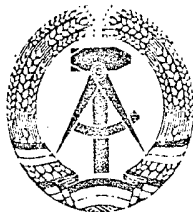


(19) DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT



Ausschliessungspatent

Erteilt gemäÙ § 5 Absatz 1 des Aenderungsgesetzes
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

1597 81

Int.Cl.³

3(51) C 12 N 9/16

C 12 Q 1/42

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veroeffentlicht

(21) AP C 12 N/ 2310 097
(31) P3023485.6

(22) 22.06.81
(32) 24.06.80

(44) 06.04.83
(33) DE

(71) siehe (73)
(72) VORMBROCK, ROLF,DR.;HELGER, ROLAND,DR.;DE;
(73) MERCK PATENT GMBH, DARMSTADT;DE;
(74) IPB (INTERNATIONALES PATENTBUERO BERLIN), 1020 BERLIN, WALLSTR. 23/24

(54) VERFAHREN UND MITTEL SOWIE DEREN VERWENDUNG ZUR STABILISIERUNG DER ALKALISCHEN
PHOSPHATASE

(57) Die Erfindung betrifft Verfahren und Mittel zur Stabilisierung der alkalischen Phosphatase in Pufferlösungen. Zu diesem Zweck wird der Pufferlösung ein wasserlöslicher Komplex aus Zinkionen und einem Chelatbildner zugesetzt.

Titel der Erfindung:

Verfahren und Mittel sowie deren Verwendung zur Stabilisierung der alkalischen Phosphatase

Anwendungsgebiet der Erfindung:

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren und Mittel sowie deren Verwendung zur Stabilisierung der alkalischen Phosphatase in Pufferlösungen, wie sie in der klinischen Chemie zur Bestimmung der Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase und ihrer Isoenzyme verwendet werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen:

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der alkalischen Phosphatase (EC 3.1.3.1) im Serum oder Plasma spielt eine wichtige Rolle in der klinischen Diagnostik. Diese Bestimmung wird in gepufferter wässriger Lösung durchgeführt, wobei der pH-Wert der Lösung über 8 liegen sollte. Als Puffer wurden zunächst Barbitonpuffer (pH 8,6), später Carbonat-Hydrogencarbonat-Puffer (pH 9,9) oder Glycin-Natronlauge-Puffer (pH 10,5) verwendet. Nachdem gefunden worden war, daß Aminoalkohole, die als Phosphorylakzeptoren fungieren können, in hoher Konzentration die enzymatische Aktivität der alkalischen Phosphatase erhöhen, wurden vor allem Diethanolamin und 2-Amino-2-methylpropanol-(1) als Puffersubstanzen für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der alkalischen Phosphatase in der klinischen Chemie eingesetzt. Diese Puffersubstanzen haben jedoch den Nachteil, daß sie Verunreinigungen enthalten können, die die alkalische Phosphatase inhibieren oder

inaktivieren. Im Falle des Diethanolamins handelt es sich um Ethanolamin, das durch aufwendige Rektifikation abgetrennt werden kann. Im Falle des 2-Amino-2-methylpropanol-(1) ist aus einer Reihe von Verunreinigungen ein substituiertes Ethylenderivat von zur Zeit noch nicht vollständig aufgeklärter Struktur als Inaktivator der alkalischen Phosphatase identifiziert worden [Clin.Chem. 24, 1611 (1978)].

Aus Clin. Chim. Acta 98, 61 (1979) ist bekannt, daß die Inaktivierung der alkalischen Phosphatase im 2-Amino-2-methylpropanol-(1)-Puffer vermieden werden kann, wenn dem Puffer Zinksalze zugesetzt werden. Dieses Verfahren hat jedoch den Nachteil, daß bei überoptimalen Konzentrationen an Zinkionen die alkalische Phosphatase dennoch inhibiert wird, so daß nur bei genauer Dosierung der Zinksalze eine maximale Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase gewährleistet ist. Die optimale Konzentration an zuzusetzenden Zinkionen ist jedoch für jede Charge des Puffers verschieden.

