



УКРАЇНА

(19) UA (11) 45915 (13) A

(51) 6 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 ЕУФІЛІНУ У СІРОВАТЦІ КРОВІ ШЛЯХОМ КАПІЛЯРНОГО ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ

1

2

(21) 2001117811

(22) 15 11 2001

(24) 15 04 2002

(46) 15 04 2002, Бюл. № 4, 2002 р.

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

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

(57) 1 Спосіб визначення концентрації еуфіліну в сироватці крові шляхом капілярного електрофорезу, який відрізняється тим, що приготують перший, другий та третій буферні розчини, змішують пробу після фільтрації з третім буферним розчином, центрифугують зі швидкістю 2000-6000 об/хв протягом 2-6 хв, розміщують капілярну трубку між пробою та другим буферним розчином як електролітичним середовищем, з можливістю підтримки внутрішнього тиску в порожнині капілярної трубки на рівні 30 бар протягом 15 сек, підводять до проби та другого буферного розчину потенціали висковольтного джерела напругою 20

кВ, комутують ланцюги живлення, реєструють оптичну щільність проби під час її переміщення в капілярній трубці, ідентифікують та визначають вміст еуфіліну шляхом перетворення реєстраційних даних в аналоговий сигнал

2 Спосіб визначення концентрації еуфіліну в сироватці крові шляхом капілярного електрофорезу за п. 1, який відрізняється тим, що при приготуванні першого буферного розчину змішують борну кислоту, тетраборат натрію та воду дистильовану у співвідношенні об'ємних частин 5,5 6,5 38,0 см<sup>3</sup>3 Спосіб визначення концентрації еуфіліну в сироватці крові шляхом капілярного електрофорезу за п. 1, який відрізняється тим, що при приготуванні другого буферного розчину до першого буферного розчину додають додецилсульфат натрію та воду дистильовану у співвідношенні об'ємних частин 25 10 15 см<sup>3</sup>4 Спосіб визначення концентрації еуфіліну в сироватці крові шляхом капілярного електрофорезу за п. 1, який відрізняється тим, що при приготуванні третього буферного розчину до другого буферного розчину додають воду дистильовану у співвідношенні об'ємних частин 1 10 см<sup>3</sup>

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 еуфіліну в сироватці крові або до засобів визначення амінокардолу, амінофіліну, аммофіліну, діафіліну, гемофіліну, метафіліну, неофіліну, як синонімів шуканого агента [1]

На підставі відсутності співпадінь призначення відомих об'єктів, до важливіших характеристик яких належать середовище, що утримує фракції (сироватка крові), функція (визначення концентрації) і конкретний вид матеріалу (еуфілін) можливо

стверджувати про відсутність аналогів для винаходу, що заявляється

У основу винаходу поставлена задача розробити спосіб визначення концентрації еуфіліну 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 еуфіліну в сироватці крові шляхом капілярного електрофорезу, характеризується тим, що приготують перший, другий та третій буферні розчини, змішують пробу після фільтрації з третім буферним розчином, центрифугують зі швидкістю 2000 - 6000 об/хв протягом 2 - 6 хв, розміщують

(13) A

(11) 45915

(19) UA

капілярну трубку між пробой та другим буферним розчином, як електролітичним середовищем, з можливістю підтримки внутрішнього тиску в порожнині капілярної трубки на рівні 30 бар протягом 15 сек, підводять до проби та другого буферного розчину потенціали високовольтного джерела напругою 20кВ, комутують ланцюги живлення, реєструють оптичну щільність проби під час її переміщення в капілярній трубці, ідентифікують та визначають вміст еуфіліну шляхом перетворення реєстраційних даних в аналоговий сигнал, при умові, що при приготуванні першого буферного розчину змішують борну кислоту, тетраборат натрію та воду дистильовану у співвідношенні об'ємних частин 5,5 6,5 38,0 см<sup>3</sup>, при приготуванні другого буферного розчину до першого буферного розчину додають додецилсульфат натрію та воду дистильовану у співвідношенні об'ємних частин 25 10 15 см<sup>3</sup>, при приготуванні третього буферного розчину до другого буферного розчину додають воду дистильовану у співвідношенні об'ємних частин 1 10 см<sup>3</sup>.

