



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz

(19) DD (11) 220 201 A3

4(51) G 01 N 1/28

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21) WP G 01 N / 233 100 3

(22) 18.06.76

(45) 20.03.85

(71) VEB Berlin-Chemie, 1199 Berlin, Glienicker Weg 125-127, DD

(72) Ziegler, Manfred, Dr.; Krabiell, Ulrich; Georgi, Monika, DD

(54) Verfahren zur Vorbereitung lösungsmittelhaltiger Extrakte zur analytischen Bestimmung

(57) Die Erfindung betrifft die Vorbereitung von organische Lösungsmittel enthaltenden Lösungen, die Peptid- und/oder Eiweißstoffe enthalten, zur anschließenden analytischen Untersuchung im wäßrigen Medium. Ziel ist ein schonendes und wenig aufwendiges Vorbereitungsverfahren. Durch Behandlung der angegebenen Lösungen mit Lösungsmitteln, die mit Wasser nicht oder nur wenig mischbar sind, gelingt es, zu zweiphasigen Systemen zu kommen, von denen die wäßrige Phase die gewünschten Substanzen, gegebenenfalls in angereicherter und vorgereinigter Form enthält, so daß sie mit speziellen Analysenmethoden bestimmt werden können. Die Erfindung kann in der biochemischen und klinischen Analytik sowie bei pharmazeutischen Zubereitungen angewendet werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur einfachen, schonenden und effektiven Vorbereitung von organischen Lösungsmittel-extrakten bei gleichzeitiger Konzentrierung und Abtrennung störender Substanzen zur analytischen Bestimmung von Peptid- und Eiweißstoffen im wäßrigen Medium.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die zur analytischen Bestimmung von Peptid- und Eiweißstoffen, wie von Hormonen, Releasing-Hormonen und Enzymen in der klinischen Chemie und pharmazeutischen Industrie angewendeten Methoden beruhen häufig auf der Durchführung entsprechender Bestimmungsmethoden z. B. wie Immunassays, Enzymassays und optischen Konzentrationsbestimmungen in wäßrigen Lösungen. Bedingt durch die unterschiedlichen Eigenschaften der Ausgangsmaterialien sowie durch in diesen vorhandene Substanzen, die die eigentliche Analyse verfälschen können, werden zur Extraktion des Ausgangsmaterials oft mit Vorteil organische Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische herangezogen, die einen bedeutenden Gewinn an Selektivität für die Analyse der analytisch zu bestimmenden Substanz bedeuten.

So wird z. B. bei der Analyse des Insulingehaltes von Pankreasgewebe durch die Extraktion mit Lösungsmittelgemischen der zerstörende Einfluß von proteolytischen Enzymen weitgehend vermieden. Nachteilig bei einer solchen Verfahrensweise ist die gleichzeitige Extraktion von Fett und fettähnlichen Substanzen, die nur mit umständlichen Methoden, wie z. B. schonendem Einengen im Vakuum oder mehrstufiger Gegenstromverteilung

(RANDALL, BBA 90 (1964) 472-476) vor der eigentlichen Analyse, diese z. B. durch chromatographische Methoden, entfernt werden können. Darüber hinaus besteht bei den Einengungsverfahren immer die Gefahr der Denaturierung oder einer Adsorption der zu bestimmenden Substanzen an Gefäßwänden oder an ausfallenden Verunreinigungen, z. B. an Lipiden.

Diese Gefahren sind besonders dann groß und verbieten u. U. eine analytische Bestimmung vollständig, wenn bei begrenzten Mengen an Ausgangsmaterial an der Nachweisgrenze der Bestimmungsmethoden liegende Substanzmengen zu bestimmen sind.