Ziel der Erfindung:

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und Mittel zur Stabilisierung der alkalischen Phosphatase in Pufferlösungen zur Verfügung zu stellen, durch das eine Inhibierung der enzymatischen Aktivität verhindert wird und das stets optimale und reproduzierbare Ergebnisse liefert.

Darlegung des Wesens der Erfindung:

Überraschenderweise wurde gefunden, daß komplex gebundene Zinkionen ebensogut wie Zinksalze die enzymatische Aktivität der alkalischen Phosphatase im 2-Amino-2-methylpropanol-(1)-Puffer stabilisieren können. Dies ist vor allem deshalb so überraschend, als gerade Komplexbildner für die Inhibierung verantwortlich sind und andererseits bekannt ist, daß die Inhibierung von alkalischer Phosphatase durch Ethylendiamintetraacetat nur teilweise und nur durch Zugabe ganz bestimmter Konzentrationen von Zinkionen wieder aufgehoben werden kann. Die Vorteile der neuen Stabilisatoren

liegen darin, daß im Gegensatz zum Zinksulfat und anderen Zinksalzen bei Stabilisatorkonzentrationen von mehr als 0,1 mmol/l keine Inhibierung der Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase mehr auftritt. Der Bereich optimaler Stabilisatorkonzentration ist sehr breit, so daß eine einzige Stabilisatorkonzentration für verschiedene Chargen von Puffer unterschiedlicher Qualität verwendbar ist. Bei der Verwendung von Zinkkomplexen zur Stabilisierung der alkalischen Phosphatase entfällt somit die Optimierung der Stabilisatorkonzentration für die jeweils vorliegende Puffercharge.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Stabilisierung der alkalischen Phosphatase in Pufferlösungen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß der Pufferlösung ein wasserlöslicher Zinkkomplex zugesetzt wird, vorzugsweise ein Verfahren zur Stabilisierung der alkalischen Phosphatase in 2-Amino-2-methylpropanol-(1)-Puffer, das dadurch gekennzeichnet ist, daß dem Puffer ein Komplex aus Zinkionen und einem Chelatbildner zugesetzt wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Mittel zur Stabilisierung der alkalischen Phosphatase in Pufferlösungen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es neben dem Puffer einen wasserlöslichen Zinkkomplex enthält sowie die Verwendung dieses Komplexes zur Stabilisierung der alkalischen Phosphatase in Pufferlösungen.

Die Bestimmung der alkalischen Phosphatase mit Hilfe des neuen Stabilisators erfolgt auf übliche Weise: Einer thermostatisierten Pufferlösung, die den Stabilisator und Magnesiumionen enthält, wird die zu untersuchende Probe zugegeben. Nach einer bestimmten Inkubationszeit wird das Substrat zugesetzt und in einem Photometer die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit registriert, die der Enzymaktivität proportional ist.

Der Stabilisator besteht aus einem Zinkchelatkomplex. Dieser Komplex kann entweder als solcher der Puffer-
substanz oder der Pufferlösung zugesetzt werden oder
man kann dem Puffer beide Bestandteile des Komplexes
5 gleichzeitig oder nacheinander zugeben.

Geeignete Zinkverbindungen zur Herstellung des Kom-
plexes sind insbesondere alle Zinksalze, die in
Wasser oder in einer Lösung des Komplexbildners
löslich sind und die die enzymatische Bestimmung
10 der alkalischen Phosphatase nicht stören, wie
Zinksulfat, Zinkacetat, Zinknitrat oder auch Zink-
hydroxid usw., vorzugsweise Zinksulfat.

Geeignete Chelatbildner zur Bildung eines wasserlöslichen
Zinkkomplexes sind z.B. Ethylendiamintetraacetat, trans-
15 1,2-Diaminohexantetraacetat, Diethylentriaminpenta-
acetat, Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)-N,N'-tetra-
acetat usw., vorzugsweise Ethylendiamintetraacetat. Die
Chelatbildner können dabei entweder in Form ihrer Salze
oder auch in der Säureform eingesetzt werden.

