



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

216 295

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
B 01 D 11/00

(22) Prihlášené 02 02 81

(21) (PV 726-81)

(40) Zverejnené 15 09 81

(45) Vydané 15 05 84

(75)
Autor vynálezu

ZEMEK JURAJ ing. CSc., LEHNICE, KUNIAK EUDOVÍT ing. CSc.,
STRAKOVÁ ANNA RNDr., VOLMUT JURAJ ing., BRATISLAVA

(54) Spôsob vysokoúčinnnej izolácie lipofilných látok z biologických materiálov

Vynález sa týka spôsobu vysokoúčinnnej izolácie lipofilných látok z biologických roztokov, ako z krvi, moču a pod., pomocou extrakcie v kolóne za využitia polysacharidovej náplne.

Izolácia lipofilných látok z biologických roztokov je dôležitým stupňom tak z hľadiska analytického ako aj preparatívneho. Klasický spôsob izolácie lipofilných látok spočíva v niekoľkonásobnej extrakcii vytrepávaním biologických roztokov do organických rozpúšťadiel v deliacom lieviku. Uvedený spôsob je však náročný na čas, spotrebu biologického materiálu, ako aj extrakčných roztokov, pričom poskytuje nízky výťažok extrahovaných látok a nízku čistotu eluátu.

Výhodnejším postupom sa javí postup kvapalino-kvapalínovej extrakcie za využitia

náplní ako zrnité živočíšne uhlie, živica KAD-2, alebo zrnitá kremelina, využívaná v kolónach na báze silikagélu alebo kremeliny (NSR pat. 2 410 033, Breiter J.: J. Clin. Chem. Biochem. 14, 46, 1976, Breiter J., Helger R., Z. Klin. Chem. Biochem. 13, 254, 1975, Breiter J., Helger R., Lang H.: Forensic Science 7, 131, 1976.). Uvedená úprava rieši však len otázku časovej náročnosti klasickej extrakcie, nakoľko umožňuje spracovanie desiatok vzoriek v sérii súčasne jedným pracovníkom. Vážnym nedostatkom uvádzaných elučných metód je, že neumožňujú vzhľadom k neinertnému charakteru povrchu použitých nosičov kvantitatívny priebeh extrakcie. Používané nosiče sú znečistené predovšetkým ťažkými kovmi (železo, nikel a pod.), ktoré spôsobujú katalytický rozklad niektorých te-

rapeutík, predovšetkým psychofarmák (Diagnostica Merck: Extrelut^R — Neues Verfahren zum Extraktion lipophiler Stoffe, 1979).

Uvedené nedostatky rieši postup podľa vynálezu, ktorý zaručuje kvantitatívny priebeh extrakcie a dobrú stabilitu extrahovaných terapeutík.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že ako pevná fáza do elučnej kolóny sa použije modifikovaná mikrokryštalická celulóza s veľkosťou častíc 0,1 až 0,5 mm, sypanou hmotnosťou 0,2 až 0,25 g/ml a napúšťacím objemom vo vode 4,0 až 5,0 ml/g, pričom množstvo vodnej fázy extrahovanej biologickej tekutiny upravenej na optimálne pH pre extrahovanú látku zakotvenej na celulózovom nosiči nepresahuje 1 až 1,2 násobok hmotnosti suchej celulózovej náplne kolóny, pričom obsah ťažkých kovov v celulózovom nosiči nepresahuje 5 ppm a obsah extrahovateľných natívnych látok nepresahuje 10 ppm.

