



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

263 028

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 09 07 87
(21) PV 5215-87.D

(51) Int. Cl.⁴

G 01 N 33/48

(40) Zveřejněno 16 08 88
(45) Vydáno 1.3.1990

(75)
Autor vynálezu

MALÝ MILAN RNDr.,
CHROMÝ VRATISLAV ing. CSc., BRNO

(54)

Stabilizované činidlo na stanovení katalytické
koncentrace alaninaminotransferasy

Předmětem řešení je stabilizované činidlo pro stanovení katalytické koncentrace alaninaminotransferasy a L-alaninu, laktátdehydrogenasou, albuminem a nikotinamidadenindinukleotidem, které obsahuje kyselinu citronovou a albumin v určitém poměru. Činidlo se používá při stanovení katalytické koncentrace v krevním séru nebo plazmě a vyniká oproti doposud používaným především vyšší stabilitou.

Vynález se týká stabilizovaného činidla ke stanovení katalytické koncentrace alaninaminotransferasy.

Stanovení katalytické koncentrace alaninaminotransferasy (L-alanin: 2-oxoglutarátaminotransferasa EC 2.6.1.2.) v krevním séru nebo plazmě je velmi rozšířenou analýzou, umožňující značné zpřesnění diferenciální diagnostiky jaterních a srdečních chorob. Stanovení katalytické koncentrace alaninaminotransferasy je jednou ze základních analýz prováděných v klinické biochemii.

Katalytická koncentrace L-alaninaminotransferasy se stále častěji určuje pomocí spřažených enzymových reakcí. V současné době se připraví činidlo na stanovení katalytické koncentrace alaninaminotransferasy tak, že se k pufru obsahujícímu L-alanin a pyridoxal-5-fosfát přidá indikátorový enzym laktátdehydrogenasa a jeho substrát nikotinamidadenindinukleotid. Tento roztok je stabilní v temnu při teplotě +4 °C 2 až 3 dny. Nízká stabilita zásobního roztoku je ekonomicky značně nevýhodná pro menší pracoviště a pro použití automatických analyzátorů, které pracují s velmi malými objemy pracovních činidel, a proto v tak krátké době nemohou zpracovat celý objem pracovních roztoků, které jsou připravovány z komerčně dostupných diagnostických souprav. Prodloužení stability připravovaných roztoků zmražením, které je velmi hojně užíváno, nelze v tomto případě použít, protože při zmražení dochází k poškození indikátorového enzymu laktátdehydrogenasy, a tím i k poklesu její katalytické aktivity. Stálost činidla pro stanovení katalytické koncentrace alaninaminotransferasy lze sice zvýšit přidavkem albuminu, který působí jako ochranné médium, ale jen asi na 5 až 6 dnů.

Stabilita zásobních roztoků může být několikanásobně prodloužena, přidají-li se do roztoku látky, které ochrání enzymy

před jejich poškozením a antioxidanty zamezující nežádoucí oxidaci nikotinamidadenindinukleotidu. Mnohé antioxidanty, jako je například propylgalát, ethylenglykol a kyselina askorbová, hojně užívané v potravinářství a farmacii, mají nepříznivý vliv na katalytickou koncentraci indikátorového enzymu, laktátdehydrogenasy. Proto je žádoucí nalézt takovou novou látku, která potlačí oxidaci nikotinamidadenindinukleotidu a zvýší tím použití činidla pro stanovení katalytické koncentrace ALT a zároveň nebude mít nepříznivý vliv na katalytickou koncentraci enzymů. Zmíněné nedostatky výrazně potlačuje stabilizované činidlo na stanovení katalytické koncentrace alaninaminotransferasy podle vynálezu. Jeho podstata spočívá v tom, že obsahuje $0,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ až $10,0 \mu\text{mol.l}^{-1}$ kyseliny citronové a $0,5$ až 10 g.l^{-1} albuminu.

