



GRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

235068
(11) (B2)

(51) Int. Cl.⁵
G 01 N 33/54

(22) Přihlášeno 06 05 77

(21) [PV 1874-78]

(32) (31) (33) Právo přednosti od 09 06 76
(P 26 25 834.4)

Německá spolková republika

(40) Zveřejněno 31 08 84

(45) Vydáno 15 02 87

(72)

Autor vynálezu

DANNINGER JOSEF, GRÄFELFING, DENEKE ULFERT dr.,
PEISSENBERG, LANG GUNTER, MICHAL GERHARD dr., TUTZING,
RÖSCHLAU PETER dr., SEESHAUPT (NSR)

(73)

Majitel patentu

BOEHRINGER MANNHEIM GMBH, MANNHEIM-WALDBOF (NSR)

(54) Činidlo k enzymatickému stanovení substrátů

1

2

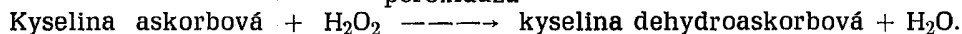
Předmětem vynálezu je činidlo k enzymatickému stanovení substrátů nebo enzymatické účinnosti sestávající ze systému pro stanovení substrátu nebo enzymu pomocí redox-reakce jako měřicí reakce, vyznačující se tím, že obsahuje askorbát oxidázu.

Činidlo je vhodné především při analýze farmaceutických přípravků nebo fyziologických kapalin.

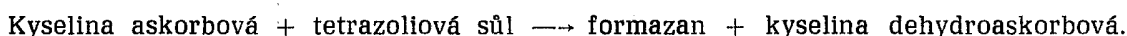
Vynález se týká činidla k enzymatickému stanovení substrátů.

V klinické a farmaceutické chemii, biochemii a potravinářské chemii mají redoxreakce ke stanovení koncentrace enzymu nebo substrátu velký význam. Vyhodnocení těchto reakcí je možno provádět fotometricky. V případě, že jsou ve zkušebním vzorku kromě žádané redoxreakce ještě další redukující látky, je nutné počítat s větší chybou vzhledem k rušení této reakce. Zvláště často se ve vzorku vyskytuje kyselina askorbová. Jako silné redukční či-

peroxidáza



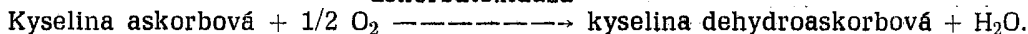
Reakce, při nichž se redukují tetrazoliové soli redukčními činidly na formazany jsou rušeny následující reakcí.



Reakce, při nichž dochází ke styku fenolů s nukleofilními reakčními složkami s tím k jejich oxidativní vazbě jsou rušeny tím, že kyselina askorbová způsobuje zatím neznámým způsobem vznik vedlejších reakcí, takže vzniká nejednotný oxidativní produkt, který se liší u absorbcí v normálním i ultrafialovém světle od běžných produktů této reakce.

K odstranění kyseliny askorbové ze vzorku jsou běžné oxidační metody zpravidla nevhodné. Oxidační činidlo porušují také substráty a enzymy a rozrušují je. Redukční produkty, těchto činidel, většinou dvojmolekulární nebo trojmolekulární kovové ionty často

askorbát oxidáza



Podle literárních údajů, týkajících se oxidázy kyseliny askorbové by bylo nutno očekávat, že se enzym k uvedenému účelu nehodí. Všechny dosud získané přípravky tohoto enzymu redukují jako vedlejší reakce peroxid vodíku. Mimoto se askorbát oxidáza velmi rychle inaktivuje vznikajícím peroxidem vodíku. (Biochemical Copper Proceedings Symposium Harriman New York 1963, str. 305 až 337).