Виготовлення буферних розчинів дозволяє отримати та підготувати форетичне й електролітичне середовища до експлуатації, забезпечити динамічне переміщення аналізата в порожнині капіляру, виявлення кількісних часток фракції, що підлягають реєстрації. Центрифугування проби переспідує дегазацію сироватки крові для безпешкоподібного потрапляння в порожнину капілярної трубки та подальшого переміщення. При центрифугуванні проби зі швидкістю менше 2000 об/хв дегазація аналізату може стати не ефективною, а при швидкості понад 6000 об/хв - пробірка Еппендорфа з пробой часто не витримує зусиль центробіжних навантажень. Центрифугування проби протягом менше 2 хв також характеризується замалою дегазацією, а використання більш тривалого терміну центрифугування, наприклад понад 6 хв - недоцільно технологічно та вважається межею досягнення ефекту. Змішування проби з третім буферним розчином передбачає поляризацію еуфіліну в електрофоретичному середовищі, завдяки стійкому зв'язку з зарядженими міцелами додецилсульфату натрію, а від того - під впливом електричного поля забезпечує міграцію часток еуфіліну в бік до аноду чи електроліту. Розміщення капілярної трубки між пробірками з пробой та другим буферним розчином, як електролітичним середовищем, разом із високовольтним джерелом напруги та ланцюгами живлення відтворює капілярний електрофорез, тобто - умови переміщення розділених часток фракції для остаточної ідентифікації та визначення. Підтримка тиску в капілярній трубці на рівні 30 мБар при експозиції 15 сек дозволяє вийти форетичному середовищу, функцію якого придбає проба, до порожнини капіляру, та оптимізувати чутливість детектора під час ідентифікації фракцій еуфіліну. Відхилення від цієї умови недоцільно, бо при зменшенні експозиції підтримки тиску в капілярі можливо погіршення чутливості детектора з умовами ідентифікації еуфіліну, а при збільшенні - стримується ввід аналізата в капіляр, а від так - відбувається спотворення реєстрації. Використання високовольтного джерела напругою 20 кВ зумовлює необхідну

швидкість руху часток проби в капілярній трубці під час відтворення форетичного процесу. В разі зниження напруги джерела живлення збільшується термін виходу аналізата, а при підвищенні - спотворюються результати ідентифікації та визначення концентрації шуканого агента в пробі. Між тим, реєстрація оптичної щільності еуфіліну, активовані молекули якого рухаються крізь капілярну зону у вигляді форетичного середовища, з подальшим перетворенням даних в аналоговий сигнал, дозволяє визначити концентрацію аналізата в пробі сироватки крові.

Досягнення означеного вище технічного результату додатково зумовлене утриманням першим буферним розчином борної кислоти, тетрабората натрію та води дистильованої в технологічно прийнятному співвідношенні об'ємних частин 5,5 6,5 38,0 (см<sup>3</sup>), бо має вплив на поляризувальність форетичного середовища. При цьому, утримування першого буферного розчину у другому, у вигляді суміші з додецилсульфатом натрію та водою дистильованою при технологічно прийнятному співвідношенні об'ємних частин 25 10 15 (см<sup>3</sup>) активує форетичний рух нейтральних молекул еуфіліну в капілярній трубці, оскільки регулює зв'язок останніх з зарядженими міцелами додецилсульфата натрію при міграції до анода. Зниження кількості додецилсульфата натрію в розчині, як електролітичному середовищі, може погіршити активність власних міцел, а завищена присутність виснажує електролітичний носій при використанні. Між тим, розбавлення другого буферного розчину водою дистильованою у співвідношенні 1 10 оптимізує чутливість ідентифікації та детектування оптичної щільності та є найбільш оптимальним. Так, при збільшеній концентрації проби, виникають переважно помилки ідентифікації еуфіліну з-поза не досить стабільного виходу фракцій, перешкод у потрапленні цього робочого розчину в порожнину капіляру крізь замалий геометричний перетин при міграції до аноду, а при зменшеній концентрації - погіршуються міграційні можливості виділених фракцій, фізичні властивості форетичного середовища, виснажується робоче середовище, як чинники низького коефіцієнту корисної дії форетичного процесу. Отже, буферні суміші поляризують пробу сироватки крові з наданням їй форетичних властивостей, які при відтворенні капілярного електрофорезу забезпечують рішення поставленої задачі.