Činidlo s kyselinou citronovou a albuminem má následující přednosti. Albumin v kombinaci s kyselinou citronovou zvyšuje, ve srovnání s činidlem stabilizovaným jen albuminem, stálost činidla pro stanovení katalytické koncentrace alaninaminotransferasy z původních 5 až 6 dnů až na 10 dnů. Jedná se tedy o specifický vyšší účinek albuminu a kyseliny citronové zejména na nikotinamidadenindinukleotid, projevující se prodloužením stálosti činidla pro katalytickou koncentraci alaninaminotransferasy až na dvojnásobek, ve srovnání s činidlem stabilizovaným samotným albuminem. Je třeba dodržet rozsah koncentrací albuminu a kyseliny citronové uvedený v definici vynálezu, neboť vyšší koncentrace kyseliny citronové negativně ovlivní stanovení katalytické koncentrace alaninaminotransferasy. Albumin a kyselina citronová jsou přitom kompatibilní s analytickými systémy nejčastěji užívanými pro stanovení katalytické koncentrace alaninaminotransferasy, na rozdíl od jiných ochranných systémů.

Uvedeným poměrně velmi jednoduchým způsobem lze podstatně zvýšit stálost pracovního roztoku pro stanovení katalytické koncentrace alaninaminotransferasy tak, aby byl použitelný po dobu nezbytnou a výhodnou pro různé typy zdravotnických laboratoří.

Příklad 1

263 028

K 1 litru pufru obsahujícímu 0,120 mol tris(hydroximethyl)-aminomethan a 0,480 mol l-alanin se přidá 0,5 μ mol kyseliny citronové. pH pufru je nastaveno na hodnotu 7,6. K pevné enzymové směsi obsahující 0,216 mmol nikotinamidadenindinukleotid a 36 μ kat laktátdehydrogenasa se přidá 10 g hovězího albuminu. Po smíchání obou komponent se získá stabilizované činidlo pro stanovení katalytické koncentrace alaninaminotransferasy. Činidlo je stále minimálně 10 dní.

Příklad 2

K enzymové směsi obsahující 0,216 mmol nikotinamidadenindinukleotid a 36 μ kat laktátdehydrogenasa se přidá 5 μ mol kyselina citronová a 0,5 g hovězího albuminu. Po smíchání enzymové směsi s 1 l pufru o složení 0,120 mol tris(hydroximethyl)-aminomethan a 0,480 mol L-alanin a 0,120 mmol pyridoxal-5-fosfát, jehož pH je nastaveno na hodnotu 7,6, se získá stabilizované činidlo pro stanovení katalytické koncentrace alaninaminotransferasy. Činidlo je stále minimálně 10 dní.

Příklad 3

K 1 ml stabilizovaného činidla na stanovení katalytické koncentrace alaninaminotransferasy obsahující 120 mmol.l⁻¹ tris(hydroximethyl)-aminomethan, 480 mmol.l⁻¹ l-alanin, 0,12 mmol.l⁻¹ pyridoxal-5-fosfát, 0,216 mmol.l⁻¹ nikotinamidadenindinukleotid, 36 μ kat.l⁻¹ laktátdehydrogenasa, 0,5 μ mol.l⁻¹ kyselina citronová a 10,0 g.l⁻¹ hovězího albuminu o pH 7,6 připraveného podle příkladu 1 se přidá 0,1 ml analyzovaného séra. Po desetiminutové preinkubaci při 30 °C je enzymová reakce nastartována přidavkem 0,1 mol kyseliny 2-oxoglutarové o koncentraci 165 mmol.l⁻¹. Zaznamenává se změna absorbance při 340 nm za časovou jednotku při teplotě 30 °C.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

283 028

Stabilizované činidlo na stanovení katalytické koncentrace aleninaminotransferasy s L-aleninem, laktátdehydrogenasou, albuminem a nikotinamidadenindinukleotidem vyznačující se tím, že obsahuje $0,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ až $10,0 \mu\text{mol.l}^{-1}$ kyseliny citronové a $0,5$ až 10 g.l^{-1} albuminu.