To platí i pro velmi čisté přípravky, které při elektroforéze v ultraodstředivce již nemají žádné nečistoty. [Biochem. 4, 1362 až 1370 (1965)]. Příčinou inaktivace je tvorba peroxidu vodíku [Biochem. Biophys. Acta 56, 427 až 439 (1962)]. Podle této citace vzniká z jedné jednotky askorbát oxidázy v roztoku kyseliny askorbové o koncentraci 1 mmol/litr celkem $0,7 \times 10^{-2}$ mmol/litr peroxidu vodíku. Tyto koncentrace jsou ve vzorcích často dosaženy. Vznikající peroxid vodíku dále ruší enzymatickou reakci, jak je možno ukázat například na příkladu katalázy.

nidlo vede tato látka k chybám při vyšetřování farmaceutických přípravků nebo fyziologických kapalin, jako moči, rostlinných šťáv s obsahem kyseliny askorbové nebo některých potravinářských výrobků, které kyselinu askorbovou obsahují nebo k nimž byla tato kyselina přidána. Je například známo, že kyselina askorbová ruší následující reakce.

Reakce, při nichž se uvádí ve styk peroxid vodíku a donor vodíku s peroxidázou (POD) jsou rušeny následující reakcí

brzdí účinnost enzymů, užitých k indikační reakci. Rozrušení kyseliny askorbové kyslíkem je možno provádět pouze v silně alkalickém prostředí, například 25% hydroxidu sodného. Toto prostředí však rozruší substráty i enzymy.

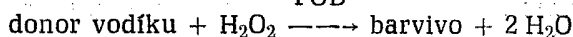
Vynález si klade za úkol navrhnout činidlo ke stanovení substrátů nebo enzymatické účinnosti při použití redoxreakce, tak, aby tato reakce již nebyla rušena kyselinou askorbovou.

Podle vynálezu je tento úkol vyřešen tak, že se ke vzorku přidá askorbát oxidáza.

Askorbát oxidáza katalyzuje následující reakci:

Při provádění následující reakce

POD



v případě fotometrického zjištění peroxidu vodíku dochází při molárním extinkčním koeficientu přibližně $20 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ k diferenci 0,14. Protože rozsah měření fotometrických reakcí je 0,01 až 1,00, je tato chyba naprosto nepřijatelná. Stejným způsobem je rušena reakce i v tom případě, že místo peroxidu vodíku vznikají organické hydroperoxidázy a místo POD užije hemoglobin nebo jiný katalyzátor oxidace.

Kromě toho, že dochází k chybě, vyvolané přítomností peroxidu vodíku je z literatury také známo, že reakce kyseliny askorbové proběhne již dlouho před odstraněním této kyseliny.

Zvláště nepříznivá je tato skutečnost při těch redoxreakcích, při nichž vzniká peroxid vodíku, protože tento peroxid na jedné straně podporuje inaktivaci enzymu a

na druhé straně vede ke vzniku dalšího množství peroxidu působením askorbát oxidázy a tím k naprosto nepřehlednému průběhu reakce. Je proto překvapující, že oproti veškerému očekávání je možné úplně odstranit reakční chybu, způsobenou přítomností askorbátu přidáním askorbát oxidázy, aniž by přitom došlo k dalším chybám, které by rušily příznivý účinek askorbázy.

Činidlo podle vynálezu se s výhodou užívá při enzymatických reakcích, zvláště takových, u nichž vzniká peroxid vodíku, tj. při reakcích, katalyzovaných oxidázami jako jsou glukózo oxidáza, urikáza, cholesterol oxidáza a podobné enzymy a dále při reakcích, při nichž jsou redukovány tetrazoliové soli nebo při nichž dochází k reakci mezi fenolem a nukleofilním reakčním činidlem za vzniku oxidativních produktů. Množství přidávané askorbát oxidázy se řídí podle očekávaného množství kyseliny askorbové ve vzorku. Zpravidla se přidává 0,002 až 100, s výhodou 0,01 až 30 jednotek/ml vzorku.

Hodnota pH při reakci se řídí podle hodnoty, která je žádoucí vzhledem k použitému enzymu. Jinak je možno reakci provádět v rozmezí 4,0 až 8,5. Zvláště výhodné je použití askorbát oxidázy z Cucurbita pepo medullosa. Je však možné užít i askorbát oxidázu jiného původu.

Předmětem vynálezu je tedy činidlo k enzymatickému stanovení substrátů nebo enzymatické účinnosti sestávající ze systému pro stanovení substrátu nebo enzymu pomocí redox-reakce jako měřicí reakce, vyznačující se tím, že obsahuje askorbát oxidázu.

