(11) Číslo dokumentu :

ČESKÁ A SLOVENSKÁ FEDERATIVNÍ REPUBLIKA
(19)

PATENTOVÝ SPIS 276 311

(21) Číslo přihlášky : 5494-89.V
(22) Přihlášeno : 27 09 89
(30) Prioritní data :

(40) Zveřejněno : 15 01 92
(47) Uděleno : 20 03 92
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 13 05 93

(13) Druh dokumentu : B6
(51) Int. Cl.[5] :
C 12 Q 1/62

FEDERÁLNÍ ÚŘAD PRO VYNÁLEZY

(73) Majitel patentu : LACHEMA, s. p., BRNO

(72) Původce vynálezu : VALÍČKOVÁ MARTA prof. farm.,
CHROMÝ VRATISLAV ing., CSc., BRNO

(54) Název vynálezu : Dvousložkové činidlo pro enzymové stanovení kyseliny močové

(57) Anotace :

Dvousložkové činidlo sestává z vodného roztoku fosforečnanového pufru pH 6,7 až 8,0 o koncentraci 50 až 300 mmol/l, obsahujícího 0,5 až 10 mmol/l 4-chlor-3-methylfenolu a z pevné enzymové směsi, obsahující na 10 kU urikasy 30 až 100 kU peroxidasy, 0,1 až 1,0 mol alkalické soli kyseliny hydrogenfosforečné, 6 až 66 milimolů alkalické soli kyseliny dihydrogenfosforečné, 30 až 90 milimolů 4-aminoantipyrinu, 0,3 až 1,5 milimolů hexakyanoželeznatanu alkalického kovu, 0,02 až 0,2 milimolů poly-1,6-anhydroglukosy o molekulové hmotnosti 40 000 až 120 000 g/mol a 0,1 až 1,2 molu síranu alkalického kovu. Kompletní pracovní roztok se připraví rozpuštěním pevné enzymové směsi v roztoku pufru. Dvousložkové činidlo je stálé při teplotě +5 °C nejméně jeden rok, kompletní pracovní roztok nejméně 48 hodin.

Kyselina močová je hlavním purinem obsaženým v plazmě člověka a představuje konečný produkt metabolizmu purinů. Za normální se považují u mužů hodnoty kyseliny močové do 420 μmol/l a u žen do 390 μmol/l. Nad tyto hodnoty se jedná o hyperurikemii. Proto je stanovení kyseliny močové důležitým diagnostickým prostředkem a analýza kyseliny močové v séru nebo v plazmě nebo v moči patří do běžné palety laboratorních diagnostických vyšetření.

Metody stanovení kyseliny močové jsou v podstatě založeny na její chemické nebo enzymem urikasou katalyzované oxidaci na allantoin a peroxid vodíku. V prvém případě se využívá redukčních vlastností kyseliny močové a jako oxidovadla jsou využívány takové látky a systémy, jejichž redukované barevné formy mohou být přímo fotometricky měřeny. Tyto metody jsou ale málo specifické a analýzu ruší redukující látky běžně přítomné v séru, jako jsou kyseliny askorbová, gentisová, glukosa, glutathion, cystein a další. Ve druhém případě katalyzuje oxidaci kyseliny močové enzym urikasa, který působí zcela specificky, a lze měřit buď úbytek kyseliny močové v ultrafialové oblasti spektra, nebo se využívá další reakční produkt enzymoyé oxidace, peroxidu vodíku, ke stanovení pomocí oxidační kopulace s využitím dalších reakčních systémů. Konečným měřeným produktem je chinoniminové barvivo. Druhá varianta, využívající spřažené enzymové reakce s enzymy urikasou a peroxidanou a oxidační kopulaci 4-aminoantipyrinu a vhodným derivátem fenolu, nachází zejména v posledních létech široké použití, protože přes některé nevýhody, se jedná o postup, který lze snadno automatizovat, a který je při provedení rychlý a jednoduchý.

Při enzymovém stanovení kyseliny močové s enzymy urikasou a peroxidasou na principu oxidační kopulace se pro vlastní analýzu připravuje kompletní pracovní roztok, obsahující všechny potřebné chemikálie. Kromě obou enzymů a pufru jsou to zejména chromogen 4-aminoantipyrin, vhodný citlivý derivát fenolu, látky stabilizující uvedené reaktanty a látky potlačující vliv interferujících konstituentů séra. Stálost kompletního pracovního roztoku je omezená, je proto připravován na místě, před vlastní analýzou a diagnostický přípravek je obvykle koncipován tak, že sestává ze dvou nebo více složek.

