

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 307 555

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

*C12Q 1/28* (2006.01)  
*C12Q 1/25* (2006.01)  
*G01N 33/487* (2006.01)  
*G01N 21/78* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2017-271**  
(22) Přihlášeno: **16.05.2017**  
(40) Zveřejněno: **28.11.2018**  
**(Věstník č. 48/2018)**  
(47) Uděleno: **17.10.2018**  
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **28.11.2018**  
**(Věstník č. 48/2018)**

(56) Relevantní dokumenty:

H. Crocker et al: "Evaluation of an enzymatic method for determining creatinine in plasma" J. Clin. Pathol. 41, 576-581 (1988); Anonym: "Quantitative determination of creatinine. Enzymatic colorimetric method" Creatinine Enzymatic LR 30335 - Rev. 01-2010/10 (SGM Italia); Anonym: "Creatinine Reagent - Enzymatic 2 Part Liquid" Thermo Fischer Scientific Inc. 2010.  
EP 2 653 551 A1; EP 1 930 443 A1.

(73) Majitel patentu: **Prevention Medicals s.r.o., Studénka, CZ** 5 až 20 mM. Předmětem vynálezu jsou též příslušné diagnostické soupravy.

(72) Původce:  
Dagmar Uhlířová, Brno, CZ  
Michaela Dočekalová, Mutěnice, CZ  
Martina Staňková, Kuřim, CZ  
Josef Růžička, Prostějov, CZ  
René Kizek, Černá Hora, CZ

(74) Zástupce:  
INPROCHES Patentová a známková kancelář,  
Mgr. Alžběta Jurtíková, patentová zástupkyně,  
Mezírka 1, 602 00 Brno

(54) Název vynálezu:

**Reakční směs pro kvantitativní stanovení sarkosinu ve vzorku lidské moči, séra nebo plazmy**

(57) Anotace:  
Řešení se týká reakční směsi pro snadné, rychlé a finančně nenáročné enzymatické stanovení množství sarkosinu ve vzorku lidské moči, séra nebo plazmy prostřednictvím automatizovaných fotometrických systémů. Reakční směs obsahuje činidlo R1, které tvoří chlorid sodný v koncentraci 100 až 200 mM, chlorid draselný v koncentraci 30 až 80 mM, fosforečnan sodný v koncentraci 10 až 50 mM, močovina v koncentraci 200 až 500 mM, kreatinin v koncentraci 10 až 25 mM, bovinní sérový albumin v koncentraci 600 až 800 µM a sarkosin v koncentraci 10 až 100 µM a reakční činidlo R2, které tvoří peroxidáza o aktivitě 10 až 100 KU/l, sarkosin oxidáza o aktivitě 2 až 10 KU/l, fenol o koncentraci 1 až 5 mM a barviva 4-amino-2,3-dimethyl-1-fenyl-3-pyrazolin-5-on o koncentraci 0,1 až 2,0 mM a sodná sůl 3-(N-ethyl-3-methylanilin)propanesulfonové kyseliny v koncentraci 0,1 až 2,0 mM nebo 3,3'-diaminobenzidin v koncentraci 1 až 10 mM nebo o-nylendiamin v koncentraci

CZ 307555 B6

## Reakční směs pro kvantitativní stanovení sarkosinu ve vzorku lidské moči, séra nebo plazmy

### 5 Oblast techniky

Vynález se týká reakční směsi pro kvantitativní enzymatické stanovení sarkosinu ve vzorku lidské moči, séra nebo plazmy prostřednictvím automatizovaných fotometrických systémů.

10

### Dosavadní stav techniky

Sarkosin (N-methylglycin) je aminokyselina, která může vznikat methylací glycinu. Fyziologicky je sarkosin v organismu přítomen ve stopovém množství. Zvýšené hodnoty  
15 nacházíme v krvi a v moči u sarkosinémie z deficitu sarkosindehydrogenázy a u glutarové acidurie typu II. Sarkosinémie je velmi vzácná metabolická porucha, která nemá přesně definované klinické projevy. U onemocnění dochází k vzestupu hladiny sarkosinu v moči i krevní plazmě [1]. Analyzované hodnoty sarkosinu se tak mohou pohybovat v desítkách až stovkách mikromolárních koncentrací ve sledovaném biologickém vzorku. N,N-dimethylglycin byl  
20 testován pro potencionální antioxidační efekt v průběhu fertilizace. Bylo zjištěno, že použitím N,N-dimethylglycinu dochází k lepšímu vývinu zárodků skotu [2].

Kromě uvedeného jsou hladiny vybraných aminokyselin (v moči, krevním séru) možné ukazatele potencionálního kardiovaskulárního rizika [3]. Klasická homocysteinurie (HCU) je způsobena  
25 deficitem cystathionin-beta-synthasy a je charakterizován poruchami pojivové tkáně, mentální retardací a kardiovaskulárními onemocněními. Léčba typicky zahrnuje snižování hladiny homocysteinu s dietou omezující methionin a dietní suplementace betainem, což přímo navazuje na metabolickou dráhu spojenou se sarkosinem [4]. Podobně byly popsány poměrně významné změny hladin aminokyselin, včetně sarkosinu u pacientů s chorobami aorty [5]. Navržený marker  
30 by mohl napomoci při neinvazivní a objektivní diagnostice takové závažné zdravotní poruchy [5].

Bylo zjištěno, že u pacientů s aktivně probíhajícím onemocněním HIV dochází k významným změnám hladiny sarkosinu a N,N-dimethylglycinu [6]. Bylo zde také prokázáno, že po proběhlé  
35 antivirotické terapii došlo k významnému snížení hladiny obou markerů [6].

Terapeuticky se sarkosin používá ve vysokých koncentracích (2 g/den) jako podpůrná léčba psychických a psychiatrických onemocnění, především schizofrenie [7, 8]. Při jeho použití dochází k ovlivnění glutamátového receptorového systému a sarkosin je pravděpodobně  
40 inhibítoem glycintransporter-1 (GlyT-1) [9].