Výhodou navrhovaného postupu je, že umožňuje izolovať lipofilné látky pre preparatívne ako aj analytické účely, pričom sa dosahuje úspora času pre jednu analýzu až 50 %, pre dve analýzy až 65 % a pre 10 analýz v sérii až 75 %. Spotreba chemikálií oproti klasickej extrakcii a postupom využívajúcim kremelinovú náplň je až 50 %. Výhodou je tiež podstatne vyššia výťažnosť extrahovaných látok a to tak v porovnaní s klasickou extrakciou, ako aj voči doteraz známym postupom extrakcie v kolóne na báze silikagélu a kremeliny a to o 20 až 30 % v prípade extrakcie kyslých látok, o 40 až 50 % v prípade bázičných látok. Vyššia čistota náplne v kolóne umožňuje extrahovať bezo zvyšku všetky typy farmák, ako aj prechovávať biologické roztoky na náplni bez obáv z katalytického rozkladu lipofilných látok. Vyššia čistota eluátu umožňuje využitie fyzikálno-chemických metód, ako plynovej chromatografie, kvapalinovej chromatografie za zvýšeného tlaku a spektrálnych metód k analýze lipofilných látok. Dosiahne sa i úspora biologického materiálu, k jednej extrakcii postačuje 1/5 množstva krvi resp. ďalšieho biologického roztoku, potrebné ku klasickej extrakcii a 1/2 množstva potrebného k extrakcii na kremelinových kolónach. Ďalšia výhoda spočíva v možnosti postupnej reakcie kyslých a potom bázičných látok a naopak z tej istej vzorky biologického materiálu.

Úplne postačujúce množstvo krvi pre extrakciu je 2 ml, ktorá sa zriedi 8 ml vody. Zriedený roztok krvi sa naleje na kolónu (priemer 25 až 30 mm) s náplňou modifikovanej celulózy (10 až 12 g) s veľkosťou častíc 0,1 až 0,5 mm a nechá sa 15 minút nasakovať do celulózového gélu. Potom sa na kolónu naleje potrebné extrakčné organické rozpúšťadlo (chloroform, éter, a i) a chytá sa eluát v množstve 40 až 60 ml, kedy je extrahovaná látka kvantitatívne z kolóny izolovaná. Rýchlosť elúcie sa môže ak je potrebné spomaliť nasadením injekčnej ihly na výtok

kolóny resp. zmenou výšky hydrostatického tlaku. Optimálna rýchlosť elúcie je taká, pri ktorej objem vytečeného eluátu 40 až 60 ml sa dosiahne za 20 až 30 minút. Zvyšovaním rýchlosti nad uvedené optimum stúpa objem eluátu pre dosiahnutie kvantitatívnej extrakcie.

Ak sa extrakcia prevádza z moču, tak sa neriedi a nanáša sa na kolónu v množstve 10 ml.

K spracovaniu eluátu, prípadne k vyhodnoteniu koncentrácie jednotlivých látok možno využiť spektrometrické, enzýmové chromatografické a iné metódy a to aj také, ktoré sú náročné na stupeň prečistenia analyzovanej vzorky (plynová chromatografia, kvapalinová chromatografia a pod.).

Príklad 1

Extrakčná kolóna o vnútornom priemere 25 mm a výške 14 cm sa naplní mikrokryštalickou celulózou (12 g) o zrnitosti 0,1 až 0,4 mm a dotlačí sa piestom s vložkou zo sklenenej vaty. Na kolónu sa potom naniesie vzorka krvi, pripravená tak, že 2 ml krvi, obsahujúcej 0,1 mg fenobarbitalu sa zriedi 8 ml vody okyslenej 0,5 ml 1 N HCl. Vodná fáza sa nechá vsiaknuť do polysacharidového materiálu (15 minút) a ekstrakčná kolóna sa zaleje nato 60 ml dietyléteru. Extrakcia fenobarbitalu prebehne v priebehu ďalších 20 minútach. Extrakt sa zahutí a použije k stanoveniu koncentrácie fenobarbitalu. Výťažok fenobarbitalu (stanovenie prevedené plynovou chromatografiou) je 0,098 mg, t. j. 98 %.

Príklad 2

Tak ako je uvedené v príklade 1, s tým rozdielom, že na ekstrakčnú kolónu sa aplikuje 10 ml moču, upraveného na pH 2 s 1 N HCl, ktorý obsahuje 0,1 mg fenobarbitalu. Výťažok fenobarbitalu pri extrakcii je 0,099 mg, t. j. 99 %.

