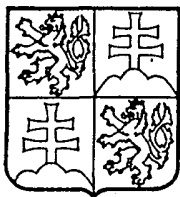


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

269 877

(21) PV 4695 - 87. M

(22) Přihlášeno 24 06 87.

(40) Zveřejněno 13 10 89

(45) Vydáno 18 02 91

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl. 4
G 01 N 33/22

(75) Autor vynálezu

CHROMÝ VRATISLAV ing. CSc.,
FISCHER JIŘÍ RNDr., BRNO

(54)

Vodný kalibrační roztok pro stanovení cholesterolu.

(57)

Vodný kalibrační roztok pro stanovení cholesterolu sestává z roztoku obsahujícího v 1 000 ml 0,387 g až 3,867 g cholesterolu, 120 až 250 g s vodou mísitelného organického rozpouštědla o celkovém počtu 2 až 3 atomů uhlíku, 50 až 150 g nonylfenolpolyethylenglykoletheru o celkovém počtu 4 až 12 ethylenglykolových skupin a 0,01 g až 0,3 g propyl-3,4,5-trihydroxybenzoátu. Vodný kalibrační roztok cholesterolu obsahuje látky, které svým synergickým účinkem umožňují solubilizaci cholesterolu, stabilizaci ve vodném mediu a ochranu před spontánní oxidací a bakteriální kontaminací.

Předmět vynálezu je vhodný kalibrační roztok pro stanovení cholesterolu.

Stanovení obsahu cholesterolu v séru je jednou ze základních analytických metod, používaných v klinické chemii, protože jeho zvýšený obsah související s poruchami metabolismu lipidů je považován za rizikový faktor pro kardiovaskulární onemocnění.

Cholesterol je v biologických kapalinách přítomen buď volný, nebo ve formě esterů. Při jeho stanovení se analyzuje nejčastěji jeho celkový obsah. Stanovení esterů cholesterolu nebo jeho dalších forem vázaných na lipoproteiny různé hustoty je obvykle prováděno jako doplňkové, specializované vyšetření, pokud je celkový cholesterol výrazněji zvýšen.

Z řady různých metod stanovení cholesterolu v séru jsou v poslední době užívány zejména dvě. Chemické stanovení v bezvodém prostředí **vytvářeném kyselinou sírovou, octovou a jejím anhydridem, nebo chloroformem nebo dichlorethanem, nebo dalšími nevodnými systémy**, určuje celkový obsah cholesterolu. Přítomnost agresivních chemikálií tyto metody předem vylučuje z použití v automatizovaných systémech analýs pomocí automatických analyzátorů různých typů. Enzymové stanovení využívá nejčastěji dva základní a pro cholesterol specifické enzymy, cholesterol esterasu katalysující hydrolysu esterů cholesterolu a cholesterol oxidasu katalysující oxidaci volného cholesterolu na cholestanon a peroxid vodíku. Těmito reakčními sekvencemi vzniklý peroxid vodíku, který je úměrný obsahu celkového cholesterolu ve vzorku, se využívá k fotometrickému stanovení po přímé oxidaci vhodných chromogenů nebo lekbází nebo **k oxidační kopulaci. Obě reakce** jsou katalysovány enzymem peroxidasou.

Pro všechny metody stanovení cholesterolu v séru jsou nezbytné kalibrační roztoky se známým množstvím cholesterolu připravené jeho rozpouštěním ve vhodném médiu. Cholesterol a většina jeho esterů jsou látky ve vodě prakticky nerozpustné. Proto byly pro chemické metody užívány kalibrační roztoky cholesterolu v nevhodných rozpouštědlech jako jsou například kyselina octová, chloroform a etanol, které se ale svým chováním značně liší od biologických kapalin. Rozdílná viskozita způsobuje změny objemů při pipetování. Pro enzymové metody stanovení cholesterolu jsou **nevodné kalibrační roztoky zcela nevhodné, protože způsobují inaktivaci nebo dokonce denaturaci enzymů.**

Z uvedených důvodů byly činěny pokusy připravit ve vodě lépe rozpustné deriváty cholesterolu a byly popsány kalibrační roztoky založené na cholesterolhemidipátu nebo hemisukcinátu. Ani jejich rozpustnost ve vodě není dostatečná a ke zlepšení solubilizace se přidává polyethylenglykol nebo některé neionogenní tensidy. Tyto vodné roztoky lze sice užít pro kalibraci pro chemické metody analýsy cholesterolu, ale jsou nevhodné pro enzymové metody, protože enzymové štěpení hemiesterů cholesterolu neprobíhá buď vůbec, nebo s jiným výtěžkem, než v biologických kapalinách obsahujících jiné formy esterů cholesterolu. **Vodný roztok cholesterolu vhodný pro oba uvedené typy analytických metod lze připravit například přímým rozpouštěním cholesterolu v desoxycholátu sodném, který je fyziologickým emulgátorem. Příprava vodného roztoku cholesterolu ale vyžaduje až asi 15 hmot. procent desoxycholátu sodného a je proto značně nákladná. Společnou nevýhodou všech vodných roztoků cholesterolu je nebezpečí jeho oxidace a s tím spojené chyby při analýze biologických kapalin, vyvolané užitím nestálých kalibračních roztoků. Nebezpečí oxidace cholesterolu v jeho vodných roztocích se ještě dále zvyšuje pokud jsou ke zlepšení rozpustnosti užívány tensidy, které téměř vždy obsahují jako nečistoty organické peroxidy. Organické peroxidy, a obecně všechny látky oxidačního charakteru, interferují při enzymovém stanovení cholesterolu, které je založeno na peroxidu vodíku, vznikajícím jeho enzymovou přeměnou. Přítomnost peroxidů v kalibračním roztoku zvyšuje jeho absorpenci, a tím současně zdánlivě snižuje obsah cholesterolu v biolo-**