V řadě experimentálních studií byly sledovány aminokyselinové profily ve vztahu k nádorům prostaty [5, 10, 11]. Zvýšené hladiny sarkosinu v moči byly identifikovány jako potencionální marker zhoubných nádorů a to především nádorů prostaty [12].  
45

Kromě výše uvedených důvodů pro analýzu sarkosinu v biologickém vzorku je sarkosin v běžném spotřebitelské síti dostupný jako doplněk stravy. Zde by jeho zvýšené koncentrace měly být pravděpodobně sledovány pro posouzení maximálních vhodných dávek aminokyseliny.

50 Ke stanovení sarkosinu se dosud používaly běžně chromatografické a elektrochemické metody. Vzhledem ke klinickému významu tohoto metabolitu byly určité snahy o nalezení způsobu, jak tyto metody modifikovat pro použití v klinických laboratořích a umožnit kvantitativní detekci u pacienta jako součást diagnostického vyšetření.

Metodu kvantitativní detekce sarkosinu ve vzorku moči pomocí chromatografie a hmotnostní spektrometrie uvádí spis CN 102662013 nebo CN 1026800599. Detekci sarkosinu pomocí zařízení na bázi elektroforézy–elektrochemiluminiscence popisuje například dokument CN 101718746. Kvantitativní rutinní stanovení sarkosinu je však stále náročné na přístrojové vybavení, často vyžaduje chemickou úpravu biologického vzorku a není dostatečně citlivé a přesné.

Enzymatické metody pro automatické analýzy při stanovení kreatininu, kyseliny močové, triacylglycerolu, cholesterolu, glukosy a případně dalších analytů využívají Trinderovy reakce 4-aminoantipyrinu a fenolu v přítomnosti peroxidu a peroxidázy, kdy vzniká chioniminové barvivo s výsledným vyhodnocením automatizovanými fotometrickými systémy [13]. Zavedení této reakce do klinické biochemie přineslo ve spojení se substrátově specifickými enzymy výrazné zlepšení specifity a selektivity [14].

Analýza sarkosinu v klinických laboratořích v běžném provozu není v současné době možná. Pro její provedení je nezbytné zavést vhodnou metodiku včetně práce s jednotlivými složkami a poměrně náročnou optimalizací metody.

#### Literatura:

1. Lee SY, Chan KY, Chan AYW, et al. A report of two families with sarcosinaemia in Hong Kong and revisiting the pathogenetic potential of hypersarcosinaemia, *Annals of the Academy of Medicine Singapore* 2006; 35(8): 582–584,
2. Takahashi T, Sasaki K, Somfai T, et al. N,N-Dimethylglycine decreases oxidative stress and improves in vitro development of bovine embryos, *Journal of Reproduction and Development* 2016; 62(2): 209–212.
3. Lever M, George PM, Dellow WJ, et al. Homocysteine, glycine betaine, and N,N-dimethylglycine in patients attending a lipid clinic. *Metabolism: Clinical and Experimental* 2005; 54(1): 1–14.
4. Maclean KN, Jiang H, Greiner LS, et al. Long-term betaine therapy in a murine model of cystathionine beta-synthase deficient homocystinuria: Decreased efficacy over time reveals a significant threshold effect between elevated homocysteine and thrombotic risk. *Molecular Genetics and Metabolism* 2012; 105(3): 395–403.
5. Wang LL, Liu S, Yang WG, et al. Plasma Amino Acid Profile in Patients with Aortic Dissection, *Sci Rep* 2017 Jan; 7.
6. Look MP, Riezler R, Berthold HK, et al. Decrease of elevated N,N-Dimethylglycine and N-methylglycine in human immunodeficiency virus infection during short-term highly active antiretroviral therapy. *Metabolism: Clinical and Experimental* 2001; 50(11): 1275–1281.
7. Strzelecki D, Kaluzynska O, Wysokinski A. BDNF serum levels in schizophrenic patients during treatment augmentation with sarcosine (results of the PULSAR study). *Psychiatry Res* 2016 Aug; 242: 54–60.
8. Strzelecki D, Podgorski M, Kaluzynska O, et al. Adding Sarcosine to Antipsychotic Treatment in Patients with Stable Schizophrenia Changes the Concentrations of Neuronal and Glial Metabolites in the Left Dorsolateral Prefrontal Cortex. *Int J Mol Sci* 2015 Oct; 16(10): 24475–24489.
9. Hashimoto K, Malchow B, Falkai P, et al. Glutamate modulators as potential therapeutic drugs in schizophrenia and affective disorders, *Eur Arch Psych Clin Neurosci* 2013 Aug; 263(5): 367–377.
10. Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature* 2009 Feb; 457(7231): 910–914
11. Dereziński P, Klupeczynska A, Sawicki W, et al. Amino Acid Profiles of Serum and Urine in Search for Prostate Cancer Biomarkers: a Pilot Study. *Int J Med Sci* 2017; 14(1): 1–12.
12. Heger Z, Gumulec J, Cernei N, et al. Relation of exposure to amino acids involved in sarcosine metabolic pathway on behavior of non-tumor and malignant prostatic cell lines. *Prostate* 2016 May; 76(7): 679–690.

13. Jia J, Liu G, Li S, et al., inventors; SHANGHAI XUHUI DISTRICT CENT HOSPITAL (SHAN–Non–standard), assignee. Urine sample hepatitis B virus covalently dosed circular DNA sarcosine quantitative detection method, involves detecting quantitative rate of sarcosine solution, and calculating content of sarcosine in urine sample patent CN102662013–A CN102662013–A  
 5 12 Sep 2012 G01N–030/02 201309.