Výhodné reakce tohoto typu obsahují v případě glukózy jako substrátu enzymy peroxidázu, glukózo oxidázu, dále o-dianisidin nebo amino-di-3-ethylbenzylthiazolinsulfonát (6) s pufrům nebo hexokinázou, glukózo-6-fosfátdehydrogenázou, diaforázou, NADP, tetrazoliovou sůl jako 3-(4-jód fenyl)-2-(4-nitrofenyl)-5-fenyl-2H-tetrazoliumchlorid a pufr.

U kyseliny močové jako substrátu sestává systém s výhodou z peroxidázy, urikázy, fenolu jako 2,4-dichlorfenolu, aminoantipyrinu a pufru. V případě stanovení glutamátu sestává systém s výhodou z glutamátdehydrogenázy, diaforázy, NAD, INT a pufru. V případě tyrosinu se užije tyrosináza, 3-methyl-6-kaliumsulfonfylbenzthiazolonhydrazon (2), při stanovení pyrokatechinu se užije difenoloxidáza, 3-methyl-6-kaliumsulfonfylbenzthiazolonhydrazon (2) a pufr. Všechny tyto systémy ke stanovení substrátu jsou známé. Je možno užít tyto i jiné známé systémy ke stanovení substrátu nebo enzymu.

Činidlo podle vynálezu má zvláště velký význam i při použití k rychlé diagnostice některých poruch. Přípravky pro rychlou

diagnostiku obsahují zpravidla různé reakční složky, nutné k provádění reakce v impregnované formě na nosiči, nebo spolu s pojivem na nosné fólii jako povlak. Při výhodné formě provedení těchto reakcí se askorbát oxidáza přidává k reakční směsi před impregnací nosiče. Tímto způsobem je možno získat například papírky, u nichž není reakce rušena kyselinou askorbovou a jichž je možno užít ke stanovení glukózy v moči, (například podle DT—OS 2 338 932) ke stanovení krve v moči, například podle P 24 60 903—8 nebo podle NSR patentu 2 235 152 a ke stanovení krve ve výkalech.

Skutečnost, že askorbát oxidáza ve zkušebních papírcích na krev v moči je stabilní je nanejvýš překvapující. Tyto papírky totiž obsahují přebytek organických hydroperoxidů, které by měly způsobit inaktivaci askorbát oxidázy.

Askorbát oxidázu je však možno také nanést na oddělený nosič, který se pak smísí s nosičem pro zbývající reakční složky, například se převrství, stmelí apod. Zvláště výhodným nosičem pro askorbát oxidázu je v tomto případě tzv. ve vodě rozpustný papír, například podle DT—OS 2 436 598, při použití barevné reakce je pak možno výslednou barevnou změnu zvláště dobře odečíst.

Nosný materiál se popřípadě impregnuje v oddělených zónách askorbát oxidázou a ostatními reakčními složkami. V tomto případě se s výhodou uvádí nosič se zkoumaným vzorkem do styku tak, že se roztok nejprve uvede ve styk se zónou s obsahem askorbát oxidázy a pak teprve se zónou, která obsahuje reakční složky.

Podle dalšího výhodného provedení vynálezu se askorbát oxidáza váže běžnými metodami pro fixaci enzymů na nerozpustné nosiče. Tyto metody jsou známy z následujících literárních údajů.

DOS

1 768 512	2 426 988
2 128 743	2 603 158
2 260 185	1 915 970
2 260 184	

Činidlo podle vynálezu se s výhodou užívá při stanovení glukózy peroxidázou a glukózo oxidázou spolu s o-dianisidinem nebo 2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazolinsulfonátem (6) (ABTS), při stanovení glukózy pomocí hexokinázy a glukózo-6-fosfátdehydrogenázy, při stanovení kyseliny močové směsí fenolu, aminoantipyrinu, peroxidázy a urikázy, ke stanovení tyrosinu nebo pyrokatechinu při použití (4-methyl-6-kaliumsulfonfylbenzthiazolonhydrazon (2) (SMBTH) a tyrosinázy, popřípadě difenoloxidázy.

