. Зазначимо, що, крім названих фракцій ліпідів, на хроматограмах проявляються ще 2-4 неідентифікованих плями.

Для кількісної оцінки ліпідів використовується вітчизняний денситометр ДО-1М. В табл. 3 наведені дані про вміст основних фракцій ліпідів в різних досліджуваних біорідинах людини та тварин, які в своїй більшості узгоджуються з даними літератури, що свідчить про високу надійність відтворення цього способу в кожній традиційно обладнаній лабораторії.

Наведені в табл. 1, 2, 3 експериментальні дані вказують на суттєві переваги запропонованого нами способу підготовки проб біорідин для визначення вмісту речовин ліпідної природи, а саме: адсорбовані на фільтрувальному чи хроматографічному папері проби біологічних рідин з паралельним усуненням гідрофільної водної компоненти можна зберігати впродовж шести місяців, що дозволяє досліднику аналізувати піддослідний матеріал певними порціями у вигідний для нього час; спосіб дозволяє працювати з мікродозами біологі-

чних рідин і відбирати необмежену кількість проб за умов будь-якої лабораторії, в тому числі в експедиційних умовах; екстракція ліпідів в однофазну гідрофобну систему розчинників виключає відмивання екстракту від речовин неліпідної природи і очікування чіткого розділення фаз розчинників; відсутність в екстрагуючій системі розчинників метанолу, одного з найнебезпечніших для здоров'я дослідника розчинників, дає можливість застосування цього способу в умовах традиційно обладнаної лабораторії; при цьому методі визначення ліпідів в біологічних рідинах значно зменшується розкид даних, що певною мірою підвищує достовірність отриманих результатів.

Джерела інформації

1. Петрунькина А.М. Практическая биохимия. - М.: Медгиз, 1961. - С. 435.
2. Тодоров И. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. - София, 1963. - С. 516.
3. Травина О.В. Руководство по биохимическим исследованиям. - М., Медгиз, 1965. - С. 374.
4. Рейншаль М.С., Розенберг О.А. Быстрый метод определения содержания фосфолипидов в амниотической жидкости // Лаб. дело. - 1978. - № 2. - С. 98-101.
5. Смышляева В.И. Стандартный раствор для определения триглицеридов в сыворотке крови // Лаб. дело. - 1981. - № 11.
6. Кейтс М.В. Техника в липидологии. - М.: Мир, 1975. - С. 324.
7. Кучинские З. Тонкослойная хроматография липидов в диагностике семейной гиперхолестеринемии // Лаб. дело. - 1981. - № 11. - С. 701-705.
8. Ростовцев В.Н., Резник Г.Е. Количественное определение липидных фракций плазмы крови // Лаб. дело. - 1982. - № 4. - С. 218-221.
9. Максименко В.Б. Количественная тонкослойная хроматография липидов и эфиров холестерина // Лаб. дело. - 1983. - № 12. - С. 17-21.
10. Кеда Б.И., Эндмина О.В., Тонанова Г.В. Комбинированное проявление фракций липидов крови на пластинах силуфол // Лаб. дело. - 1984. - № 8. - С. 478-481.
11. Петровский В.И., Рогеранд П.И., Лизенко Е.И. Экстракция, разделение и количественное определение липидных фракций сыворотки крови // Лаб. дело. - 1986. - № 6. - С. 339-343.
12. Никулина Г.Г., Петрунь Н.М., Сербина Е.И. Оценка гиперлипидемии по соотношению фракций липидов сыворотки крови при заболеваниях почек // Лаб. дело. - 1988. - № 9. - С. 12-15.

Таблиця 1

Екстракція загальних ліпідів сироватки крові різними комбінаціями розчинників

Комбінація розчинників	Стан проби	Фосфоліпіди	Вільний холестерин	Вільні жирні кислоти	Тригліцериди	Ефіри холестерину
Хлороформ	Сироватка крові людини, адсорбована на хроматографічному папері	207,6±31,7	121,3±9,4	6,7±1,3	84,5±6,5	107,4±8,1
Хлороформ-метанол (2:1)		214,3±22,5	127,5±9,6	15,2±4,5	106,8±7,9	121,6±13,4
Хлороформ-етанол (5:1)		209,9±19,4	125,3±10,1	32,8±4,1	101,3±8,2	112,7±8,5
Хлороформ-ацетон (8:2)		218,5±23,2	131,5±9,7	29,7±3,0	111,4±9,1	115,8±10,3
Хлороформ-ацетон-етанол (7:2:1)		232,3±21,8	139,6±8,4	41,8±3,2	114,5±10,4	118,4±9,3
Прототип	Безпосередньо з рідини	227,5±34,6	142,4±9,8	36,2±3,9	109,3±10,8	123,6±14,4

Концентрація окремих фракцій ліпідів дана в мг/% (n=7).

Таблиця 2

Ліпіди в сироватці крові при різних термінах зберігання адсорбних проб (мг%, n=7)

Термін зберігання	Фосфоліпіди	Вільний холестерин	Вільні жирні кислоти	Тригліцериди	Ефіри холестерину
В день взяття проби	228,3±20,1	137,4±9,2	36,9±2,7	11,6±7,4	123,8±12,6
Через 1 місяць	231,8±21,3	140,2±10,5	37,5±3,1	108,3±6,9	121,4±11,5
Через 3 місяці	227,4±19,7	138,6±9,7	40,8±2,9	112,5±9,3	120,9±9,7
Через 6 місяців	225,9±22,4	141,3±11,2	41,4±3,3	110,0±8,7	118,6±10,4

Таблиця 3

Порівняльні дані основних фракцій ліпідів в біорідинах людини та тварин (мг%, n=5)

Біорідина	Фосфоліпіди	Вільний холестерин	Вільні жирні кислоти	Тригліцериди	Ефіри холестерину
Сироватка крові людини	232,3±21,8	139,6±8,4	41,8±3,2	114,5±10,4	118,4±9,4
Слина людини	24,2±3,1	8,7±1,6	11,0±2,2	9,4±2,0	6,7±1,8
Печінкова жовч собаки	207,6±24,3	41,2±3,8	73,8±8,9	17,7±2,4	19,5±2,3
Шлунковий сік собаки	39,7±4,2	14,8±2,1	16,4±2,3	11,2±1,8	9,5±1,3
Печінкова жовч щура	68,5±5,9	36,4±3,1	34,1±2,5	11,8±1,4	10,8±0,9

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2001 р. Формат 60x84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22