Für immunchemische Methoden wird bei bekannten Lösungsvorschlägen davon ausgegangen, daß bei der oft möglichen hohen Verdünnung der Extrakte im eigentlichen Bestimmungsansatz nur geringe Mengen an Lösungsmitteln und anderen Verunreinigungen vorliegen. Diese geringen Mengen verursachen bei der hohen Spezifität der Methoden keine oder vernachlässigbar kleine Fehler in der Bestimmung der interessierenden Substanz. Das setzt sowohl hohe Titer der verwendeten Antiseren als auch hinreichend hohe Konzentrationen der zu bestimmenden Substanzen voraus, die nur selten gegeben sind. Außerdem ist genaue Kenntnis der Adsorptionseffekte während der Verdünnungsschritte notwendig. Deshalb führt solch ein Vorgehen insbesondere bei Bestimmung von Extrakten mit hohem Gehalt an zu bestimmender Substanz oft zu um Größenordnungen falschen Werten. Für solche Fälle kann man als Alternative Seren mit geringerem Titer einsetzen. Dabei wird zwar der Verdünnungsfehler vermieden, dafür sind jetzt die Einflüsse von Lösungsmitteln und Nebenkomponten nicht mehr vernachlässigbar. Andererseits sind oft die Mengen oder Konzentrationen an zu bestimmender Substanz im Extrakt so niedrig, daß auch mit empfindlichen Methoden bei Verdünnung keine Bestimmung mehr möglich ist, ohne Verdünnung jedoch die vorhandenen Lösungsmittel den eigentlichen Test unmöglich machen.

Das ist z. B. bei der Untersuchung von Biopsiematerial der Fall. Ähnliche Probleme entstehen, wenn mit möglichst geringem Z_usatz an markiertem Material technische Prozesse durch Isotopenverdünnungsmethoden zu untersuchen sind. Solch eine

Verfahrensweise ergibt sich beim Einsatz von radioaktivem Material dadurch, daß die Strahlenbelastung minimal zu halten ist, und außerdem aus ökonomischen Gründen. Letzteres gilt auch für den Einsatz von nichtradioaktiv markiertem Material, z. B. bei Einsatz von stabil-isotop-markierten oder fluoreszenz-markierten Substanzen.

Soll der Gehalt an Enzymen untersucht werden, z. B. durch optische Verfolgung des Abbaus eines geeigneten Substrates, so stören oft Lösungsmittel die Nachweisreaktion.

Hier kann man sich gleichfalls durch Verdünnung behelfen, ist aber in ähnlichem Maße wie bei immunchemischen Verfahren von den Konzentrationsgrenzen abhängig, so daß eine Abtrennung der Lösungsmittel oft unumgänglich ist.

Allgemein brauchbare Lösungen zur Abtrennung des Lösungsmittels auf destillativem Wege in irgendeiner Form sind für die Durchführung von Serienanalysen kaum durchführbar. Sie bedürfen außerdem einer weiteren Bearbeitung der flüssigen oder festen Rückstände zur Entfernung störender unlöslicher Verunreinigungen. Aus ähnlichen Gründen sind Methoden, die auf der Dialyse beruhen, wenig befriedigend.

Aufgezeigte Lösungswege durch Extraktion sind auf spezielle kompliziert zusammengesetzte Lösungsmittelgemische für Einzelfälle (DE PS 1 174.451) beschränkt, ohne daß sich Hinweise auf eine allgemeine Anwendbarkeit finden.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung ist ein Verfahren zur Vorbereitung lösungsmittelhaltiger Extrakte zur Analyse auf ihren Gehalt an Peptiden, Eiweißen, Proteohormonen, Releasing-Hormonen und Enzymen unter Vermeidung komplizierter Aufarbeitungsoperationen und Geräte bei weitgehender Schonung vor zerstörenden Einflüssen sowie bei gleichzeitiger Reinigung durch Abtrennung störender Begleitsubstanzen, wie z. B. Lipiden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die aufgezeigten Nachteile des Standes der Technik werden erfindungsgemäß in besonders vorteilhafter Weise behoben durch Anwendung eines neuen Verfahrens zur Überführung der zu bestimmenden Substanzen in eine wäßrige Phase.

Dieses Verfahren besteht darin, daß der wäßrige, lösungsmittelhaltige Extrakt so mit einem Lösungsmittel, das mit dem zur Extraktion verwendeten Lösungsmittel vollständig, mit Wasser dagegen nicht oder nur wenig mischbar ist, versetzt wird, daß sich zwei Phasen bilden, von denen die wäßrige Phase das zu bestimmende Peptid, Proteohormon, Releasing-Hormon oder Enzym enthält. Als zusätzlicher angestrebter Effekt tritt dabei eine in weiten Grenzen durch die Wahl des Verhältnisses Extrakt/zugesetztes Lösungsmittel variierbare Konzentrierung der zu bestimmenden Substanzen auf.

Die störenden Verunreinigungen aus dem Extrakt werden dabei gleichzeitig in der organischen Phase angereichert und mit dieser abgetrennt.