Vynález bude osvětlen následujícími příklady.

Příklad 1

Stanovení glukózy se provádí použitím o-

-dianisidinu, peroxidázy (POD) a glukózo-oxidázy (GOD) ve fotometru při vlnové délce 432 nm a 25 °C.

Číslo kyvety	1	2	3	4	5
fosfátový pufr					
pH 7,01 M	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
o-dianisidin					
5 mg/ml	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
POD, 180 jednotek/ml	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
roztok glukózy					
1 mg/ml	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
roztok kyseliny askorbové					
10 mmolů	—	0,1	0,01	0,1	0,01
voda	0,12	0,02	0,11	—	0,09
askorbát oxidáza					
500 jednotek/ml	—	—	—	0,02	0,02
Inkubace 1 minuta při 25 °C, odečte se E ₁ , pak se přidá					
GOD 70 jednotek/ml	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Inkubace 30 minut při 25 °C, odečte se E ₂ a vypočítá $\Delta E = E_2 - E_1$					
ΔE	0,541	0,010	0,316	0,540	0,543

Měření v první kyvetě nebylo ničím rušeno, protože kyveta neobsahovala kyselinu askorbovou.

Další dvě kyvety ukazují, že přítomnost 1, popřípadě 0,1 μ molu askorbátu ruší první zkoušku téměř úplně, ve druhém případě na 41,5 %.

Další dvě kyvety ukazují, že přidáním 10 jednotek askorbát oxidázy je možno úplně zrušit nepříznivý vliv askorbátu.

Příklad 2

Stanovení glukózy bylo prováděno při použití 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazolinsulfonát (6)] (ABTS), GOD a GOD ve fotometru při vlnové délce 432 nm a teplotě 25 °C.

Kyveta číslo	1	2	3	4	5
fosfátový pufr					
pH 5,6, 0,1 M	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75
ABTS 50 mmolů	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
POD 250 jednotek/ml	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
roztok glukózy 0,1 mg/ml	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
roztok kyseliny askorbové 1 mmol	—	0,1	0,01	0,1	0,01
voda	0,12	0,02	0,11	—	0,09
askorbát oxidáza					
500 jednotek/ml	—	—	—	0,02	0,02
Po inkubaci 1 minutu při 25 °C se odečte E ₁ a přidá se					
GOD 70 jednotek/ml	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Po inkubaci 30 minut při 25 °C se odečte E ₂ a vypočítá se $\Delta E = E_2 - E_1$					
ΔE	0,505	0,000	0,40	0,502	0,504

První kyveta odpovídá nerušenému stanovení bez askorbátu. Následující dvě kyvety ukazují, že 0,1 nebo 0,01 μ molu askorbátu brzdí zkoušku v prvním případě úplně, ve druhém na 21 %.

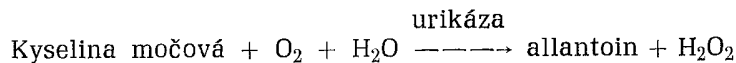
V posledních dvou kyvetách je zkouška s nerušeným průběhem v důsledku toho, že rušivý vliv askorbátu v uvedených koncentracích byl zrušen přidáním 10 jednotek askorbát oxidázy.

Příklad 3

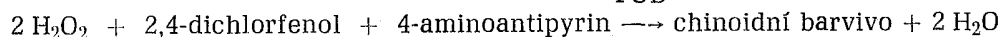
no směsí fenolu, aminoantipyrinu, POD a urikázy v automatickém analyzátoru.

Stanovení kyseliny močové bylo provádě-

Princip zkoušky



POD



Výroba roztoků

1) Reakční činidlo s obsahem askorbát oxidázy

K 600 ml bidestilované vody se rozpustí obsah standardizované lahvičky. Přidá se 0,3 ml přípravku Brij—35 polyethylenglykollauryletheru.

Směs je skladovatelná ve tmavém skle při teplotě 4 °C 4 týdny při teplotě 25 °C 1 týden.

