



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: не действует (последнее изменение статуса: 02.07.2021)  
Пошлина: Возможность восстановления: нет.

(21)(22) Заявка: [2012147118/15](#), 06.11.2012(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
06.11.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 06.11.2012

(45) Опубликовано: [20.04.2014](#) Бюл. № [11](#)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: Практикум по биохимии. С.Е.Северин, Т.А.Соловьева, Москва, МГУ, 1989, 509 с. Биохимия липидов: практикум для студентов биол. фак. спец. 1-31 01 01 &laquo;Биология&raquo;, специализации 1-31 01 01 - 05 &laquo;Биохимия&raquo; / сост. Н.М.Орел. – Минск: БГУ, 2007. 35 с. RU 2413952 С2, 10.03.2011. RU 2360256 С1, 27.06.2009

Адрес для переписки:

634050, г.Томск, пр. Ленина, 30, Национальный исследовательский Томский политехнический университет, отдел правовой охраны результатов интеллектуальной деятельности

(72) Автор(ы):

Канская Наталья Викторовна (RU),  
Иванов Владимир Владимирович (RU),  
Федорова Татьяна Сергеевна (RU),  
Федорова Нина Александровна (RU),  
Степовая Елена Алексеевна (RU),  
Серебров Владимир Юрьевич (RU),  
Акбашева Ольга Евгеньевна (RU),  
Романова Наталия Викторовна (RU),  
Позднякова Ирина Анатольевна (RU),  
Башкова Ирина Борисовна (RU),  
Канский Александр Викторович (RU),  
Твердохлебов Сергей Иванович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Национальный исследовательский Томский политехнический университет" (RU),  
Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Сибирский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (RU),  
Федеральное государственное бюджетное учреждение "Научно-исследовательский институт кардиологии" СО РАМН (RU)

## (54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине. Сущность способа определения липидов заключается в том, что к 10 мл хлороформного экстракта липидов добавляют 25 мкл 10% раствора тезита при одновременном перемешивании смеси с помощью шейкера при 20°C и частоте колебаний платформы 120 в минуту в течение 30 минут получают прозрачный раствор липидов для ферментативного определения триацилглицеридов. Способ позволяет повысить эффективность и точность определения липидов тканей. 1 табл.

Известны способы определения липидов в печени и других тканях крыс методом экстракции с последующей тонкослойной хроматографией (Практикум по биохимии. С.Е. Северин, Т.А. Соловьева, М., МГУ, 1989, 509 с.). Для частичной делипидизации липопротеинов крови используется в низких концентрациях (0,1%) неионный детергент Тритон X-100 (патенты RU 2413952 С1 от 10.03.2011 и RU 2428668 С1 от 10.09.2011 «Способ определения фракций модифицированных липопротеинов крови»; RU 2439580 С1 от 10.01.2012 «Способ определения фракций липопротеинов крови у больных ишемической болезнью сердца»; RU 2439575 С1 от 10.01.2012 и RU 2439581 С1 от 10.01.2012 «Способ оценки эффективности лечения ишемической болезни сердца»; RU 2439576 С1 от 10.01.2012 и RU 2439582 С1 от 10.01.2012 «Способ прогнозирования течения ишемической болезни сердца»)

Известен также способ выделения липидов по методу Фолча (Практикум по биохимии. С.Е. Северин, Т.А. Соловьева, М., МГУ, 1989, 509 с.). Данный способ является наиболее близким к предлагаемому по технической сущности и достигаемому результату и выбран в качестве прототипа.

Недостатком данного способа является невозможность его использования для анализа конечного результата, а именно определения ферментативным методом концентрации триглицеридов в печени крыс.

Целью предлагаемого изобретения является повышение эффективности и точности

способа.

Указанная цель достигается дополнительным добавлением к хлороформному экстракту липидов 25 мкл 10% раствора тезита при одновременном перемешивании смеси с помощью шейкера при 20°C и частоте колебаний 120 в минуту в течение 30 минут и получением прозрачного раствора липидов для ферментативного определения триглицеридов.

Новым в данном способе является получение прозрачного раствора липидов для ферментативного определения триглицеридов в печени крыс путем добавления к хлороформному экстракту липидов 25 мкл 10% раствора тезита при одновременном перемешивании смеси с помощью шейкера при 20°C и частоте колебаний 120 в минуту в течение 30 минут.

Следовательно, только комплексная модернизация способа прототипа позволяет получить желаемый результат.