Pro stanovení kyseliny močové je, na rozdíl od jiných sérových konstituentů jako jsou například glukosa, cholesterol, triacylglyceroly, nutné hledat pro oxidační kopulaci takové deriváty fenolu, které poskytují chinoniminová barviva s vysokým absorpčním molárním koeficientem. Kyselina močová, na rozdíl od výše uvedených substrátů, se nachází v séru a v plazmě v relativně nízké koncentraci. Pro tyto účely vyhovují dobře zejména dosud popsané fenolové deriváty: 3,4-dichlorfenol, 2,4-dichlorfenol, 4-hydroxybenzoan sodný a kyselina 3,5-dichlor-2-hydroxybenzensulfonová. Kromě vysoké citlivosti lze vhodným výběrem fenolové kopulenty dosáhnout i potlačení některých sérových složek, které při tomto stanovení ruší.

Zatím co prvá enzymová frekvence s urikasou je pro kyselinu močovou reakce zcela specifická, je druhá reakční sekvence s peroxidasou a peroxidem vodíku reakce nespecifická, a podobně jako u reduktometrických metod interferují jak redukující, tak i oxidující látky endogenně přítomné v bílkovinné matrici. Jsou to hlavně bilirubin, kyselina askorbová a další redukující látky, které způsobují hlavně negativní interference. K potlačení interference bilirubinu je doporučován například hexakyanoželeznatan draselný v koncentraci asi 30 až 60 μmol/l reakční směsi, který má potlačit vliv bilirubinu až do jeho koncentrací 170 μmol/l séra (D.L.Witte a kol: Clin.Chem. 24, 1778, 1978). Mechanizmus jeho účinku je vysvětlován oxidací ferrokyanidu na ferrikyanid. Jiní autoři (S.Klose, M.Stoltz: Clin.Chem. 24, 250, 1978) použití ferrokyanidu zcela odmítají pro zvýšenou autooxidaci celého chromogenního systému projevující se jeho spontánním vybarvováním a sníženou stabilitou. V některých pracech byla k odstranění interference bilirubinu doporučena bilirubinoxidasa, která sice působí specificky, ale za cenu vysokých finančních nákladů.

K potlačení vlivu kyseliny askorbové používají v poslední době někteří výrobci diagnostik enzym askorbátoxidacu (P.Fossati a kol.: Clin.Chem. 26, 227, 1980), která katalyzuje přeměnu kyseliny askorbové na kyselinu dehydroaskorbovou, která již stanovení neruší. Použití enzymu askorbátoxidasy je v Československu chráněno (Původní vynález NSR P 26 25 834,4, 1976 a jeho československý analog 235 068, 1987). Použití enzymu askorbátoxidasa je kromě toho značně nákladné a několikanásobně zvyšuje cenu stanovení kyseliny močové. Kromě nespecifity druhé enzymové reakční sekvence s peroxidem vodíku a peroxidasou a následných interferencí redukujícími nebo i oxidujícími látkami, je nutné řešit i další problémy.

Výrobci enzymů předpisují pro uchovávání urikasy teplotu pod -20 °C. Enzym peroxidasa je poněkud stálejší a lze jej uchovávat při teplotách pod o °C. V obou případech ale požadavek uchovávat tyto enzymy za teplot pod 0 °C omezuje až vylučuje výrobu, distribuci a skladování diagnostického přípravku, pokud neobsahuje prostředky stabilizující oba choulostivé enzymy. Zásadním problémem je rychlá deaktivace urikasy v roztoku obsahujícím současně i enzym peroxidasu. Bylo zjištěno, že aktivita urikasy rychle klesá a roztok obsahující oba enzymy je stálý nejvýše 24 hodin. Při hledání stabilizátoru je přitom důležité, aby kromě vlastní stabilizace enzymů stabilizátory nerušily urikasou katalyzovanou oxidaci kyseliny močové ani oxidační kopulaci, a musí být s celým analytickým systémem kompatibilní. Jak bylo nalezeno, pro tyto účely nevyhovuje například jinak často používaný albumin ani většina dalších vysokomolekulárních povrchově aktivních látek, které vesměs snižují citlivost analýzy a podporují spontánní oxidaci a nežádoucí vybarvování pracovního roztoku. Některé z nich kromě toho vyvolávají v reakční směsi opalescenci nebo dokonce zákal. K potlačení autooxidace pracovního roztoku, která je obecně katalyzována těžkými kovy, nelze například použít ani komplexotvorné látky jako je kyselina ethylendiamintetraoctová nebo azid sodný, které značně snižují citlivost stanovení. Směsi nebo roztoky se 4-aminoantipyrinem mají navíc další nevýhodnou vlastnost, protože zejména za přítomnosti enzymu peroxidasy se oxidují na nereaktivní antipyrinovou červeň, která navíc zvyšuje absorbanci pracovního roztoku.