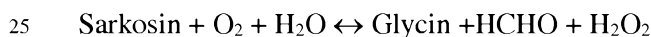
14. Wiewiorka O, Dastych M, Čermáková Z Trinderova reakce v klinické biochemii – přínosy a limity. Cem Listy 2017; 111(3): 186–191.

## 10 Podstata vynálezu

Výše uvedené přetrvávající nedostatky řeší reakční směs podle vynálezu pro snadné kvantitativní stanovení sarkosinu enzymatickou metodou s použitím 4–amino–2,3–dimethyl–1–fenyl–3–pyrazolin–5–onu (AAP) a sodné soli 3–(N–ethyl–3–methylanilin) propansulfonové kyseliny (TOPS), 3,3'–diaminobenzidinu nebo o–fenylendiaminu. Použitím těchto činidel vznikne stabilní  
 15 směs s velmi dobrou citlivostí k identifikaci sarkosinu jak při použití běžných fotometrů, tak plně automatizovaných systémů.

Reakční směs pro kvantitativní stanovení sarkosinu ve vzorku lidské moči, séra nebo plazmy in vitro s použitím 4–amino–2,3–dimethyl–1–fenyl–3–pyrazolin–5–onu u (AAP) a sodné soli 3–(N–ethyl–3–methylanilin)propansulfonové kyseliny (TOPS) využívá následující enzymatické reakce:

Sarkosinoxidáza



Peroxidáza



Tuto reakční směs tvoří reakční činidlo R1 a reakční činidlo R2 v objemových poměrech 9:36:55. Reakční činidlo R1 pro tuto enzymatickou reakci obsahuje sarkosin o koncentraci 10 až 100 μM, chlorid sodný v koncentraci 100 až 200 mM, chlorid draselný v koncentraci 30 až 80 mM, fosforečnan sodný v koncentraci 10 až 50 mM, močovinu v koncentraci 200 až 500 mM, kreatinin v koncentraci 10 až 25 mM, bovinní sérový albumin v koncentraci 600 až 800 μM.  
 35 Reakční činidlo R2 obsahuje sarkosin oxidázu o aktivitě 2 až 10 kU/l, peroxidázu o aktivitě 10 až 100 kU/l, 4–amino–2,3–dimethyl–1–fenyl–3–pyrazolin–5–on (AAP) v koncentraci 0,1 až 2,0 mM, fenol v koncentraci 1 až 5 mM a sodnou sůl 3–(N–ethyl–3–methylanilin)propansulfonové kyseliny (TOPS) v koncentraci 0,1 až 2,0 mM. Zvýšení absorpance produktu chinoniminu fialového zbarvení v poslední reakci při λ=546 nm měřitelné fotometrickou metodou je přímo úměrné koncentraci sarkosinu ve vzorku (Obr. 1 a Obr. 4). Stanovení je lineární v rozmezí koncentrací 1 až 1000 μM.

Jednotka sarkosin oxidázy (1 U) je definována jako produkující 1,0 μmol formaldehydu ze sarkosinu za minutu při pH 8,3 a 37 °C. Jednotka peroxidázy (1 U) odpovídá množství enzymu, který zoxiduje 1 μmol diamonné soli 2,2'–azino–bis(3–ethylbenzothiazolin–6–sulfonové kyseliny) za minutu při pH 6,0 a 25 °C (dle katalogu chemikálií Sigma–Aldrich).

Předmětem vynálezu je také diagnostická souprava pro kvalitativní a kvantitativní stanovení sarkosinu ve vzorku lidské moči, séra nebo plazmy in vitro. Souprava obsahuje reakční činidlo R1, které tvoří chlorid sodný v koncentraci 100 až 200 mM, chlorid draselný v koncentraci 30 až 80 mM, fosforečnan sodný v koncentraci 10 až 50 mM, močovina v koncentraci 200 až 500 mM, kreatinin v koncentraci 10 až 25 mM, bovinní sérový albumin v koncentraci 600 až 800 μM a sarkosin v koncentraci 10 až 100 μM, reakční činidlo R2, které tvoří sarkosin oxidáza o aktivitě 2  
 50

až 10 kU/l, peroxidáza o aktivitě 10 až 100 kU/l, 4-amino-2,3-dimethyl-1-fenyl-3-pyrazolin-5-on (AAP) v koncentraci 0,1 až 2,0 mM, fenol v koncentraci 1 až 5 mM a sodná sůl 3-(N-ethyl-3-methylanilin)propansulfonové kyseliny (TOPS) v koncentraci 0,1 až 2,0 mM. Součástí diagnostické soupravy je také kalibrační roztok standardu sarkosinu o koncentraci 10 µM.

5

Reakční činidlo R2 v reakční směsi pro kvantitativní stanovení sarkosinu, kterou tvoří reakční činidlo R1 a reakční činidlo R2 v objemových poměrech a se složením reakčního činidla R1, jak je uvedeno výše, může mít také následující složení: peroxidáza o aktivitě 10 až 100 kU/l, sarkosin oxidáza o aktivitě 2 až 10 kU/l, fenol o koncentraci 1 až 5 mM a 3,3'-diaminobenzidin v koncentraci 1 až 10 mM.

10

Předmětem vynálezu je dále příslušná diagnostická souprava pro kvalitativní a kvantitativní stanovení sarkosinu ve vzorku lidské moči, séra nebo plazmy in vitro. Souprava obsahuje reakční činidlo R1, které tvoří chlorid sodný v koncentraci 100 až 200 mM, chlorid draselný v koncentraci 30 až 80 mM, fosforečnan sodný v koncentraci 10 až 50 mM, močovina v koncentraci 200 až 500 mM, kreatinin v koncentraci 10 až 25 mM, bovinní sérový albumin v koncentraci 600 až 800 µM a sarkosin v koncentraci 10 až 100 µM, reakční činidlo R2, které tvoří peroxidáza o aktivitě 10 až 100 kU/l, sarkosin oxidáza o aktivitě 2 až 10 kU/l, fenol o koncentraci 1 až 5 mM a 3,3'-diaminobenzidin v koncentraci 1 až 10 mM. Součástí diagnostické soupravy je také kalibrační roztok standardu sarkosinu o koncentraci 10 µM.