Использование различных детергентов в эксперименте при изучении ишемической болезни сердца и развитии липидемии рекомендовано Всероссийским научным обществом кардиологов согласно положению рекомендаций Европейского общества по изучению атеросклероза «Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза» (г. Москва, 2005; Клиническая лабораторная диагностика, №10, 2008, с.21-32).

В настоящее время перспективными являются методы исследования липидов с неионными детергентами Тритон-Х100 и тезит для солюбилизации гидрофобных белков, липополисахаридов и других гидрофобных молекул. Наиболее часто используется Тритон-Х100. Его химическая формула  $C_{14}H_{220}(C_2H_{40})_n$ , где  $n=10$ . Это полиоксиэтилен-октил-фениловый эфир или полиэтиленгликоль  $n$  (1,1,3,3 тетраметил-бутил-фениловый эфир) с достаточно большой молекулярной массой. В настоящее время этот высокомолекулярный детергент заменяется на низкомолекулярный тезит с молекулярной формулой  $C_{30}H_{62}O_{10}$  молекулярной массой 582,81 г/моль. Применение 25 мкл 10% раствора тезита, добавленного к хлороформному липидному экстракту при одновременном перемешивании смеси при 20°C и частоте колебаний шейкера 120 в минуту в течение 30 минут позволяет получить прозрачный раствор липидов для ферментативного определения триглицеридов. Поэтому для повышения точности способа экспериментальным путем была выбрана концентрация тезита 10% в объеме 25 мкл, позволяющая получить абсолютно прозрачный раствор липидов для дальнейшего исследования (табл.1). Меньшая концентрация тезита не позволяла получить абсолютно прозрачный раствор, а большая концентрация тезита не являлась оптимальной для проведения дальнейших ферментативных исследований липидов (триглицеридов, холестерол и др.). Одновременное добавление раствора тезита к хлороформному экстракту липидов, перемешивание смеси при 20°C и частоте колебаний шейкера 120 в минуту в течение 30 минут позволяет повысить точность способа и получить желаемый результат.

Предлагаемый способ позволяет получить абсолютно прозрачный хлороформный экстракт липидов для дальнейшего ферментативного определения триглицеридов печени крыс.

Каждый вновь введенный в формулу изобретения признак выполняет функцию повышения точности и эффективности способа: добавление к хлороформному экстракту липидов 25 мкл 10% раствора тезита, одновременное перемешивание смеси при 20°C и частоте колебаний шейкера 120 в минуту в течение 30 минут для получения прозрачного раствора липидов и последующего ферментативного определения триглицеридов.

В химической промышленности используются различные детергенты (при изготовлении стирального порошка, моющих средств и т.д.), но при работе с биологическим материалом используется преимущественно тезит. Режим обработки пробы тезитом подбирался на основе экспериментальных исследований эмпирическим путем. Для этого использовали различные разведения тезита, различную температуру и различную экспозицию в минутах. При использовании различных концентраций раствора тезита малые концентрации (а именно 1%) не позволяли получить абсолютно прозрачный раствор, а высокие концентрации (а именно 20%) не позволяли выполнить дальнейшее ферментативное исследование триглицеридов печени крыс.

Результат проведенного исследования представлен в таблице 1: «Исследование влияния детергента тезит на получение прозрачного раствора липидов для ферментативного определения триглицеридов печени крыс». Следовательно, оптимальными условиями обработки пробы хлороформного раствора липидов раствором тезита является концентрация 10% в объеме 25 мкл, при температуре 20°C в течение 30 минут с обработкой ее в шейкере с частотой колебаний 120 в минуту.

Экстракция липидов из биологического материала осуществляется общепринятым методом.

Липиды - вещества, имеющие различное химическое строение, но обладающие

общим свойством: высокой растворимостью в неполярных растворителях. Имеют гидрофобный характер. Различают нейтральные липиды (свободные жирные кислоты и их эфиры, моно-, ди-, и триацилглицерины, стероиды, воски, углеводороды) и полярные липиды (глицерофосфолипиды, сфинго- и гликолипиды, цереброзиды).