Problémy spojené s průmyslovou výrobou diagnostického přípravku pro enzymové stanovení kyseliny močové na principu oxidační kopulace lze tedy charakterizovat takto: nalezení citlivého derivátu fenolu, který by se 4-aminoantipyrinem tvořil stabilní chinoniminové barvivo, nalezení stabilizátorů enzymů a celého analytického systému kompatibilních s vlastním principem stanovení kyseliny močové, nalezení látek potlačujících interferenci komponent sérové matrice vzorku a nalezení takové formulace výrobku umožňující jednoduchou výrobu a následnou přípravu kompletního pracovního roztoku u spotřebitele.

Uvedené problémy odstraňuje dvousložkové činidlo pro enzymové stanovení kyseliny močové na principu oxidační kopulace s enzymy urikasou a peroxidasou, vyznačující se tím, že sestává z vodného roztoku fosforečnanového pufru pH 6,7 až 8,0 o koncentraci 50 až 300 mmol/l obsahujícího 0,5 až 10 mmol/l 4-chlor-3-methylfenolu a z pevné enzymové směsi obsahující na 10 kU urikasy 30 až 100 kU peroxidasy, 0,1 až 1,0 mol alkalické soli kyseliny hydrogenfosforečné, 6 až 66 milimolů alkalické soli kyseliny dihydrogenfosforečné, 30 až 90 milimolů 4-aminoantipyrinu, 0,3 až 1,5 milimolů hexakyanoželeznatanu alkalického kovu, 0,02 až 0,2 milimolů poly-1,6-anhydroglukosy o molekulové hmotnosti 40 000 až 120 000 g/mol a 0,1 až 1,2 molu síranu alkalického kovu.

Dvousložkové činidlo podle vynálezu je při teplotě +5 °C stálé nejméně jeden rok. Roztok enzymů připravený rozpuštěním pevné enzymové směsi ve vodě je za stejných podmínek stálý nejméně 14 dnů a kompletní pracovní roztok připravený smícháním obou složek je v temnu a chladu při teplotě +5 °C stálý nejméně 48 hodin.

Vysoké stability dvousložkového činidla, roztoku enzymů i kompletního pracovního roztoku je dosaženo synergickým účinkem a přesným poměrem ochranných látek spolu s vhodnou volbou derivátu fenolu, jímž je 4-chlor-3methylfenol. Dvousložkové činidlo, ani kompletní pracovní roztok nevykazují za výše uvedených podmínek změny, které by indikovaly rozklad a které by ztěžovaly nebo dokonce vylučovaly použít pracovní roztok k analýze kyseliny močové. V reakčním systému nedochází k spontánnímu vybarvování vlivem oxidace 4-aminoantipyrinu nebo vlivem spontánní oxidační kopulace mezi komponentami reakčního systému katalyzované obvykle enzymem peroxidasou nebo hexakyanoželeznatanem.

Dvousložkové činidlo a z něj připravený pracovní roztok přitom výrazně potlačuje interferenci bilirubinu a kyseliny askorbové. Tak například při stanovení kyseliny močové ve vzorcích obsahujících bilirubin o koncentraci 10 až 170 μmol/l nebylo pozorováno snížení obsahu kyseliny močové o více než 1 %, při analýze stejných vzorků s činidlem obsahujícím jen základní, pro reakci nezbytné chemikálie bez uvedených specifických stabilizátorů, tedy jen urikasu, peroxidasu, pufr, 4-aminoantipyrin a fenol byl při obsahu bilirubinu 170 μmol/l nalezen obsah kyseliny močové až o 30 % nižší.

