



УКРАЇНА

(19) UA (11) 58675 (13) U  
(51) МПК (2011.01)  
G01N 33/48 (2011.01)  
G01N 30/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ ХРОМАТОГРАФІЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СУМАРНОГО ЖИРНОКИСЛОТНОГО СКЛАДУ БІОЛОГІЧНИХ РІДИН**

1

2

(21) u201009937

(22) 10.08.2010

(24) 26.04.2011

(46) 26.04.2011, Бюл.№ 8, 2011 р.

(72) АРІПОВСКИЙ АЛЕКСАНДР ВІКТОРОВІЧ, RU, КОЛЕСНИК ПАВЛО ОЛЕГОВИЧ, ВЕЖДЕЛ МАРІЯ ІВАНІВНА, РОСТОКА-РЕЗНІКОВА МАР'ЯНА ВАСИЛІВНА, КІРСАНОВА МАРИНА ПЕТРІВНА, ЦЯПЕЦЬ СЕРГІЙ ВАСИЛЬОВИЧ, ГЛАЗКОВА ГАЛІНА ПЕТРОВНА, RU

(73) ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД "УЖГОРОДСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ"

(57) Спосіб хроматографічного визначення сумарного жирнокислотного складу біологічних рідин, який включає відділення ліпідів від матричного матеріалу, який **відрізняється** тим, що рідкий зразок біологічного матеріалу, а саме кров, сироватку, суспензію клітин, гомогенізувати тканини, сушать для одержання зразка безводного біологічного матеріалу в апараті сублімаційного сушіння або в ротарційному вакуумному концентраторі типу "Savant SpeedVac", при цьому аліквота зразка досліджуваного рідкого біологічного матеріалу в кількості 20-500 мкл зневоднюється безпосередньо в пробірці

для дериватизації, а ліпіди висушеного зразка біологічного матеріалу у цій же пробірці перетворюють у відповідні метилові ефіри нагріванням з розчином 0,5 N метилату натрію в метанолі з розрахунку 150 мкл розчину метилату натрію на 100 мкл крові або 15 %-ого гомогенізатору, а присутні вільні жирні кислоти нагрівають з 10 %-им метанольним розчином трифтористого бору з розрахунку 0,8-1,0 мл на 100 мкл крові або 15 %-ого гомогенізатору, причому після закінчення метилювання спиртовий розчин зразка біологічного матеріалу розбавляють дистильованою водою вдвічі, після чого екстрагують одержані метилові ефіри жирних кислот в гептанову неполярну фазу, при цьому дещо уповільнене розшарування водно-спиртової та неполярної гептанової фази на стадії екстракції ефірів з реакційної суміші прискорюють додаванням краплі пропілового спирту або короткочасним (1-2 хв.) центрифугуванням в низькооборотній центрифугі, після чого екстраговані в гептанову фазу метилові ефіри жирних кислот визна-чають кількісно методом капілярної газової хроматографії на колонці з полярною іммобілізованою рідкою фазою.

Корисна модель відноситься до галузі медицини, зокрема до клініко-лабораторних досліджень і може бути використаний для визначення жирнокислотного складу ліпідів у біологічних зразках різного походження.

В даний час дослідження жирнокислотного складу біологічних об'єктів у всіх випадках починається з екстракційного вилучення суми ліпідів та концентрування екстракту. Сучасні варіанти цього способу (наприклад, екстракція вуглекислотою в надкритичних умовах [1]) представляють безсумнівний інтерес для хімічної технології та біотехнології, однак як спосіб лабораторного дослідження вважаються малоперспективними.

В ході лабораторних досліджень відділення ліпідів від матричного матеріалу в усіх випадках,

що нам відомі, проводиться за способом Фолча. Отже, саме цей спосіб слід вважати прототипом - за відсутністю спрощених безекстракційних варіантів.

Суть загальновідомого і надзвичайно популярного способу Фолча полягає в дворазовій екстракції рідкого зразка або гомогенізатора великими (зазвичай 6 - або 10-кратними) обсягами суміші хлороформу з метанолом, 2:1, і промиванням об'єднаних екстрактів ізотонічним розчином хлоридів натрію або калію [ 2 ]. Інколи зустрічаються згадки про можливість використання суміші спирту з вуглеводнем [3, с.155].