При экстракции липидов принимают во внимание то, что они способны не только к гидрофобным взаимодействиям, но и к образованию водородных, электростатических и ковалентных связей (сложно-эфирных, амидных, гликозидных). Относительно неполярные растворители (хлороформ, бензол, диэтиловый эфир) разрушают комплексы, образованные гидрофобными взаимодействиями в жировой ткани, хиломикроны, комплексы альбумина с жирными кислотами. Полярные растворители (этанол, метанол) разрушают водородные и электростатические связи. Их применяют в смеси со слабополярными растворителями при экстракции липидов из плазматических мембран, митохондрий, эндоплазматического ретикулаума печени. Липиды, находящиеся в комплексах, образованных ковалентными связями, растворителями не экстрагируются. Их можно выделить только после гидролиза с использованием органического растворителя.

Наиболее распространенным методом экстракции липидов является метод Фолча. Экстракцию проводят смесью хлороформ-метанол (2:1) из расчета 20 частей экстрагирующей смеси на одну часть ткани. Метод позволяет выделить 90-95% всех клеточных липидов. Смеси растворителей, содержащие спирт, экстрагируют также нелипидные вещества (сахара, аминокислоты, соли и т.д.) Для удаления нелипидных примесей экстракт липидов промывают водой или слабыми солевыми растворами. Однако это приводит к частичной потере кислых липидов.

Липиды легко подвергаются окислению и гидролитической деградации. Чтобы затормозить эти процессы, экстракцию липидов проводят при комнатной температуре, применяя растворители, из которых предварительно удален кислород. Извлеченные липиды не упаривают досуха и не оставляют в упаренном виде на долгое время, а сразу растворяют. Экстракты липидов следует хранить в плотно закрытой посуде при  $-20^{\circ}\text{C}$  и ниже в присутствии инертных газов. Можно применять антиоксиданты, например 2,6-ди-трет-бутил-крезол, который в концентрации 0,005% эффективно предотвращает окислительное расщепление ненасыщенных липидов.

Некоторые растворители содержат или накапливают при хранении вещества, разрушающие липиды. Так, при хранении диэтилового и петролейного эфира накапливаются перекиси, окисляющие двойные связи. При хранении хлороформа и дихлорметана образуется фосген, реагирующий с окси- и аминогруппами. Небольшие количества альдегидов, содержащихся в первичных спиртах, также реагируют с окси- и аминогруппами и активированными метиленовыми группировками.

Чтобы удалить примеси, растворители подвергают специальной обработке. Свежий хлороформ перегоняют и хранят в темной склянке с добавлением 1% метанола или этанола. Хлороформ после длительного хранения промывают водой, сушат над гранулированным кальцием и перегоняют. Метанол и этанол (95 или 99%) перегоняют над гранулированной гидроокисью калия, хранят в темной склянке 1-2 мес.

Процедура экстракции липидов должна приводить к количественному извлечению клеточных липидов в неизменном виде. Липидный экстракт не должен быть загрязнен нелипидными веществами, такими как сахара и аминокислоты. Эффективность экстракции липидов в значительной степени зависит от химической природы липидных компонентов и от вида комплексов, которые образуют липиды в клетке с другими классами природных соединений. Известны три основных типа взаимодействия липидов с другими веществами.

I-й тип взаимодействия это:

ван-дер-ваальсово гидрофобное взаимодействие «нейтральных» или неполярных липидов, таких как эфиры стероидов, глицериды, углеводороды, каротиноиды, которое связывает относительно слабыми нековалентными связями их углеводородные цепи с другими липидами или с гидрофобными участками белков. Такое взаимодействие осуществляется, в частности, в жировой ткани, хиломикронах, комплексах альбумина с жирными кислотами, жировых образованиях микробных клеток и т.п.

II-й тип взаимодействия это:

образование водородных связей - электростатическое или гидрофобное взаимодействие, при котором полярные липиды (фосфатиды, гликолипиды, холестерин) образуют связи с белками, как это имеет место в плазматических мембранах, митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме и липопротеинах сыворотки.

III-й тип взаимодействия это:

образование комплексов, в которых жирные кислоты (нормальные или разветвленные) и оксикислоты связаны ковалентными связями (сложноэфирными, амидными или гликозидными) с полисахаридами, как это имеет место в липополисахаридах клеточных стенок бактерий.

Из комплексов, образованных в результате ван-дер-ваальсового гидрофобного

взаимодействия, липиды можно экстрагировать относительно неполярными растворителями, такими как этиловый эфир, хлороформ или бензол. Липиды, связанные в мембранах, экстрагируются полярными растворителями, такими как этанол или метанол, разрушающими водородные связи и нарушающими электростатическое взаимодействие белков с липидами. Ковалентно связанные липиды не экстрагируются никакими растворителями: их можно выделить лишь, расщепив комплекс с помощью кислотного или щелочного гидролиза.