gickém vzorku. Je tedy žádoucí připravit stábilní vodný kalibrační roztok cholesterolu jednoduchým postupem z levných a dostupných surovin, který by byl použitelný jak pro chemické, tak i pro enzymové metody a neměl by uvedené nevýhody.

K odstranění uvedených nedostatků směřuje vodný kalibrační roztok pro stanovení cholesterolu. Jeho podstata spočívá v tom, že obsahuje v 1 000 ml roztoku 0,387 g až 3,867 g cholesterolu, 120 až 250 g s vodou mísitelného organického rozpouštědla o celkovém počtu 2 až 3 atomů uhlíku, například ethanolu, 1-propanolu, 2-propanolu nebo acetonu, 50 až 150 g nonylfenolpolyethylenglykoetheru o celkovém počtu 4 až 12 ethylenglykolových skupin a 0,01 g až 0,3 g propyl-3,4,5-trihydroxybenzoátu.

Vodný kalibrační roztok pro stanovení cholesterolu podle vynálezu se svým složením blíží chování vodného roztoku a, jak bylo ověřeno, je vhodný jak pro kalibraci chemických metod stanovení cholesterolu, tak i pro enzymové analytické postupy.

Vodný kalibrační roztok cholesterolu podle vynálezu obsahuje látky, které svým synergickým účinkem umožňují jeho solubilizaci, stabilizaci ve vodném médiu a chrání jej současně před spontánní oxidací a bakteriální kontaminací.

Přítomnost specifického typu a množství organického s vodou mísitelného rozpouštědla zachovává převážně vodný charakter roztoku, usnadňuje přímé rozpouštění cholesterolu a v hotovém kalibračním roztoku působí současně jako konzervační prostředek proti bakteriální kontaminaci. Tím jsou současně eliminovány jiné typy jinak nezbytných konzervačních přísad, které v naprosté většině nejsou kompatibilní s enzymovými systémy užívanými pro analýzu cholesterolu. Neionogenní tenzid působí jako emulgátor a udržuje cholesterol v roztoku i při snížené teplotě. Propyl-3,4,5-trihydroxybenzoát působí jako specifický antioxidační prostředek. Jeho specifický účinek spočívá zejména v tom, že na rozdíl od ostatních běžných antioxidačních založených na použití látek s redukčními účinky, které interferují při vlastním enzymovém stanovení cholesterolu, tyto vlastnosti v uvedeném koncentračním rozmezí nemá. Vodný kalibrační roztok pro stanovení cholesterolu lze připravit jednoduchým postupem z levných a dostupných surovin. K osvětlení postupu přípravy jsou uvedeny následující příklady.

Příklad 1

V odměrné baňce na 1 000 ml se ve 120 g ethanolu rozpustí za zvýšené teploty 0,386 g cholesterolu s 50 g nonylfenolpolyethylenglykoetheru, přidá se 0,011 g propyl-3,4,5-trihydroxybenzoátu a po rozpuštění všech složek a vychlazení na 20° C se doplní destilovanou vodou po značku.

Příklad 2

V odměrné baňce na 1 000 ml se rozpustí 2,708 g cholesterolu ve směsi 200 g 2-propanolu a 120 g nonylfenolpolyethylenglykoetheru a 0,050 g propyl-3,4,5-trihydroxybenzoátu. Za míchání se doplní destilovanou vodou do 1 000 ml.

Příklad 3

V odměrné baňce na 1 000 ml se ve 250 g acetonu rozpustí 3,860 g cholesterolu, přidá se 150 g nonylfenolpolyethylenglykoetheru a 0,200 g propyl-3,4,5-trihydroxybenzoátu. Doplní se vodou na 1 000 ml.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Vodný kalibrační roztok pro stanovení cholesterolu, vyznačující se tím, že v 1 000 ml roztoku obsahuje 0,387 g až 3,867 g cholesterolu, 120 až 250 g s vodou mísitelného organického rozpouštědla o celkovém počtu 2 až 3 atomů uhlíku, například ethanolu, 1-propanolu, 2-propanolu nebo acetonu, 50 až 150 g nonylfenolpolyethylenglykoletheru o celkovém počtu 4 až 12 ethylenglykolových skupin a 0,01 g až 0,3 g propyl-3,4,5-trihydroxybenzoátu.