Даний спосіб має ряд суттєвих недоліків: вихід ліпідів при їх екстракції за способом Фолча в оптимальних умовах складає 90-95%, однак величина ступеня вилучення відчутно залежить, наприклад,

(13) U

(11) 58675

(19) UA

від ефективності гомогенізації вихідного матеріалу. Жирнокислотні фрагменти, що хімічно іммобілізовані на клітинних мембранах або ковалентно зв'язані в молекулах гліколіпідів і ліпопротеїдів, не можуть бути вилучені в ході екстракції по Фолчу: зрозуміло, що переведенню в метилові ефіри вони вже не піддаються і не можуть бути визначені за допомогою газової хроматографії.

Також, як правило, трифазні суміші «водний метанол - хлороформ - дрібнодисперсний твердий матеріал» після екстракції зразка за Фолчем розшаровуються дуже погано, потребують тривалого (іноді багатогодинного) настоювання, фільтрування або ефективного центрифугування. Такі процедури є вкрай трудомісткими й тривалими, і до того ж не піддаються автоматизації чи суттєвому спрощенню.

Операції з великими обсягами розбавлених розчинів ліпідів в органічних розчинниках завжди супроводжуються частковим окисненням і фотодеструкцією поліненасичених сполук. Використання ж низьких температур, інертних атмосфер і попередньо дегазованих розчинників надзвичайно ускладнює препаративні роботи.

В основі корисної моделі поставлене завдання створити варіант хроматографічного визначення сумарного жирнокислотного складу зразка, що був би вільний від перерахованих вище недоліків прототипу (крайня трудомісткість, необхідність тривалих маніпуляцій з розбавленими розчинами, неповнота екстракції ліпідів).

Отже, ми пропонуємо спосіб хроматографічного визначення сумарного жирнокислотного складу біологічних рідин, який включає відділення ліпідів від матричного матеріалу, який відрізняється тим, що рідкий зразок біологічного матеріалу, а саме кров, сироватка, суспензія клітин, гомогенізат тканини, сушать для одержання зразка безводного біологічного матеріалу в апараті сублімаційного сушіння або в ротаційному вакуумному концентраторі типу «Savant SpeedVac», при цьому аліквота зразка досліджуваного рідкого біологічного матеріалу в кількості 20-500 мкл. зневоднюється безпосередньо в пробірці для дериватизації, а ліпіди висушеного зразка біологічного матеріалу у цій же пробірці перетворюють у відповідні метилові ефіри нагріванням з розчином 0,5 N метилата натрію в метанолі з розрахунком 150 мкл розчину метилата натрію на 100 мкл. крові або 15 %-вого гомогенізату, а присутні вільні жирні кислоти нагрівають з 10 %-им метанольним розчином трьохфтористого бору з розрахунком 0,8-1,0 мл. на 100 мкл. крові або 15 %-вого гомогенізату, причому після закінчення метилювання спиртовий розчин зразка біологічного матеріалу розбавляють дистильованою водою вдвічі, після чого екстрагують одержані метилові ефіри жирних кислот в гептанову неполярну фазу, при цьому дещо уповільнене розшарування водно-спиртової та неполярної гептанової фази на стадії екстракції ефірів з реакційної суміші прискорюють додаванням краплі пропілового спирту або короткочасним (1-2 хв.) центрифугуванням в низькооборотній

центрифузі, після чого екстраговані в гептанову фазу метилові ефіри жирних кислот визначають кількісно способом капілярної газової хроматографії на колонці з полярною іммобілізованою рідкою фазою.