При выборе метода экстракции необходимо принимать во внимание и химическую природу липидов. Обычно, чтобы предотвратить окисление двойных связей, непосредственно перед экстракцией растворители перегоняют и удаляют из них перекиси. Растворители, применяемые для извлечения высоконенасыщенных липидов, следует дезаэрировать, пропуская через них азот, и затем все операции проводить в атмосфере азота. Липидные экстракты не следует ни упаривать досуха, ни оставлять в упаренном виде на долгое время; извлеченные липиды надо как можно скорее растворять в подходящем растворителе (хлороформе). Температура, при которой проводится экстракция, должна быть не выше комнатной (или ниже, если это необходимо) для того, чтобы затормозить окисление и гидролитическое расщепление липидов. Старые способы экстракции кипящим растворителем в аппарате Сокслета должны быть исключены.

Другой фактор, который следует принимать во внимание, это ферментативная деградация липидов во время экстракции. Вообще, содержащие спирт смеси растворителей вызывают дезактивацию большинства фосфатаз и липаз. Более стабильные ферменты разрушаются при 1-2 минутном контакте с кипящей водой или горячим спиртом.

Из вышесказанного следует, что спирт является необходимым компонентом всех смесей, употребляемых для экстракции липидов, так как он разрушает комплексы липидов с белками, растворяет липиды и дезактивирует ферменты, вызывающие расщепление липидов. Однако смесь растворителей, содержащих спирт, наряду с липидами экстрагирует содержащиеся в клетках нелипидные вещества, такие как сахара, аминокислоты, соли и т.д. Поэтому неочищенный липидный экстракт нужно обработать так, чтобы удалить все водорастворимые примеси. Наиболее распространенной процедурой такого рода является промывка экстракта водой, приводящая в некоторых случаях к образованию очень стабильных эмульсий. Освобождают липиды от нелипидных примесей, также пропуская неочищенные экстракты через колонки, заполненные целлюлозой или сефадексом, или проводя диализ через специальные мембраны.

Одним из наиболее часто применяемых и эффективных способов экстракции липидов является экстракция по Блайю и Дайэру - упрощенный вариант «классической» методики Фолча. При экстракции по этому методу используют однофазную систему растворителей хлороформ-метанол-вода (1:2:0,9 по объему), которая быстро и эффективно извлекает липиды. Экстракт разбавляют одним объемом воды и одним объемом хлороформа. В результате образуется двухфазная система, нижний слой которой состоит из хлороформа, а верхний - из смеси метанола и воды. Водорастворимые нелипидные примеси переходят в водно-метанольный слой, в то время как в хлороформном слое остаются липиды, практически свободные от загрязнений.

Дальнейшее исследование липидов проводится с помощью тонкослойной хроматографии и других химических методов. Существуют стандартные ферментативные методы исследования концентрации липидов в прозрачных средах. Для получения такой среды в хлороформ добавляют поверхностно-активные вещества, неполярные детергенты, такие как тезит.

В настоящее время тезит широко используется не только в биохимии, но и в фармации, где он добавляется к лекарственным препаратам для лечения нейродермита, дерматоза, экземы (<http://medicalplanet.su/dermatology/142.html> Medicaplanet) Тезит используется в биохимических наборах для количественного определения содержания общего билирубина в сыворотке крови (БИЛИРУБИН ОБЩИЙ «ДДС»)

Однако в клинической лабораторной практике наиболее значимо использование тезита для изучения концентрации липидов в липидных экстрактах. Все сказанное свидетельствует о крайней важности разработки лабораторных исследований высокоточных и чувствительных методов количественного исследования липидов разных тканей. В то же время популярность способа количественной оценки липидов тканей в хлороформных экстрактах с добавлением детергента обусловлена его высокой чувствительностью, простотой осуществления и достаточной адекватностью получаемых результатов (Клиническая лабораторная диагностика, №10, 2008, С 21-32.).

Существенные признаки, характеризующие изобретение, проявили в заявляемой совокупности новые свойства, явным образом не вытекающие из уровня техники в

данной области, и не являются очевидными для специалиста.

Идентичной совокупности признаков не обнаружено при изучении патентной и научно-медицинской литературы.

Данное изобретение может быть использовано в медицинской практике для повышения точности изучения липидов тканей при ишемической болезни сердца и других заболеваниях. Таким образом, следует считать предлагаемое изобретение соответствующим условиям патентоспособности: «новизна», «изобретательский уровень», «промышленная применимость».