Als Lösungsmittel werden flüssige Kohlenwasserstoffe, aliphatische Ester oder Ether, vorzugsweise Essigsäureethylester bzw. Diethylether, sowie halogenierte Kohlenwasserstoffe wie Dichlormethan, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Ethylenchlorid oder Trichlorethan eingesetzt.

Ausführungsbeispiele

1. 2,5 ml ethanolischer Extrakt von Blutplasma werden mit 8 ml Diethylether versetzt und gut durchgeschüttelt. Nach dem Absitzen gewinnt man 0,6 ml wäßrige Phase zur Bestimmung der Hormone Insulin und Glukagon und C-Peptid mit Hilfe radioimmunologischer Methoden.
2. Zur Prozeßkontrolle eines technischen Reinigungsprozesses wurde Pankreas mit einem Propanol-Wasser-Gemisch in Gegenwart von Säure extrahiert und nach Reinigung durch Filtration die Konzentration der Lösung an Insulin, Glukagon, C-Peptid und proteolytischen Enzymen bestimmt.
Dazu wurden dem 66 % Propanol enthaltenden Extrakt die 3,3fache Volumenmenge Essigsäureethylester zugesetzt, gut durchgeschüttelt und anschließend die Phasen getrennt.
Aus 100 ml Extrakt wurden 10 ml Lösung für die analytische Bestimmung gewonnen, die nach RIA-Bestimmung 0,75 mg Insulin, 0,03 mg Glukagon und 0,2 mg C-Peptid je ml enthielten. Die Bestimmung der proteolytischen Enzyme ergab einen Gehalt von 10 FIP-Einheiten/ml. Ein weiterer Teil des Extraktes wurde über eine Adsorptionssäule gegeben und anschließend eine Probe durch Zusatz von Essigsäureethylester aufgearbeitet. Die Analyse nach der gleichen Methode ergab einen Gehalt von 13 µg Insulin und 0,08 µg Glukagon sowie 0,13 mg C-Peptid je ml.
3. 600 mg Hirngewebe (Trockenmasse) werden mit einem Gemisch aus 2,5 ml 84%igem Ethanol und 0,4 ml 1,0 molarer Phosphorsäure durch Ultraschallbehandlung 3 x 30 s homogenisiert, mit 0,5 ml N Natronlauge vermischt und 30 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgetrennt und der Rückstand mit 1 ml 84%igem Ethanol geschüttelt und zentrifugiert. Die verunreinigten Überstände werden mit 12 ml Diethylether versetzt und bei -30 °C eingefroren. Die Oberphase wird abgegossen, die gefrorene Unterphase lyophilisiert.
Zur Bestimmung der interessierenden biologisch aktiven Polypeptide und Proteine wird das Lyophilisat im geeigneten Puffer gelöst und unter Anwendung eines entsprechenden

Immunassays quantitativ bestimmt.

Es lassen sich auf diese Weise Insulin, C-Peptid, Glukagon, Substanz P, Gastrin, Somatostatin und andere Substanzen bestimmen. Die gefundenen Konzentrationen im Attomol- bis Femtomol-Bereich je mg Trockengewebe belegen die Leistungsfähigkeit der Methode.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Vorbereitung lösungsmittelhaltiger Extrakte zur analytischen Bestimmung von Peptiden und Eiweißen, gekennzeichnet dadurch, daß durch Zugabe eines nicht oder nur wenig mit Wasser, jedoch vollständig mit dem im Extrakt bereits enthaltenen Lösungsmittel mischbaren Lösungsmittels eine wäßrige Phase, die die zu bestimmenden Substanzen enthält, gebildet wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß störende Verunreinigungen bei dem Übergang in die wäßrige Phase abgetrennt werden.
3. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß durch Wahl des Verhältnisses Extrakt/zugesetztes Lösungsmittel die Konzentration der zu bestimmenden Substanz in der wässrigen Phase variiert werden kann.
4. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß als zuzugebende Lösungsmittel flüssige Kohlenwasserstoffe, aliphatische Ester oder Ether sowie halogenierte Kohlenwasserstoffe eingesetzt werden.
5. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß als zuzugebende Lösungsmittel vorzugsweise Essigsäureethylester, Diethylether, Dichlormethan, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Ethylenchlorid und Trichlorethan eingesetzt werden.