Основна перевага пропонованого нами способу полягає в принциповому спрощенні та прискоренні підготовки біологічного зразка для хроматографічного аналізу. Продуктивність сушильних установок типу «SpeedVac» дуже висока і визначається тільки числом гнізд в каруселі центрифуги (те ж саме справедливо стосовно препаративних приладів для сублімаційного сушіння); таким чином, кілька десятків зразків можуть бути висушені, прометильовані і повністю підготовлені до аналізу протягом порівняно короткого часу (2,5-3 години). Здається істотною і та обставина, що процес підготовки зразка за цим способом полягає у виконанні послідовності нескладних операцій, що не вимагають високої кваліфікації персоналу та легко автоматизуються - на відміну від повсюдно використовуваної в даний час схеми «дворазова екстракція за Фолчем - промивання - концентрування - дериватизація». Отже, як бачимо, даний спосіб може бути використаний у великомасштабних дослідженнях та є зручним для використання.

Зразки цільної крові, плазми, еритроцитарної маси надані Серпуховською станцією переливання крові. Гомогенізати (м'язової і печінкової тканини) отримані за допомогою стандартного поршневого гомогенізатора.

Спосіб здійснюється наступним чином. Приклад: у скляні пробірки для роботи під тиском розміщують по 100 мкл досліджуваних зразків рідких біологічних матеріалів, додають по 100 мкл розчину внутрішнього стандарту в метанолі (маргарінова кислота, 200-600 мкг / мл), поміщають пробірки до гнізд карусельної центрифуги установок «Savant SpeedVac» і сушать зразки у вакуумі при кімнатній температурі до повітряно-сухого стану (30-60 хв). До ідентичного результату приводить використання сублімаційної сушарки «Іней 3-2» (у цьому випадку спиртовий розчин внутрішнього стандарту додавався до зразка вже після її ліофілізації). Дериватизація проведена відповідно до рекомендацій [3]. До висушеного залишку біологічного матеріалу додають 150 мкл 0,5 N розчину метилата натрію в метанолі і нагрівають 2-3 хв в настільному термоблоці при температурі 60-65°C, після чого додають 1,0 мл 10 %-ного метанольного розчину трифториду бору, щільно загвинчують кришку пробірки і нагрівають суміш протягом 40 хв. при 75°C. До ідентичного результату приводить сапоніфікація сухого зразка дією 150 мкл 0,5 N розчину їдкого натру (замість метилата натрію) у метанолі і подальше нагрівання з 1 мл суміші «2N метанольний розчин сухого хлористого водню - бензол - 2,2-діметоксіпропан», 100:20:5. Температурні умови лужної сапоніфікації і кислого метилювання в цьому випадку ідентичні наведеним вище. Після закінчення метилювання в охолоджені пробірки вносять по 1,0 мл чистого н-гептану, 1,0 мл води, екстрагують метилові ефіри в вуглеводневу фазу. До верхньої фази додають 10 мкл н-пропанолу і

домагаються повного розшарування емульсії з використанням низькооборотної центрифуги установки «Savant SpeedVac» (1-2 хв). Екстраговані в гептанову фазу метилові ефіри визначають способом газової хроматографії.

Умови хроматографування:

Використано аналітичний газовий хроматограф «Варіан 3900» (США) і кварцову капілярну колонку з іммобілізованою нерухомою фазою «Супелковакс-10» (15 м x 0,25 мм x 0,3 мкм) виробництва «СУПЕЛКО», Швейцарія. Введення зразка (2 мкл) - без поділу потоку газу-носія (гелій), перехід до режиму поділу потоку - через 12 - 30 секунд, залежно від концентрації досліджуваних речовин. Температурна програма аналізу - від 90С (0,5 хв) до 240С (5 хв) зі швидкістю 6С/мін. Детектор - полум'яно-іонізаційний (260С), реєстрація сигналу - комп'ютерна програма «Мультіхром-1, 5х» виробництва З АТ «Амперсенд», РФ. Кількісне визначення - за способом внутрішнього стандарту (з попереднім обчисленням відповідних калібрувальних коефіцієнтів з хроматограми модельної суміші жирних кислот з стандартною маргариновою кислотою).

Результати.