20 Die Herstellung des Zinkkomplexes erfolgt durch Mischung
des Chelatbildners mit der Zinkverbindung im molaren
Verhältnis von etwa 1:1. Dabei ist es nicht kritisch,
ob man den Zinkkomplex als Substanz, z.B. $\text{ZnEDTA} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$,
dem Puffer zusetzt oder äquimolare Mengen an z.B.
25 Zinksulfat und Ethylendiamintetraacetat nacheinander
in den Puffer gibt, so daß sich der Komplex in der
Pufferlösung bilden kann.

Das molare Verhältnis von Komplex zu Puffer kann im Be-
reich von $1:10^6$ bis $1:10$ variiert werden; bevorzugt ist
30 ein Bereich von etwa $1:10^4$ bis $1:10^3$.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher
erläutert.

Ausführungsbeispiele:

Beispiel 1

5 Untersuchung des Einflusses verschiedener Stabilisator-
konzentrationen auf die enzymatische Aktivität der alka-
lischen Phosphatase. Vergleich der stabilisierenden Wir-
kung von Zink-Ethylendiamintetraacetat (ZnEDTA) mit
Zinksulfat:

In eine Küvette mit 1 cm Schichtdicke wurden 2,8 ml Puf-
ferlösung der folgenden Zusammensetzung pipettiert:

10	2-Amino-2-methylpropanol-(1)	0,96 mol/l,
	Magnesiumsulfat	1,0 mmol/l,
	Stabilisator (ZnSO ₄ bzw. ZnEDTA)	10 ⁻⁵ bis 10 ⁻² mol/l.

Die Lösung wurde auf eine Temperatur von 30 °C gebracht
und anschließend wurden 0,1 ml Serum zugegeben. Die
15 Lösung wurde gemischt und bei 30 °C vorinkubiert. Die
Dauer der Vorinkubation betrug bei Meßreihe a) 90 Se-
kunden, bei Meßreihe b) 10 Minuten. Die Inkubation wur-
de durch Zugabe von 0,1 ml einer Lösung des Dinatrium-
salzes von p-Nitrophenylphosphat in einer Konzentration
20 von 0,48 mol/l beendet. Die Lösung wurde gemischt und
aus der zeitlichen Änderung der Extinktion bei 405 nm
wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase berech-
net.

Stabilisator- konzentration [mol/l]	Enzymaktivität [U/l]			
	a) Vorinkubation 90 sec		b) Vorinkubation 10 min	
	ZnSO ₄	Zn EDTA	ZnSO ₄	ZnEDTA
10 ⁻⁵	201	184	171	162
3 · 10 ⁻⁵	209	191	186	184
10 ⁻⁴	206	202	200	200
3 · 10 ⁻⁴	201	205	205	202
10 ⁻³	157	204	151	203
3 · 10 ⁻³	11	200	18	199
10 ⁻²	0	195	0	196

Aus den Tabellen geht eindeutig hervor, daß für das Zinksalz im Vergleich zum ZnEDTA nur ein enger Konzentrationsbereich optimaler Stabilisatorwirkung existiert. Etwa ab einer Stabilisatorkonzentration von 10⁻³ mol/l wirkt Zinksulfat als Inhibitor und bei einer Konzentration von 10⁻² mol/l Zinksulfat ist die Enzymaktivität auf 0 abgesunken, während im Falle von ZnEDTA noch bei einer optimalen Enzymaktivität gemessen werden kann.