15

20

Reakční činidlo R2 v reakční směsi pro kvantitativní stanovení sarkosinu, kterou tvoří reakční činidlo R1 a reakční činidlo R2 v objemových poměrech a se složením reakčního činidla R1, jak je uvedeno výše, může mít i následující složení: peroxidáza o aktivitě 10 až 100 kU/l, sarkosin oxidáza o aktivitě 2 až 10 kU/l, fenol o koncentraci 1 až 5 mM a o-fenylendiamin v koncentraci 5 až 20 mM.

25

Předmětem vynálezu je i příslušná diagnostická souprava pro kvalitativní a kvantitativní stanovení sarkosinu ve vzorku lidské moči, séra nebo plazmy in vitro. Souprava obsahuje reakční činidlo R1, které tvoří chlorid sodný v koncentraci 100 až 200 mM, chlorid draselný v koncentraci 30 až 80 mM, fosforečnan sodný v koncentraci 10 až 50 mM, močovina v koncentraci 200 až 500 mM, kreatinin v koncentraci 10 až 25 mM, bovinní sérový albumin v koncentraci 600 až 800 µM a sarkosin v koncentraci 10 až 100 µM, reakční činidlo R2, které tvoří peroxidáza o aktivitě 10 až 100 kU/l, sarkosin oxidáza o aktivitě 2 až 10 kU/l, fenol o koncentraci 1 až 5 mM a o-fenylendiamin v koncentraci 5 až 20 mM. Součástí diagnostické soupravy je také kalibrační roztok standardu sarkosinu o koncentraci 10 µM.

30

35

Reakční směsi jsou vhodné pro kvalitativní stanovení sarkosinu díky výslednému zbarvení reakce, ale především pro kvantitativní stanovení ve vzorku lidského séra, plazmy nebo moči v koncentračním rozmezí 0 až 1000 µM. Rozmezí hodnot sarkosinu u zdravého člověka v moči je 0 až 1 µM, v plazmě je rozmezí hodnot 0 až 5 µM. Předpokládá se, že každá laboratoř si stanoví své vlastní referenční rozmezí.

40

Reakční směsi podle vynálezu pro kvalitativní a kvantitativní enzymatické stanovení ve vzorku lidské moči, séra nebo plazmy umožňují snadnou a rychlou detekci sarkosinu v biologickém vzorku v laboratořích klinické biochemie prostřednictvím automatizovaných fotometrických systémů.

45

## 50 Objasnění výkresů

Obr. 1: Kvalitativní test přítomnosti sarkosinu ve vzorku (biologický vzorek, degradační produkt apod.) za využití kterékoli enzymatické reakční směsi podle vynálezu. V reakci dochází ke

vzniku intenzivního zabarvení roztoku podle přítomného barevného produktu reakce, a) sarkosin negativní; b) sarkosin pozitivní

Obr. 2: Kvantitativní stanovení sarkosinu v pufovaném prostředí (0,2 M fosfátový pufr pH 7,0) za využití enzymatické reakční směsi dle příkladu 1 v automatizovaném fotometrickém systému. (A) Typické spektrum je ukázáno v insertu obrázku s maximem při 546 nm. Reakční kinetická křivka ukazuje strmou, časově závislou reakci (pro vlastní test je potřeba 10 až 15 min.). Při použití odečtu při 510 nm je citlivost metody o 25 % snížena. (B) Kalibrační závislost je striktně lineární ( $R^2 = 0,9994$ ), LOQ = 25  $\mu\text{M}$ , LOD = 5  $\mu\text{M}$ , relativní chyba stanovení pod 2 %,  $n = 30$ . R1:chlorid sodný v koncentraci 130mM, chlorid draselný 60mM, fosforečnan sodný 30mM, močovina 300mM, kreatinin 20mM, bovinní sérový albumin 750  $\mu\text{M}$ , sarkosin 100  $\mu\text{M}$ . R2: peroxidáza o aktivitě 20 kU/l, sarkosin oxidáza o aktivitě 4 kU/l, 4-amino-2,3-dimethyl-1-fenyl-3-pyrazolin-5-on o koncentraci 0,5 mM, sodnou sůl 3-(N-ethyl-3-methylanilin)propanesulfonové kyseliny v koncentraci 0,5 mM a fenol o koncentraci 2 mM.

Obr. 3: Kvantitativní stanovení sarkosinu v prostředí umělé moči (chlorid sodný v koncentraci 130mM, chlorid draselný v koncentraci 60mM, fosforečnan sodný v koncentraci 30 mM, močovina v koncentraci 300 mM, kreatinin v koncentraci 20 mM, bovinní sérový albumin v koncentraci 750  $\mu\text{M}$ , sarkosin v koncentraci 10 až 100  $\mu\text{M}$ ) za využití enzymatické reakční směsi v automatizovaném fotometrickém systému. (A) Typické spektrum je ukázáno v insertu obrázku s maximem při 546 nm. Reakční kinetická křivka ukazuje strmou, časově závislou reakci (pro vlastní test je potřeba 10 až 15 min). (B) Kalibrační závislost je striktně lineární v celém testovaném rozsahu (0 až 1 000  $\mu\text{M}$ ;  $R^2 = 0,9997$ ), LOQ 15  $\mu\text{M}$ , LOD 5  $\mu\text{M}$  a v rozsahu nízkých koncentrací (0 až 10  $\mu\text{M}$ ,  $R^2 = 0,9873$ ), LOQ = 2  $\mu\text{M}$ , LOD = 0,5  $\mu\text{M}$ , relativní chyba stanovení pod 2%,  $n = 30$ . V případech A, B, C a) byl standardní přídavek sarkosinu 100  $\mu\text{M}$ . Obrázek C b) znázorňuje kalibrační závislost v nízkých koncentracích (0 až 10  $\mu\text{M}$ ,  $R^2=0,972$ ), LOQ = 35  $\mu\text{M}$ , LOD = 10  $\mu\text{M}$ , při standardním přídavku sarkosinu 10  $\mu\text{M}$ .