Дослідники рідко використовують абсолютні значення концентрацій певних ЖК у медико-діагностичних цілях: величини абсолютних концентрацій сильно залежать від ступеня розбавлення зразка крові консервантом і антикоагулянтном, від величин препаративних втрат зразка на різних стадіях роботи, від похибок при відборі аліквот, визначенні калібрувальних коефіцієнтів та інших факторів. Крім того, в ході фракціонування біоматеріалу (наприклад, отримання

еритроцитарної або тромбоцитарної маси, ліпопротеїнів високої та низької щільності і т.д.) визначення сухої ваги фракцій, як правило, виявляється вельми скрутним. З наведених причин для побудови біомедичних кореляцій частіше використовуються відносні величини: відносини концентрацій суми насичених кислот до суми поліненасичених, відносини сумарних концентрацій  $\omega'_3$ - і  $\omega'_6$ -кислот, відношення

концентрацій кислот C20:466 / C20:5  $\omega'_6$  та ін. Подібний підхід дозволяє звести до мінімуму похибки препаративних та аналітичних маніпуляцій, забезпечує значно кращу міжлабораторну відтворюваність результатів. Тому для порівняльної оцінки метрологічних характеристик двох обговорюваних аналітичних способів в таблиці наведено величини середніх значень і довірчих інтервалів (при 95 % надійності) ряду безрозмірних відносин концентрацій індивідуальних жирних кислот у біологічних зразках різної природи.

Таблиця:

Середні значення співвідношень вагових концентрацій індивідуальних жирних кислот у біологічних об'єктах (і довірчі інтервали середніх значень), визначені:

- (1) прямим метилювання сухої біомаси (спосіб описаний вище);
- (2) метилювання ліпідів, попередньо екстрагованих по Фолчу (класичний спосіб [2]);
- (3) метилювання ліпідів, екстрагованих сумішню гексану з ізопропанолом (однократна екстракція відповідно до [3, с.155]).

Таблиця

ОБ'ЄКТ	Співвідношення концентрацій ( $\pm$ довірчий інтервал, P = 0,95, n= 4-6)					
	16:0\18:0	18:0\18:2	18:2\20:4	18:2\22:5	18:2\22:6	20:4\20:3
цільна кров n=6	2,23 $\pm$ 0,18	0,45 $\pm$ 0,02	2,07 $\pm$ 0,07	34,0 $\pm$ 2,8	6,43 $\pm$ 0,40	5,72 $\pm$ 0,07
цільна кров n=6	2,26 $\pm$ 0,14	0,43 $\pm$ 0,04	2,18 $\pm$ 0,09	37,5 $\pm$ 2,8	6,97 $\pm$ 0,27	5,65 $\pm$ 0,08
цільна кров n=1	5,7	0,22	4,2	51	20	4,3
Кров цільна, попередньо екстрагована по Фолчу <sup>1</sup> , n=1	1,3	0,86	1,85	36	8,6	6,65
Плазма, n=5	3,09 $\pm$ 0,04	0,212 $\pm$ 0,005	3,71 $\pm$ 0,15	116 $\pm$ 16	19,4 $\pm$ 2,7	4,42 $\pm$ 0,11
Плазма, n=5	3,14 $\pm$ 0,08	0,214 $\pm$ 0,003	3,70 $\pm$ 0,21	124 $\pm$ 21	17,4 $\pm$ 2,0	4,40 $\pm$ 0,11
Плазма, n=1	4,1	0,48	2,06	34,2	6,83	5,75
Плазма, попередньо екстрагована по Фолчу <sup>2</sup> , n=1	0,89	1,38	3,25	10,1	>130	1,51
Еритроцитарна маса, n=5	1,98 $\pm$ 0,29	0,60 $\pm$ 0,20	2,00 $\pm$ 0,13	18,3 $\pm$ 4,4	4,29 $\pm$ 0,94	8,8 $\pm$ 1,5

Продовження табл.