Beispiel 2

Untersuchung der Wirkung der Stabilisatoren ZnSO₄ und ZnEDTA in Puffern unterschiedlicher Inhibitorkonzentration:

Bei der fraktionierten Destillation von 2-Amino-2-methylpropanol-(1) wurden Fraktionen erhalten, die eine mehr oder weniger starke Inaktivierung der alkalischen Phosphatase bewirkten. Diese Fraktionen wurden für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der alkalischen Phosphatase in Gegenwart von ZnSO_4 bzw. ZnEDTA verwendet. Die Bestimmung wurde analog Beispiel 1 mit einer Inkubationszeit von 90 Sekunden durchgeführt.

In der nachstehenden Tabelle ist die Wirkung der Stabilisatoren bei einer Konzentration von 10^{-3} mol/l einander gegenübergestellt. Die enzymatische Aktivität der alkalischen Phosphatase ist in U/l angegeben.

Puffer	Enzymaktivität [U/l]	
	ZnSO_4	ZnEDTA
Fraktion 1	41	195
Fraktion 2	43	202
Rückstand	203	204

Die Tabelle zeigt, daß lediglich im Destillationsrückstand bei extrem erhöhter Konzentration an Verunreinigung beide Stabilisatoren bei einer Konzentration von 10^{-3} mol/l gleichwertig sind. Die gleiche Stabilisatorkonzentration führt jedoch bei den weniger verunreinigten Fraktionen des Puffers im Falle des Zinksulfats zu einer Inhibierung der enzymatischen Aktivität der alkalischen Phosphatase von etwa 80 % gegenüber ZnEDTA .

Beispiel 3

Untersuchung der Eignung verschiedener Zinkkomplexe zur Stabilisierung der alkalischen Phosphatase in 2-Amino-2-methylpropanol-(1)-Puffer:

Die Bestimmung wurde analog Beispiel 1 durchgeführt, wobei die Stabilisatorkonzentration in allen Fällen 10^{-4} mol/l betrug; die Vorinkubationszeit betrug 90 Sekunden bzw. 10 Minuten. Die Ergebnisse sind in der nach-

5 stehenden Tabelle dargestellt:

Zinkkomplexligand		Enzymaktivität [U/l]	
		Vorinkubation a) 90 sec	Vorinkubation b) 10 min
10	Ethylendiamintetraacetat	212	214
	trans-1,2-Diaminohexantetraacetat	213	206
	Diethylentriaminpentaacetat	216	218
	Ethylenglycol-bis-(β -amino-ethyl-ether)-N,N'-tetraacetat	207	217
15	ohne Stabilisator	180	82

Es zeigt sich, daß alle untersuchten Zinkkomplexe zur Stabilisierung der alkalischen Phosphatase geeignet sind.

Erfindungsansprüche:

1. Verfahren zur Stabilisierung der alkalischen Phosphatase in Pufferlösungen, gekennzeichnet dadurch, daß der Pufferlösung ein wasserlöslicher Zinkkomplex zugesetzt wird.
2. Verfahren nach Punkt 1 zur Stabilisierung der alkalischen Phosphatase in 2-Amino-2-methylpropanol-(1)-Puffer, gekennzeichnet dadurch, daß dem Puffer ein Komplex aus Zinkionen und einem Chelatbildner zugesetzt wird.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, gekennzeichnet dadurch, daß dem Puffer Zink-Ethylendiamintetraacetat zugesetzt wird.
4. Verfahren nach Punkt 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, daß dem Puffer eine Zinkverbindung und ein Chelatbildner zugesetzt werden.
5. Verwendung eines wasserlöslichen Zinkkomplexes zur Stabilisierung der alkalischen Phosphatase in Pufferlösungen.
6. Verwendung nach Punkt 5 eines Komplexes aus Zinkionen und einem Chelatbildner zur Stabilisierung der alkalischen Phosphatase in Pufferlösungen.
7. Verwendung nach Punkt 5 von Zink-Ethylendiamintetraacetat zur Stabilisierung der alkalischen Phosphatase in Pufferlösungen.
8. Mittel zur Stabilisierung der alkalischen Phosphatase in Pufferlösungen, gekennzeichnet dadurch, daß es neben dem Puffer einen wasserlöslichen Zinkkomplex enthält.