Při analýze vzorků obsahujících kyselinu askorbovou bylo nalezeno, že kyselina askorbová až do obsahu 570 μmol/l séra také pozorovatelně neinterferuje při stanovení kyseliny močové. Protože fyziologická koncentrace kyseliny askorbové v séru je asi 85 μmol/l, lze s dvousložkovým činidlem podle vynálezu analyzovat prakticky všechna séra odebraná na lačno a u pacientů s intenzivní léčbou vitamínem C vzorky sér po vysazení vitamínové terapie na dobu 24 hodin. Je tedy zřejmé, že dvousložkové činidlo podle vynálezu vykazuje nejen velmi dobrou stálost, ale současně výrazně potlačuje vliv hlavních rušivých látek ze sérové matrice, bilirubinu a vitamínu C, které jinak při analýze kyseliny močové interferují a jejichž vliv je nutné nákladným způsobem eliminovat, například již zmíněnými enzymy bilirubinoxidasou a askorbátoxidasou. Dvousložkové činidlo pro stanovení kyseliny močové lze přitom vyrobit jednoduchým způsobem a s vyloučením nákladných a obtížně dostupných surovin.

Příklady provedení

Příklad 1

a) Připraví se roztok fosforečnanového pufru o koncentraci 50 mmol/l s pH 6,7 obsahující 0,5 mmol/l 4-chlor-3-methylfenolu.
b) Připraví se pevná směs obsahující na 10 kU urikasy 30 kU peroxidasy, 0,1 molu didraselné soli kyseliny hydrogenfosforečné, 6 milimolů sodné soli kyseliny dihydrogenfosforečné, 30 milimolů 4-aminoantipyrinu, 0,30 milimolů hexakyanoželeznatanu sodného, 0,02 milimolů poly-1,6-anhydroglukosy o molekulové hmotnosti 40 000 g/mol a 0,1 molu síranu draselného.

Příklad 2

a) Připraví se roztok fosforečnanového pufru o koncentraci 300 mmol/l s ph 8,8 obsahující 10 mmol/l 4-chlor-3-methylfenolu.

B) Připraví se pevná směs obsahující:

Urikasa	10 kU
Peroxidasa	100 kU
Disodná sůl kyseliny hydrogenfosforečné	1 mol
Draselná sůl kyseliny dihydrogenfosforečné	66 mmol
4-aminoantipyrin	90 mmol
Hexakyanoželeznatan draselný	1,5 mmol
Poly-1,6-anhydroglukosa	0,2 mmol
Síran sodný	1,2 mol

Příklad použití

Roztok enzymů

V 5,0 ml destilované vody se rozpustí navážka pevné enzymové směsi podle příkladu 1b) nebo 2b) odpovídající katalytické koncentraci urikasy 16 U. Roztok enzymů je při teplotě +5 °C stálý nejméně 14 dnů.

Pracovní roztok

Připraví se smícháním 5 ml roztoku enzymů se 100 ml roztoku pufru podle příkladu 1a) nebo 1b). Pracovní roztok je při teplotě +5 °C stálý nejméně 48 hodin.

Postup analýzy

Ve zkumavkách se smíchá 50 µl vzorku (séra, standardního roztoku kyseliny močové nebo vody) s 1,0 ml pracovního roztoku. Inkubuje se 10 min při pokojové teplotě a změří se absorbance vzorku a standardu proti roztoku s pracovním roztokem s vodou v kyvetě 1 cm při vlnové délce 490 až 510 nm.

PATENTOVÉ NÁROKY

Dvousložkové činidlo pro enzymové stanovení kyseliny močové na principu oxidační kopulace s enzymy urikasou a peroxidasou, vyznačující se tím, že sestává z vodného roztoku fosforečnanového pufru pH 6,7 až 8,8 o koncentraci 50 až 300 mmol/l, obsahujícího 0,5 až 10 mmol/l 4-chlor-3-methylfenolu a z pevné enzymové směsi, obsahující na 10 kU urikasy 30 až 100 kU peroxidasy, 0,1 až 1,0 mol alkalické soli kyseliny hydrogenfosforečné, 6 až 66 milimolů alkalické soli kyseliny dihydrogenfosforečné 30 až 90 milimolů 4-aminoantipyrinu 0,3 až 1,5 milimolů hexakyanoželeznatanu alkalického kovu, 0,02 až 0,2 milimolu poly-1,6-anhydroglukosy o molekulové hmotnosti 40 000 až 120 000 g/mol a 0,1 až 1,2 molu síranu alkalického kovu.