	ОБ'ЕКТ	Співвідношення концентрацій ( $\pm$ довірчий інтервал, $P = 0,95$ , $n = 4-6$ )					
		16:0\18:0	18:0\18:2	18:2\20:4	18:2\22:5	18:2\22:6	20:4\20:3
	Еритроцитарна маса, $n=5$	1,98 $\pm$ 0,19	0,66 $\pm$ 0,07	1,99 $\pm$ 0,19	16,5 $\pm$ 2,4	3,97 $\pm$ 0,48	7,9 $\pm$ 1,6
	Еритроцитарна маса, попередньо екстрагована по Фолчу <sup>3</sup> , $n=1$	1,16	1,40	1,57	36,2	4,36	7,2
	Гомогенізатор тканини бичачої печінки, $n=4$	0,478 $\pm$ 0,014	2,38 $\pm$ 0,06	1,42 $\pm$ 0,06	1,89 $\pm$ 0,20	4,70 $\pm$ 0,43	1,382 $\pm$ 0,013
	Гомогенізатор тканини бичачої печінки, $n=4$	0,468 $\pm$ 0,024	2,39 $\pm$ 0,05	1,39 $\pm$ 0,05	1,75 $\pm$ 0,9	4,32 $\pm$ 0,46	1,386 $\pm$ 0,023
	Гомогенізатор тканини бичачої печінки, попередньо екстрагована по Фолчу <sup>4</sup> , $n=1$	1,288	2,54	29,6	50	50	12
	Гомогенізатор тканини грудного м'яза курки, $n=5$	1,540 $\pm$ 0,079	0,502 $\pm$ 0,012	3,45 $\pm$ 0,17	35,4 $\pm$ 3,2	26,2 $\pm$ 2,2	6,03 $\pm$ 0,14
	Гомогенізатор тканини грудного м'яза курки, $n=5$	1,619 $\pm$ 0,105	0,585 $\pm$ 0,051	3,44 $\pm$ 0,18	34,2 $\pm$ 2,5	25,3 $\pm$ 2,7	6,18 $\pm$ 0,16
	Гомогенізатор тканини грудного м'яза курки, попередньо екстрагована по Фолчу <sup>5</sup> , $n=1$	1,600	0,94	4,5	80	54	40

1 Залишок ліпідів, не екстрагуються з Фолчу, - 3,6 відн. %.

2 Залишок ліпідів, не екстрагуються з Фолчу, - 3,5 відн. %.

3 Залишок ліпідів, не екстрагуються з Фолчу, - 18 відн. %.

4 Залишок ліпідів, не екстрагуються з Фолчу, - 1,5 відн. %.

5 Залишок ліпідів, не екстрагуються з Фолчу, - 6,5 відн. %.

Аналіз наведених експериментальних даних дозволяє зробити деякі практично важливі висновки.

- Пропонований нами спосіб прямого метилювання висушеної біомаси призводить до результатів, що статистично не відрізняються від отримуваних при використанні класичного способу Фолча. Близькість величин довірчих інтервалів в обох способах свідчить про те, що розкид

параметрів обумовлений швидше причинами хроматографічної природи (дискримінація компонентів у випарнику, неточності інтегрування малих піків та інше), ніж факторами, пов'язаними з особливостями хімічної підготовки зразків.

- Ліпіди, що екстрагуються за Фолчем, характеризуються істотно іншим жирнокислотним складом у порівнянні з ліпідами того самого зразка, що за Фолчем, однак, не екстрагуються. Це слід вра-

ховувати при плануванні тонких ліпідних досліджень: «ідентичність» результатів (табл.), отриманих способами 1 і 2, обумовлена лише порівняльно незначним вмістом (кілька відсотків від суми ліпідів) не виділеного залишку.

- Одноразова екстракція біологічного матеріалу сумішшю спирту з вуглеводнем (спосіб 3) не може бути рекомендована для визначення жирнокислотного складу зразків.

Корисна модель може бути використана для масштабних скринінгових досліджень жирнокислотного спектру біологічних субстратів у клінічних та біохімічних лабораторіях, що значно спрощує

підготовку зразків до проведення аналізів і сприятиме оптимізації лабораторної діагностики.

Джерела інформації:

[1] Под ред. Северина С.Е., Соловьевой Г.А. Практикум по биохимии. Изд.2, издательство Московского Университета, 1989. С.68-70.

[2] Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. J.Biol.Chem. 1957, 226:497-509. -прототип,

[3] Knapp D.R. Handbook of analytical derivatization reactions. A Wiley-Interscience Publication, John Wiley&Sons Inc. New York, 1979. P. 154, 164-167.