Príklad 3

Tak ako je uvedené v príklade 1, s tým rozdielom, že na náplň ekstrakčnej kolóny sa aplikuje 10 ml zriedenej krvi, tak ako je uvedené v príklade 1, obsahujúcej 0,1 mg fenobarbitalu a 0,1 mg kodeínu. Po prevedení kyslej extrakcie, tak ako je uvedené v príklade 1 sa stacionárna fáza na náplni adjustuje prefúknutím plyného čpavku na pH 10 (čpavok sa nechá prefukovať cez ekstrakčnú kolónu zhora dole, až kým fenoltaleinový indikátor pri dolnom výstupe z kolóny signalizuje pH 9 až 10). Potom sa prevedie extrakcia bázičky zložky pomocou 60 ml zmesi dichlórmetánu a izopropanolu (85 : 15 objemových %). Výťažok fenobarbitalu bol 0,098 mg t. j. 98 % a výťažok kodeínu bol 0,099 mg t. j. 99 % (stanovenie prevedené spektrofotometricky).

Príklad 4

Tak ako je uvedené v príklade 1, s tým rozdielom, že na náplň extrakčnej kolóny sa aplikuje 10 ml zriedenej krvi (2 ml krvi a 8 ml vody obsahujúcej 0,5 ml 1 N NaCl, obsahujúcej ďalej 0,02 mg fenobarbitalu, 0,02 mg tiobarbitalu, 0,02 mg allobarbitalu a 0,02 mg morfinu, 0,02 mg kodeínu a 0,02 mg amitryptilínu). Po prevedení postupne kyslej a potom bázičkej extrakcie, tak ako je uvedené v príklade 3 a chromatografickej analýze eluátov sa získalo 0,02 mg fenobarbitalu, 0,019 mg tiobarbitalu, 0,02 mg allobarbitalu, 0,19 mg morfinu, 0,02 mg kodeínu a 0,02 mg amitryptilínu, čo zodpovedá výťažku jednotlivých zložiek 95 až 100 %.

Príklad 5

10 ml zriedeného roztoku krvi (2 ml krvi, 8 ml 0,05 M pufru, obsahujúceho čpavok a chlorid amonný o pH 9 a 0,02 mg kodeínu a 0,02 mg morfinu) sa nanieslo na celulóзовú náplň extrakčnej kolóny a po vytvorení stacionárnej fázy (15 min.) sa kolóna zaliala

60 ml zmesi dietyléter – izopropanol (85 : 15 objemových %). Výťažok kodeínu v eluáte bol 0,019 mg a výťažok morfinu 0,02 mg, t. j. 95 až 100 %.

Príklad 6

0,5 ml zriedeného roztoku krvi (0,1 ml krvi a 0,4 ml vody) obsahujúcej 0,005 mg cholesterolu sa nanieslo na 0,6 g náplne pripravenej zo zemiakového škrobu.

Po 10 minútach sa vytvorila stacionárna vodná fáza a extrakcia sa previedla 4 ml chloroformu. Výťažok cholesterolu bol 0,005 mg, t. j. 100 %.

Postup podľa vynálezu je vhodný k izolácii lipofilných látok z hľadiska preparatívneho a analytického a to predovšetkým pre:

farmakobiochemické účely, sledovanie hladín a metabolitov liečiv,

pre sledovanie hladiny cholesterolu, steroidných hormónov a ďalších látok, dôležitých z hľadiska prevencie srdcovo cievnych ochorení, ochrana matky a dieťaťa a pod., a pre toxikologické účely.

PREDMET VYNÁLEZU

1. Spôsob vysokoúčinnnej izolácie lipofilných látok z biologických materiálov na princípe kvapalino-kvapalinovej extrakcie zo zakotvenej fázy biologickej tekutiny na pevnom nosiči vyznačený tým, že ako pevná fáza do elučnej kolóny sa použije modifikovaný polysacharid s výhodou celulóza alebo škrob s veľkosťou častíc 0,1 až 0,5 mm, sytnou hmotnosťou 0,2 až 0,25 g/ml a napúšťacím objemom vo vode 4,0 až 5,0 ml/g, pričom množstvo vodnej fázy extrahovanej biolo-

gickej tekutiny upravenej na optimálne pH pre extrahovanú látku zakotvené na polysacharidový nosič nepresahuje 1 až 1,2 násobok hmotnosti suchej celulózovej náplne kolóny.

2. Spôsob podľa bodu 1 vyznačený tým, že modifikovaný polysacharid neobsahuje viac ťažkých kovov ako 5 ppm a množstvo natívných extraktívnych látok viac ako 10 ppm.