Obr. 4: Kvantitativní stanovení sarkosinu v prostředí reálného vzorku moči (hustota moči 1,0112, pH 7,1) za využití enzymatické reakční směsi dle příkladu 2 v automatizovaném fotometrickém systému. (A). Typické spektrum je ukázáno v insertu obrázku s maximem při 546 nm. Reakční kinetická křivka ukazuje strmou, časově závislou reakci (pro vlastní test je potřeba 10 až 20 min). (B) Kalibrační závislost je striktně lineární v celém testovaném rozsahu (0 až 1 000  $\mu\text{M}$ ;  $R^2 = 0,9979$ ), LOQ 50  $\mu\text{M}$ , LOD 15  $\mu\text{M}$ . (C a)). V rozsahu nízkých koncentrací (0 až 10  $\mu\text{M}$ ,  $R^2 = 0,9873$ ), LOQ = 2  $\mu\text{M}$ , LOD = 0,5  $\mu\text{M}$ , relativní chyba stanovení pod 2%,  $n = 30$ . (C b)). Metoda je využitelná pro stanovení sarkosinu i při odečtu 510 nm (0 až 10  $\mu\text{M}$ ,  $R^2 = 0,9824$ ), LOQ = 2  $\mu\text{M}$ , LOD = 0,8  $\mu\text{M}$ , relativní chyba stanovení pod 5 %,  $n = 30$ .

Obr. 5: Kvantitativní stanovení sarkosinu v prostředí krevní plazmy (koncentrace bílkoviny 75 g/l, pH 7.1) za využití enzymatické reakční směsi dle příkladu 3 v automatizovaném fotometrickém systému. (A) Typické spektrum je ukázáno v insertu obrázku s maximem při 546 nm. Reakční kinetická křivka ukazuje strmou, časově závislou reakci (pro vlastní test je potřeba 10 až 20 min). (B) Kalibrační závislost je striktně lineární v celém testovaném rozsahu (0 až 1000  $\mu\text{M}$ ;  $R^2 = 0,9933$ ), LOQ 85  $\mu\text{M}$ , LOD 25  $\mu\text{M}$ . (C a)) V rozsahu nízkých koncentrací (0 až 10  $\mu\text{M}$ ,  $R^2 = 0,987$ ), LOQ = 2  $\mu\text{M}$ , LOD = 0,5  $\mu\text{M}$ , relativní chyba stanovení pod 2 %,  $n = 30$ . Obrázek C b) znázorňuje hladiny sarkosinu v krevní plasmě u 7 vzorků (0,8 až 3,4  $\mu\text{M}$ ).

Příklady uskutečnění vynálezu

## Příklad 1:

5

Kvantitativní stanovení sarkosinu ve vzorku lidského séra enzymatickou metodou s použitím barviv 4-amino-2,3-dimethyl-1-fenyl-3-pyrazolin-5-onu (AAP) a sodné soli 3-(N-ethyl-3-methylanilin)propansulfonové kyseliny (TOPS).

10

Ke stanovení se použila diagnostická souprava obsahující kalibrační roztok standardu sarkosinu o koncentraci 10  $\mu\text{M}$ , činidlo R1 a R2 s níže uvedeným složením a koncentrací jednotlivých složek:

| R 1 |                        |                       |
|-----|------------------------|-----------------------|
|     | Chlorid sodný          | 100-200 mM            |
|     | Chlorid draselný       | 30-80 mM              |
|     | Fosforečnan sodný      | 10-50 mM              |
|     | Močovina               | 200-500 mM            |
|     | Kreatinin              | 10-25 mM              |
|     | Bovinní sérový albumin | 600-800 $\mu\text{M}$ |
|     | Sarkosin               | 10-100 $\mu\text{M}$  |

| R 2 |                  |             |
|-----|------------------|-------------|
|     | Sarkosin oxidáza | 2-10 kU/l   |
|     | Peroxidáza       | 10-100 kU/l |
|     | AAP              | 0,1-2,0mM   |
|     | TOPS             | 0,1-2,0mM   |
|     | Fenol            | 1-5 mM      |

15

Ke stanovení množství sarkosinu se použil vzorek lidského séra s trvanlivostí až 7 dní při 2 až 8 °C nebo 3 měsíce při -20 °C nebo vzorek moči s trvanlivostí při 4 až 8 °C 5 dní. Je možné použít též vzorek lidské plazmy, která má stejnou trvanlivost jako sérum. Plná krev a hemolytické vzorky se však nedoporučují zpracovávat touto metodou. Současně se s přípravou vzorku ke stanovení sarkosinu připravil i slepý vzorek (blank). Pro stanovení sarkosinu v séru se jako blank používá fosfátový pufr o koncentraci 0,2 M a pH 7,0.

20

K 180  $\mu\text{l}$  výše uvedeného činidla R1 v plastové kyvetě se napipetovalo 45  $\mu\text{l}$  vzorku lidského séra a v případě blanku 45  $\mu\text{l}$  fosfátového pufru o koncentraci 0,2 M a pH 7,0. Směs činidla R1 a vzorku se promíchala a inkubovala 1 až 5 minut při 37 °C. Následně se přidalo k této směsi 275  $\mu\text{l}$  činidla R2. Výsledná směs se promíchala a inkubovala 21 minut při 37 °C. Fotometrickou metodou se měřila absorbance vzniklého produktu chinoniminu fialového zbarvení ve vzorku a blanku při 546 nm (Obr. 2A). Získaná hodnota rozdílu absorbance  $\Delta A = [\Delta A \text{ vzorku}] - [\Delta A \text{ blanku}]$  byla přímo úměrná množství sarkosinu ve vzorku séra, moči dle odečtu pomocí kalibrační křivky (Obr. 2B).