2) Reakční činidlo s obsahem urikázy

V 800 ml bidestilované vody se rozpustí obsah standardizované lahvičky 2. Přidá se 2,0 ml polyethylenglykollauryletheru. Roztok je stálý v tmavém skle při teplotě 4 °C 4 týdny, při teplotě 25 °C 1 týden.

Koncentrace roztoku

1) 50 mmolů fosfátového pufru o pH 5,6

Askorbát oxidáza v množství alespoň 0,056 až 0,9 jednotek množství vyplývá z grafu na obr. 2, pokud je lze odečíst. Lze užít i vyššího množství.

2) 31 mmolu tris/kyselina citrónová o pH 8,9 urukáza v množství 0,08 jednotek/ml nebo větším

PCD v množství 0,15 jednotek/ml nebo větším

3,0 mmolu 2,4-dichlorfenolu,
4,0 mmolu 4-aminoantipyrinu.

Vynález bude osvětlen v souvislosti s příloženými obr. 1 a 2.

Na obr. 1 je znázorněno automatické zařízení k provádění zkoušek.

Obr. 2 znázorňuje výsledky zkoušek grafickým způsobem.

K provedení zkoušky se užije systému automatického zařízení z obr. 1.

Toto zařízení sestává z přívodu 1 pro vzduch, přívodu 2 pro vzorek, přívodu 3 pro svrchu uvedeně reakční činidlo 1, přívodu 4 pro vzduch a přívodu 5 pro reakční činidlo 2. Za těmito přívody je zařazen dialyzátor 6 a za ním reakční trubice 7, na jejímž konci se nachází fotometr 8 pro měření příslušných hodnot.

Přívodem 1 se přivádí 0,32 ml vzduchu za minutu, přívodem 2 0,23 ml vzorku za minutu, přívodem 3 0,6 ml reakčního činidla 1 za minutu, přívodem 4 0,32 ml vzduchu za minutu a přívodem 5 1,0 ml reakčního činidla 2 za minutu.

Na obr. 2 jsou na ose pořadnic znázorněny mg kyseliny močové ve 100 ml, na ose úseček mg kyseliny askorbové na 100 mililitrů.

Jednotlivé křivky mají následující význam:

křivka 1': pufr bez askorbát oxidázy
křivka 2': 0,056 jednotek/ml askorbát oxidázy
křivka 3': 0,112 jednotek/ml askorbát oxidázy
křivka 4': 0,225 jednotek/ml askorbát oxidázy
křivka 5': 0,45 jednotek/ml askorbát oxidázy
křivka 6': 0,67 jednotek/ml askorbát oxidázy
křivka 7': 0,9 jednotek/ml askorbát oxidázy

Příklad 4

Glukóza se stanoví směsí HK/G6P—DH, NADP, INT a diaforázy ve fotometru. Měření se provádí při vlnové délce 492 nm a při inkubační teplotě 25 °C.

Kyveta číslo	1	2	3
fosfátový pufr o pH 7,5, 01 molu	1,7	1,7	1,7
NADP/INT vždy 1 mg/ml	0,1	0,1	0,1
diaforáza 5 jednotek/ml	0,1	0,1	0,1
glukóza 0,05 mg/ml	0,1	0,1	0,1
roztok askorbátu 10 mmolů	—	0,01	0,01
askorbát oxidáza 35 jednotek/ /ml	—	—	0,03
voda	0,04	0,03	—
Po inkubaci 3 minut při 25 °C se odečte E_1 a přidá se			
HK/G6P—DH—roztok 56 jednotek/ml	0,05	0,05	0,05
Po 15 minutách inkubace se odečte E_2 a vypočítá se $\Delta E = E_2 - E_1$			
ΔE	0,234	0,307	0,230

Kyveta 1 znamená nerušené měření.

Kyveta 2 znamená rušení zkoušky přítomností 0,01 μ molu askorbátu na 34 % při tvorbě sraženiny, v kyvetě 3 je tento nepříznivý vliv zcela odstraněn přidáním 1 jednotky askorbát oxidázy.

Příklad 5

Stanovení glutamátu se provádí směsí GIDH, NAD/INT/diaforázy ve fotometru při vlnové délce 492 nm a teplotě 25 °C.