Сукупність наданих ознак відбиває технологічні умови ідентифікації, реєстрації та визначення концентрації еуфіліну в пробі, для яких великим характерним вважається виключення необхідності додання зайвих домішок до проби, яке має зв'язок з підвищенням ступені екстракції аналізата та чутливості при використанні.

Отже, сукупність відокремлюючих ознак заявленого об'єкта за наявності причинно-слідчих зв'язків з технічним результатом є істотною.

Для визначення концентрації еуфіліну у сироватці крові доцільно застосування промислової системи капілярного електрофорезу «Капель-103Р» (виробництва РФ), кварцового капіляру Ø 0,075 мм і довжиною 600 мм, ваг лабораторних 2 класу, мір маси, дозаторів піпеточних змінних об-

сялів (5 - 50мм<sup>3</sup>, 50 - 200мм<sup>3</sup>, 200 - 1000мм<sup>3</sup>), рН метру, програмного забезпечення «Мультіхром» й комп'ютера мінімальної конфігурації

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

Допоміжні пристрої: центрифуга (на 2000 - 6000об/хв), пробірки одноразові типу Еппендорфа, місткістю 1,5см<sup>3</sup>, фільтри целюлозно-ацетатні, з діаметром пір від 20мкм, насадки фільтра

Реактиви: вода дистильована, додецилсульфат натрію, борна кислота, натрій тетраборнокислий, з молярною концентрацією еквівалентів не менше 0,1 моль/дм<sup>3</sup>

Спосіб визначення концентрації еуфіліну у сироватці крові виконують у наступній послідовності

Заздалегідь приготровляють перший, другий та третій буферні розчини

Перший буферний розчин формують шляхом змішування борної кислоти, тетрабората натрію та води дистильованої, другий - шляхом додання до першого буферного розчину додецилсульфата натрію та води дистильованої, третій - розчиненням другого буферного розчину водою дистильованою, при технологічно сприйнятливих співвідношеннях масових частин інгредієнтів буферів

Після фільтрації проби відібраної сироватки крові до неї додають третій буферний розчин і дегазують шляхом центрифугування у заданому технологічному режимі. Між пробю та електролітичним середовищем, функцію якого виконує другий буферний розчин, встановлюють капілярну трубку, забезпечують її порожнині необхідний режим внутрішнього тиску та підводять потенціали високовольтного живлення. Після комутації електричних ланцюгів нейтральні молекули еуфіліну мігрують від власної пробірки до пробірки з другим буферним розчином крізь капілярний провідник, внаслідок взаємодії із зарядженими міцелами додецилсульфата натрію під впливом електричного струму. За допомогою детектора, що розміщений впритул до капіляра, ідентифікують та реєструють оптичну щільність фракцій еуфіліну шляхом перетворення даних в аналоговий сигнал та визначають вміст еуфіліну в пробі

Тож, спосіб дозволив шляхом капілярного електрофорезу визначити концентрацію аналізата в пробі, а разом із цим - забезпечити технологічно сприйнятливий ступінь екстракції аналізата і чутливість детектування, в тій мірі, що вважається ефективною для подальшого терапевтичного втручання та коректування станів

Додатково запропонованому способу притаманні висока економічність та низький термін визначення вмісту аналізата, відсутність необхідності використання домішок для примусового виділення фракцій еуфіліну, переважно токсичних, простота відтворення тощо