30

## Příklad 2:

Kvantitativní stanovení sarkosinu ve vzorku lidské moči enzymatickou metodou s použitím barviva 3,3'-diaminobenzidín

Ke stanovení se použila diagnostická souprava obsahující kalibrační roztok standardu sarkosinu o koncentraci 10  $\mu\text{M}$ , činidlo R1 a R2 s níže uvedeným složením a koncentrací jednotlivých složek:

| R 1 |                        |                       |
|-----|------------------------|-----------------------|
|     | Chlorid sodný          | 100-200 mM            |
|     | Chlorid draselný       | 30-80 mM              |
|     | Fosforečnan sodný      | 10-50 mM              |
|     | Močovina               | 200-500 mM            |
|     | Kreatinin              | 10-25 mM              |
|     | Bovinní sérový albumin | 600-800 $\mu\text{M}$ |
|     | Sarkosin               | 10-100 $\mu\text{M}$  |

| R 2 |                      |             |
|-----|----------------------|-------------|
|     | Sarkosin oxidáza     | 2-10 kU/l   |
|     | Peroxidáza           | 10-100 kU/l |
|     | Fenol                | 1-5 mM      |
|     | 3,3'-diaminobenzidín | 1-10 mM     |

Ke stanovení množství sarkosinu se použil vzorek lidské moči s trvanlivostí při 4 až 8  $^{\circ}\text{C}$  5 dní. Současně se s přípravou vzorku ke stanovení sarkosinu připravil i slepý vzorek (blank).

Pro stanovení sarkosinu v moči se jako blank použila umělé moč, kterou tvoří chlorid sodný v koncentraci 100 až 200 mM, chlorid draselný v koncentraci 30 až 80 mM, fosforečnan sodný v koncentraci 10 až 50 mM, močovina v koncentraci 200 až 500 mM, kreatinin v koncentraci 10 až 25 mM a boviní sérový albumin v koncentraci 600 až 800  $\mu\text{M}$ .

K 180  $\mu\text{l}$  výše uvedeného činidla R1 v plastové kyvetě se napipetovalo 45  $\mu\text{l}$  vzorku lidského séra a v případě blanku 45  $\mu\text{l}$  umělé moči. Směs činidla R1 a vzorku se promíchala a inkubovala 1 až 5 minut při 37  $^{\circ}\text{C}$ . Následně se přidalo k této směsi 275  $\mu\text{l}$  činidla R2. Výsledná směs se promíchala a inkubovala 21 minut při 37  $^{\circ}\text{C}$ . Fotometrickou metodou se měřila absorbance vzniklého produktu chinoniminu fialového zbarvení ve vzorku a blanku při 546 nm (Obr. 4A). Získaná hodnota rozdílu absorbance  $\Delta A = [\Delta A \text{ vzorku}] - [\Delta A \text{ blanku}]$  byla přímo úměrná množství sarkosinu ve vzorku séra, moči dle odečtu pomocí kalibrační křivky (Obr. 4B).

## Příklad 3

Kvantitativní stanovení sarkosinu ve vzorku lidské plazmy enzymatickou metodou s použitím barviva o-fenylendiamin

Ke stanovení se použila diagnostická souprava obsahující kalibrační roztok standardu sarkosinu o koncentraci 10  $\mu\text{M}$ , činidlo R1 a R2 s níže uvedeným složením a koncentrací jednotlivých složek:

| R 1 |                        |                       |
|-----|------------------------|-----------------------|
|     | Chlorid sodný          | 100-200 mM            |
|     | Chlorid draselný       | 30-80 mM              |
|     | Fosforečnan sodný      | 10-50 mM              |
|     | Močovina               | 200-500 mM            |
|     | Kreatinin              | 10-25 mM              |
|     | Bovinní sérový albumin | 600-800 $\mu\text{M}$ |
|     | Sarkosin               | 10-100 $\mu\text{M}$  |

| R 2 |                  |             |
|-----|------------------|-------------|
|     | Sarkosin oxidáza | 2-10 KU/l   |
|     | Peroxidáza       | 10-100 KU/l |
|     | Fenol            | 1-5 mM      |
|     | o-fenylendiamin  | 5-20 mM     |

5

Ke stanovení množství sarkosinu se použil vzorek lidské plazmy s trvanlivostí až 7 dní při 2 až 8 °C nebo 3 měsíce při -20 °C. Plná krev a hemolytické vzorky se nedoporučují zpracovávat touto metodou. Současně se s přípravou vzorku ke stanovení sarkosinu připravil i slepý vzorek (blank). Pro stanovení sarkosinu v plazmě se jako blank používá fosfátový pufr o koncentraci 0,2 M a pH 7,0.

10

K 180  $\mu\text{l}$  výše uvedeného činidla R1 v plastové kyvetě se napipetovalo 45  $\mu\text{l}$  vzorku lidského séra a v případě blanku 45  $\mu\text{l}$  fosfátového pufru o koncentraci 0,2M a pH 7,0. Směs činidla R1 a vzorku se promíchala a inkubovala 1 až 5 minut při 37 °C. Následně se přidalo k této směsi 275  $\mu\text{l}$  činidla R2. Výsledná směs se promíchala a inkubovala 21 minut při 37 °C. Fotometrickou metodou se měřila absorbance vzniklého produktu chinoniminu fialového zbarvení ve vzorku a blanku při 546 nm (Obr. 5A). Získaná hodnota rozdílu absorbance  $\Delta A = [\Delta A \text{ vzorku}] - [\Delta A \text{ blanku}]$  byla přímo úměrná množství sarkosinu ve vzorku séra, moči dle odečtu pomocí kalibrační křivky (Obr. 5B).