Kyveta číslo	1	2	3	4	5
fosfátový pufr pH 5,6, 0,01 mmolu	1,30	1,20	1,29	1,18	1,27
roztok glutamátu 0,2 mg/ml	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
roztok askorbátu 5 mmolů	—	0,1	0,01	0,1	0,01
askorbát oxidáza 100 jednotek/ml	—	—	—	0,02	0,02

Po inkubaci 3 minuty při 25 °C se do kyvet přidá 0,2 molu TRA, 0,05 molu fosforečnanu draselného o pH 8,6 a 1,5 %

Triton—X—100 alkylarylpolyethylen-glykolether	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
roztok NAD 5 mg/ml	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
roztok diaforázy 10 jednotek/ml	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
GIDH 100 jednotek/ml	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Odečte se E_1 , přidá se					
roztok INT 2 mg/ml	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

po inkubaci 15 minut při 25 °C se odečte E_2 a vypočítá se $\Delta E = E_2 - E_1$

ΔE	0,184	1,560	0,380	0,186	0,182
------------	-------	-------	-------	-------	-------

Kyveta 1 odpovídá nerušenému měření.

Z výsledků kyvet 2 a 3 je zřejmé, že 0,5 nebo 0,05 μ molu askorbátu ruší test na 100 proc. při tvorbě sraženiny.

V kyvetách 4 a 5 dojde k úplnému odstranění tohoto rušivého účinku přidáním 2 jednotek askorbát oxidázy.

Příklad 6

Stanovení tyrosinu se provádí směsí 3-methyl-6-kaliumsulfonfylbenzthiazolonhydrazonu (2) (SMBTH) a tyrosinázy ve fotometru při vlnové délce 492 nm a teplotě 25 stupňů Celsia.

Kyveta číslo	1	2	3
fosfátový pufr, pH 5,2,			
0,25 molu	2,77	2,77	2,77
SMBTH 0,1 molu	0,05	0,05	0,05
kyselina askorbová			
10 mmolů	—	0,1	0,1
voda	0,12	0,02	—
askorbát oxidáza 500			
jednotek/ml	—	—	0,02
tyrosináza 60 jednotek/ml	0,05	0,05	0,05
Po inkubaci 1 minutu při 25 °C se odečte E ₁ a přidá se			
tyrosin 2 mmoly	0,05	0,05	0,05
Po inkubaci 1 hodinu při 25 °C se odečte E ₂ a vypočítá se $\Delta E = E_2 - E_1$			
ΔE	1,113	0,728	1,100

První kyveta odpovídá nerušenému měření v druhé kyvetě sníží přidavek 1 μ mol askorbátu teoretickou hodnotu o 35 %, v následující kyvetě je tato chyba zcela odstraněna přidáním 10 jednotek askorbát oxidázy.

Příklad 7

Stanovení pyrokagechinu se provádí směsí SMBTH a difenol oxidázy.

Kyveta číslo	1	2	3
fosfátový pufr, 0,25 molu,			
pH 5,2	2,80	2,70	2,68
SMBTH 0,1	0,05	0,05	0,05
pyrokatechin 0,5 molu	0,10	0,10	0,10
roztok askorbátu 20 mmolů	—	0,1	0,1
askorbát oxidáza 500			
jednotek/ml	—	—	0,02
Po 1 minutě inkubace při 25 °C se odečte E ₁ a přidá se			
difenol oxidáza 200			
jednotek/ml	0,05	0,05	0,05
Po 17 minutách inkubace při 25 °C se odečte E ₂ a vypočítá se $\Delta E = E_2 - E_1$			
ΔE	0,890	0,485	0,896

Kyveta 1 odpovídá nerušenému měření. V kyvetě 2 sníží 2 μ moly askorbátu teoretickou hodnotu o 47 %, toto snížení je v kyvetě 3 zcela odstraněno přidáním 10 jednotek askorbát oxidázy.

Příklad 8

Testovací papírky ke stanovení glukózy v moči

Filtrační papír se ponoří do roztoku následujícího složení a pak se suší při 50 °C.