Метод основан на экстракции липидов тканей смесью Фолча (Российский химико-аналитический портал, Folch, J.A simple method for the isdation and purification of total animal tissue/Folch, M Jees, Sloane Stanley g.H. // The Journal boil. Chemistry. - 1957. - №1. - p.497-509.)

Способ прототип осуществляется следующим образом.

К 6 г печени крысы добавляют 3 мл воды и измельчают в гомогенизаторе Поттера-Эльвехейма (Potter-Elvehjem). Гомогенизат центрифугируют, супернатант декантируют и остаток реэстрагируют 38 мл смеси: хлороформ-метанол-вода (1:2:0,9 по объему) в гомогенизаторе в течение 2х минут. Ткань отделяют центрифугированием. Объединенный супернатант разбавляют 20 мл хлороформа и 20 мл воды. Водно-метанольную и хлороформную фазу разделяют центрифугированием. Нижний хлороформный слой концентрируют на роторном испарителе при 35°C. Для удаления воды добавляют бензол и упаривают его в вакууме. К упаренному остатку липидов добавляют 10 мл хлороформа с 25 мкл 20% раствора тезита при одновременном перемешивании смеси с помощью шейкера ПЭ - 6300М при 20°C и частоте колебания платформы 120 в минуту в течение 30 минут с последующим определением триглицеридов ферментативным методом набором «триглицерол-ново» (жидкая форма) кат № В8322 фирмы «вектор» БЭСТ (г. Новосибирск) при длине волны 500 нм спектрофотометрически при 25°C. Опытная и калибровочная проба составляют 10 мкг. Концентрацию триацилглицеридов рассчитывают по формуле  $C = E/E_k \times 2,29$ , где 2,29 концентрация триглицеридов в калибраторе, ммоль/л) делают перерасчет на 1,00 г сырого веса печени.

Исследование триглицеридов по способу-прототипу и предлагаемому способу выполнялось 20 раз. Результаты исследования обработаны статистически с использованием пакета программ StatSoft Statistica v6.0 с определением среднеарифметического (M) и его ошибки (m).

При проведении исследований по способу-прототипу уровень триглицеридов составил  $5,8 \pm 0,6$  мг на 1,0 г массы печени, а при исследовании по предлагаемому способу уровень триглицеридов составил  $8,4 \pm 0,7$  мг/1,0 г массы печени, что соответствует значениям нормы по данным литературы и современным результатам (г Томск, 20-22 апреля, 2009 г.)

Итак, при применении способа-прототипа был получен недостаточно точный результат, что связано с недостаточной прозрачностью исследуемого раствора, а наиболее эффективным и точным был предлагаемый способ.

При этом предлагаемый способ прост в исполнении и интерпретации полученных результатов.

| Исследование влияния детергента тезит на получение прозрачного раствора липидов для ферментативного исследования триглицеридов печени крыс |              |                 |                 |                    |
|--|--------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| Детергент  | Концентрация | Время инкубации | Температура, °С | Результат          |
| Тезит  | 25 мкл 1%    | 20 мин          | 15              | -                  |
| Тезит  | 25 мкл 1%    | 30 мин          | 20              | -                  |
| Тезит  | 25 мкл 1%    | 40 мин          | 25              | -                  |
| Тезит  | 25 мкл 10%   | 20 мин          | 15              | -                  |
| Тезит  | 25 мкл 10%   | 30 мин          | 20              | Раствор прозрачный |
| Тезит  | 25 мкл 10%   | 40 мин          | 25              | -                  |
| Тезит  | 25 мкл 20%   | 20 мин          | 15              | -                  |
| Тезит  | 25 мкл 20%   | 30 мин          | 20              | -                  |
| Тезит  | 25 мкл 20%   | 40 мин          | 25              | -                  |

#### Формула изобретения

Способ определения липидов в печени крыс путем хлороформной экстракции липидов печени по Фолчу, отличающийся тем, что дополнительно добавляют 25 мкл 10% раствора тезита при одновременном перемешивании смеси с помощью шейкера при 20° и частоте колебаний 120 в минуту в течение 30 минут и получают прозрачный раствор липидов для ферментативного определения триглицеридов.

**ММ4А Досрочное прекращение действия патента из-за неуплаты в установленный срок пошлины за поддержание патента в силе**

Дата прекращения действия патента: 07.11.2014

Дата публикации: [20.08.2015](#)