15

20

#### Průmyslová využitelnost

25

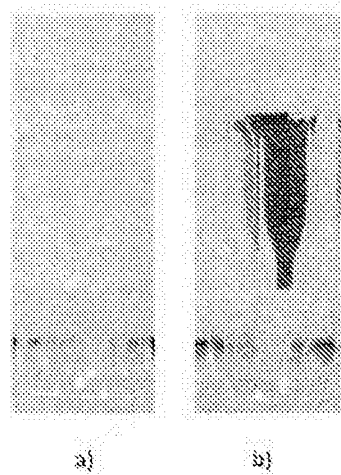
Stabilní a citlivá reakční směs podle technického řešení umožňuje snadné, rychlé a finančně nenáročné enzymatické stanovení množství sarkosinu ve vzorku lidské moče, séra či plazmy v běžném fotometru nebo plně automatizovaném fotometrickém systému. Stanovení sarkosinu a jeho množství usnadňuje jeho detekci obecně jako markerové molekuly pro diagnostiku a další aplikace v klinické biochemii.

30

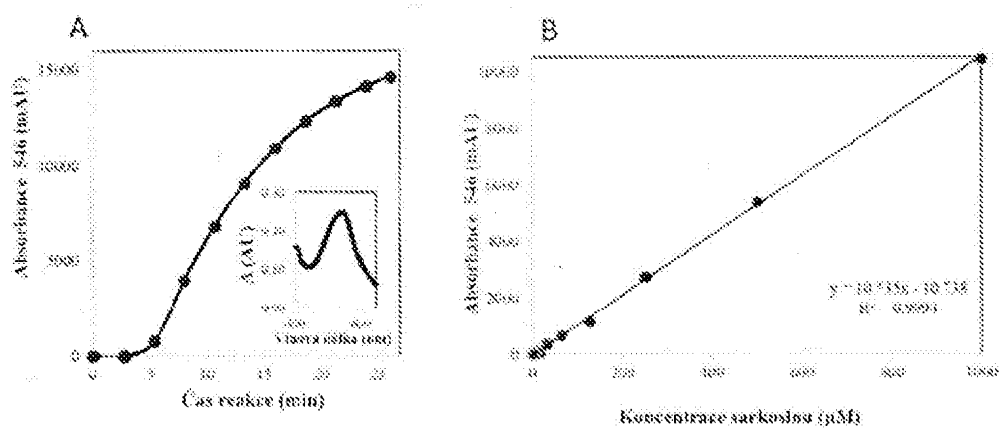
#### **PATENTOVÉ NÁROKY**

1. Reakční směs pro kvantitativní stanovení sarkosinu ve vzorku lidské moči, séra nebo plazmy fotometrickou metodou in vitro, **vyznačující se tím**, že jej tvoří reakční činidlo R1 a reakční činidlo R2 v objemových poměrech 9:36:55, přičemž reakční činidlo R1 obsahuje chlorid sodný v koncentraci 100 až 200 mM, chlorid draselný v koncentraci 30 až 80 mM, fosforečnan sodný v koncentraci 10 až 50 mM, močovinu v koncentraci 200 až 500 mM, kreatinin v koncentraci 10 až 25 mM, bovinní sérový albumin v koncentraci 600 až 800 µM a sarkosin v koncentraci 10 až 100 µM a reakční činidlo R2 obsahuje peroxidázu o aktivitě 10 až 100 KU/l, sarkosin oxidázu o aktivitě 2 až 10 KU/l, 4-amino-2,3-dimethyl-1-fenyl-3-pyrazolin-5-on o koncentraci 0,1 až 2,0 mM, sodnou sůl 3-(N-ethyl-3-methylanilin)propanesulfonové kyseliny v koncentraci 0,1 až 2,0 mM a fenol o koncentraci 1 až 5 mM.
2. Reakční směs podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že reakční činidlo R2 obsahuje peroxidázu o aktivitě 10 až 100 KU/l, sarkosin oxidázu o aktivitě 2 až 10 KU/l, fenol o koncentraci 1 až 5 mM a 3,3'-diaminobenzidin v koncentraci 1 až 10 mM.
3. Reakční směs podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že reakční činidlo R2 obsahuje peroxidázu o aktivitě 10 až 100 KU/l, sarkosin oxidázu o aktivitě 2 až 10 KU/l, fenol o koncentraci 1 až 5 mM a o-fenylendiamin v koncentraci 5 až 20 mM.
4. Diagnostická souprava pro kvantitativní stanovení sarkosinu ve vzorku lidské moči, séra nebo plazmy fotometrickou metodou in vitro, **vyznačující se tím**, že obsahuje reakční činidlo R1, které tvoří chlorid sodný v koncentraci 100 až 200 mM, chlorid draselný v koncentraci 30 až 80 mM, fosforečnan sodný v koncentraci 10 až 50 mM, močovina v koncentraci 200 až 500 mM, kreatinin v koncentraci 10 až 25 mM, bovinní sérový albumin v koncentraci 600 až 800 µM, sarkosin v koncentraci 10 až 100 µM, reakční činidlo R2, které tvoří peroxidázu o aktivitě 10 až 100 KU/l, sarkosin oxidázu o aktivitě 2 až 10 KU/l, 4-amino-2,3-dimethyl-1-fenyl-3-pyrazolin-5-on v koncentraci 0,1 až 2,0 mM, sodná sůl 3-(N-ethyl-3-ethylanilin)propanesulfonové kyseliny v koncentraci 0,1 až 2,0 mM, fenol o koncentraci 1 až 5 mM a kalibrační roztok standardu sarkosinu o koncentraci 10 µM.
5. Diagnostická souprava podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že reakční činidlo R2 obsahuje peroxidázu o aktivitě 10 až 100 KU/l, sarkosin oxidázu o aktivitě 2 až 10 KU/l, fenol o koncentraci 1 až 5 mM a 3,3'-diaminobenzidin v koncentraci 1 až 10 mM.
6. Diagnostická souprava podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že reakční činidlo R2 obsahuje peroxidázu o aktivitě 10 až 100 KU/l, sarkosin oxidázu o aktivitě 2 až 10 KU/l, fenol o koncentraci 1 až 5 mM a o-fenylendiamin v koncentraci 5 až 20 mM.