1,2 M citrátový pufr o pH 5	50,0 ml
9- $\{\gamma$ -dimethylaminopropyl)-6-chlor-3-aminokarbazoldihydrochlorid	0,75 g
glukózo oxidáza 104 jednotek/mg	0,25 g
peroxidáza 63 jednotek/mg	0,05 g
askorbát oxidáza 100 jednotek/mg	1,00 g
voda	100,00 ml

Papírek se po styku s močí, obsahující glukózu zbarví červenooranžově až červeně. Po reakční době 2 minuty dávají moče s obsahem glukózy a kyseliny askorbové až do koncentrace 150 mg/dl totéž zbarvení.

Při použití papírků téhož složení bez askorbát oxidázy je podle obsahu glukózy reakční zbarvení při koncentraci kyseliny askorbové od 50 mg/dl oslabeno nebo zcela potlačeno.

Příklad 9

Zkušební papírky ke stanovení krve v moči

Filtrační papír se impregnuje následujícím roztokem a pak se suší při 40 °C.

Roztok 1

1,2 M citrátového pufru o pH 2,55	35,0 ml
-----------------------------------	---------

dvojsodná sůl kyseliny ethyldiamintetraoctové	0,1 g
dioktylnatriumsulfosukcinát	0,5 g
2,5-dimethylhexan-2,5-dihydroperoxid (70 %)	1,6 g
trimorfolid kyseliny fosforečné	12,7 g
askorbát oxidáza 100 jednotek/mg	0,3 g
methanol	30,0 ml
voda do	100,0 ml

Roztok 2

3,3',5,5'-tetramethylbenzidin	0,3 g
fenanthridin	0,2 g
toluol/petrolether (30 : 70) do	100,0 ml

Při použití tohoto papírku je možno zjistit přítomnost 5 červenýchrvinek v 1 mm³ v moči i za přítomnosti 30 až 50 mg kyseliny askorbové na 100 ml. Při použití papírku téhož složení bez askorbát oxidázy není možno průkaz provádět již za přítomnosti 10 až 20 mg kyseliny askorbové/100 mililitrů moči.

Příklad 10

Zkušební papírek A

Papírek z příkladu 9 bez askorbát oxidázy.

Zkušební papírek B

Ve vodě rozpustný papír z karboxymethylcelulózy o plošné váze 60 g/cm² se nasýtí roztokem 20% ledové kyseliny octové v methanolu za účelem neutralizace. Pak se papírek postříká vodným roztokem askorbát oxidázy o koncentraci 10³ jednotek/ml a u-suší se.

Zkušební papírek B se položí na papírek A a oba papírky se uloží na podložní polyesterovou fólii a kryjí nylonovou sítí. Zkoumaný vzorek moči se kape na takto vzniklé proužky.

Byly získány tytéž výsledky jako v příkladu 9.

Příklad 11

Zkušební papírek ke zjištění krve ve stolici

Filtrační papír se postupně nasýtí následujícími roztoky a suší při teplotě 40 °C.

Roztok 1

1,2 M citrátový pufr o pH 5,25	10 ml
askorbát oxidáza 100 jednotek/mg	0,3 g
voda do	100,0 ml

Roztok 2

guajaková pryskyřice	3 g
toluol do	100,0 ml

Roztok se zfiltruje a filtrát se užije k impregnaci filtračního papíru.

Získá se zkušební papírek, na nějž se nanese vzorek stolice. V případě, že se na zadní stranu papírku nanese 3% vodný roztok peroxidu vodíku, vytvoří se modré zbarvení v případě, že stolice obsahuje alespoň 2 % krve. Toto zbarvení se vyvine také za přítomnosti kyseliny askorbové v množství 15 mg/100 g, kdežto při použití zkušebního papírku bez askorbát oxidázy se zbarvení vůbec nevyvine.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Činidlo k enzymatickému stanovení substrátů nebo enzymatické účinnosti sestávající ze systému pro stanovení substrátu nebo enzymu pomocí redox-reakce jako měřicí reakce, vyznačující se tím, že obsahuje askorbát oxidázu.

2. Činidlo podle bodu 1, vyznačující se tím, že je nanášeno na impregnační schopný nosný materiál, s výhodou papír.