Для перевірки технічного результату, що досягається, на прикладі конкретного використання в пробі сироватки крові людини визначали концентрацію еуфіліну в наступній послідовності

Для виготовлення першого буферного розчину у мірну колбу місткістю 50см<sup>3</sup> додавали 5,5см<sup>3</sup>

розчину борної кислоти при концентрації 0,2 моль/дм<sup>3</sup>, 6,5см<sup>3</sup> розчину тетрабората натрію при концентрації 0,05 моль/дм<sup>3</sup> а потім обсяг доводили до мітки дистильованою водою

Другий буферний розчин складали шляхом вміщення до мірної колби місткістю 50см<sup>3</sup> першого буферного розчину у обсязі 25см<sup>3</sup> та розчину додецилсульфата натрію при його концентрації 0,2моль/дм<sup>3</sup> 10см<sup>3</sup>, з наступним доведенням обсягу дистильованою водою до мітки

Термін зберігання розчинів в судинах з поліетилену складав 1 місяць

Безпосередньо перед вимірюваннями, другий буферний розчин розбавляли водою дистильованою у співвідношенні 1 : 10

Для підготовки пробі до аналізу її фільтрували через целюлозно-ацетатний фільтр, заздалегідь промитий дистильованою водою. У пробірку Еппендорфа відбирали 0,3см<sup>3</sup> сироватки крові й додавали 0,3см<sup>3</sup> третього буферного розчину, перемішували та дегазували на центрифугі протягом 5 хв зі швидкістю 4000 об/хв. Під впливом першого буферного розчину фракції еуфіліну поляризувалися, а суміш набувала властивості форетичного середовища

Між пробірками з пробю та другим буферним розчином, як електролітичним середовищем, встановлювали капілярну трубку. Перед підведенням до них потенціалів високовольтного джерела напругою 20кВ, в порожнині капіляра протягом 1-5 сек утворювали тиск, що дорівнював 30 мБар дискретно. Після комутації ланцюгів електричного живлення нейтральні молекули еуфіліну під рухалися до аноду у форетичному середовищі крізь капіляр. На довжині хвилі детектора 254нм, що контактував із капілярною трубкою, ідентифікували фракції еуфіліну в пробі сироватки крові та визначали його концентрацію шляхом перетворення оптичної щільності потоку в аналоговий сигнал й обчислення за допомогою програмного забезпечення «Мультіхром» на комп'ютері

Сигнал з приладу надходив до комп'ютера та відбивався у вигляді електрофореграми. Побудова градуировочної залежності, з використанням значень шуканого агента між верхньою та нижньою межами виявлення, визначення площ піків заданої концентрації дозволили визначити концентрацію еуфіліну в пробі

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

Отже, на прикладі конкретного використання об'єкта вперше доведена можливість визначення концентрації еуфіліну в сироватці крові. Використання запропонованого високорентабельного способу науково-дослідними лабораторіями медичних підприємств допоможе, окрім забезпечення технологічно сприйнятливої чутливості та ступіні екстракції еуфіліну, своєчасно коригувати його вміст в крові людини на підставі високоточних результатів дослідження

Таблиця 1

Техніко-економічне порівняння шляхів капілярного електрофорезу  
та рідинної хроматографії для визначення вмісту еуфіліну в хімічних сполуках

Показники	Заявлене рішення задачі
Чутливість визначення еуфіліну в пробі, нг/мл	30
Ступінь екстракції еуфіліну, од	1,00
Загальна тривалість пробопідготовки, хв	7
- термін центрифугування, хв	5
- термін фільтрації, хв	2
Загальний термін аналізу, хв	12
Загальна вартість обладнання, ум од	11000

Джерела інформації

1 Машковский М. Д. Лекарственные средства. В двух томах. Т. 1. Изд. 10-е, стереотипное. – М.: «Медицина», 1987. – с. 457.

---

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