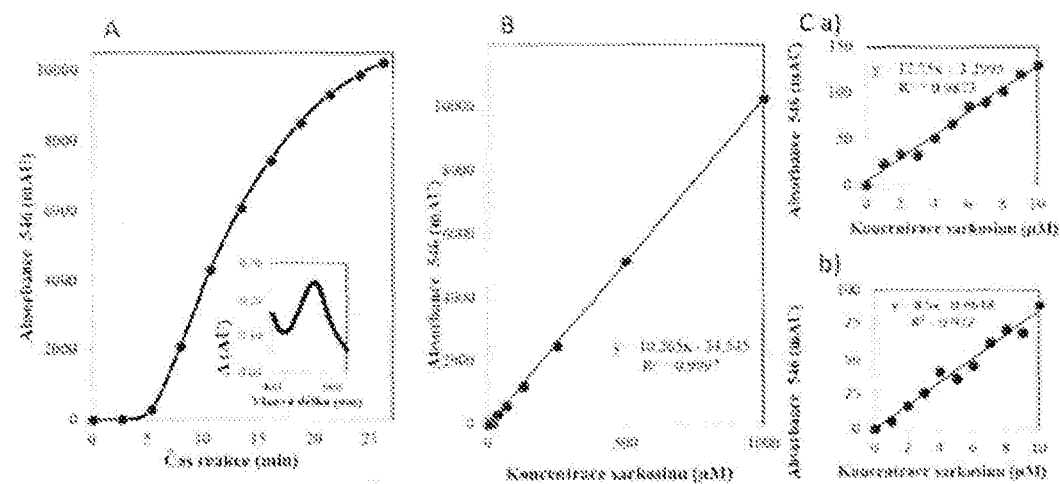
3 výkresy



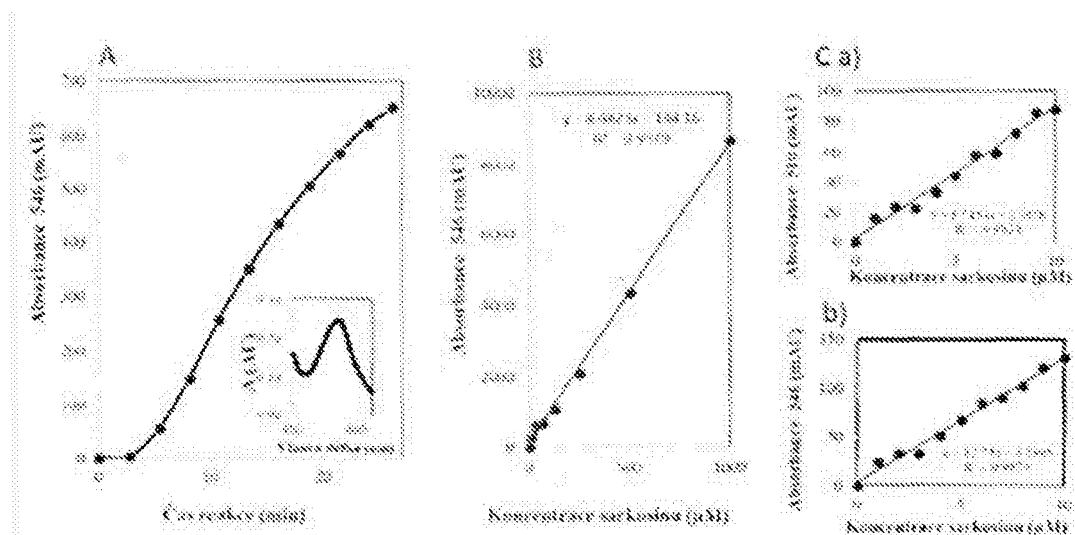
Obr. 1



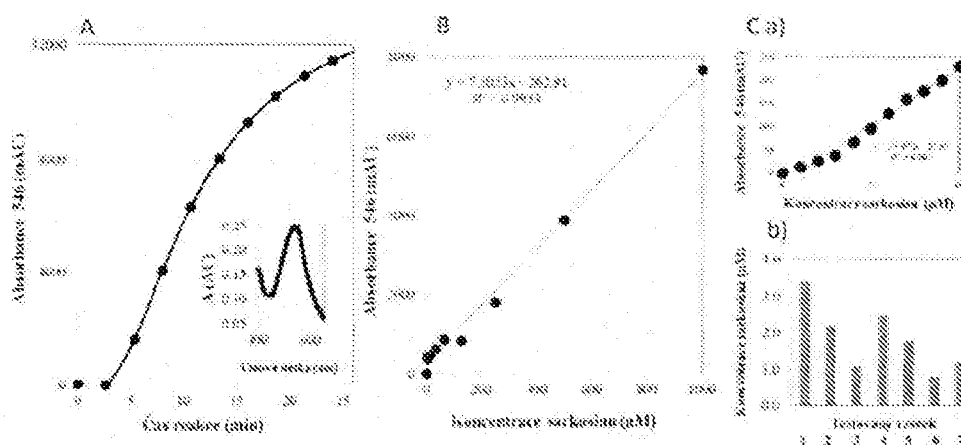
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5