



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

270 307

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
G 01 N 33/50//
G 01 N 33/573

(21) PV 438-88.F
(22) Přihlášeno 22 01 88

(40) Zveřejněno 14 11 89
(45) Vydáno 19 03 91

(75) Autor vynálezu

SOLICH PETR RNDr. CSc., LHOTA POD LIB-
ČANY, VALENTOVÁ OLGA RNDr. CSc.,
HRADEC KRÁLOVÉ, MAREK MIROSLAV doc.
ing. CSc., PRAHA, KARLÍČEK ROLF doc.
RNDr. CSc., POLÁŠEK MIROSLAV RNDr. CSc.,
HRADEC KRÁLOVÉ

(54)

Způsob enzymového stanovení močoviny

(57) Způsob stanovení, sestávající z hydrolýzy močoviny imobilizovanou ureasou a z kolorimetrického stanovení uvolněného amoniaku průtokovou injekční analýzou, spočívá v tom, že se do nosného proudu fosfátového pufru aplikuje vzorek obsahující močovinu, nosný proud se uvede do kontaktu s imobilizovanou ureasou umístěnou pevně na nosiči v enzymovém reaktoru a po průchodu se nosný proud s uvolněným amoniakem postupně smísí s činidlem I, obsahujícím 0,1 až 0,5 M salicylanu sodného, 1 až 8 mM nitroprusidu sodného, 0,2 až 0,3 M hydroxidu alkalického kovu a 10 až 40 obj. % methanolu, a s činidlem II obsahujícím 0,01 až 0,5 M chloranu alkalického kovu, načež se směs zahřeje na teplotu 25 až 60 °C a fotometricky se stanoví absorbance při 700 nm, z níž lze stanovit množství močoviny v analyzovaném vzorku.

Vynález se týká způsobu enzymového stanovení močoviny.

V analytické chemii a zvláště pak v klinické biochemii se čím dál více uplatňují postupy založené na enzymové katalýze. Při stanovení močoviny se používá ureasy, tj. enzymu, který hydrolyzuje močovinu na amoniak a oxid uhlíčitý. Průběh této enzymové reakce je možné sledovat na základě tvorby těchto komponent, přičemž se dává přednost stanovení amoniaku, resp. amonných iontů. Nejrozšířenější je kolorimetrická Berthelotova metoda založená na oxidační kopulaci amoniaku s fenoly po reakci s chlornanem v alkalickém prostředí. Vedle kolorimetrické detekce amoniaku našly široké uplatnění také elektrochemické metody, ať již ve spojení se skleněnou pH elektrodou, elektrodou selektivní na amonné ionty nebo amonnou elektrodou se vzduchovou mezerou či měřením amoniaku v plynné formě.

Při enzymovém stanovení močoviny se s ohledem na rozdílnost podmínek enzymové hydrolyzy močoviny a následného stanovení vzniklého amoniaku velmi často od sebe tyto dva stupně oddělují. Z tohoto hlediska je velmi atraktivní použití průtokové injekční analýzy. Při tomto postupu se analyzovaný vzorek aplikuje přímo do nosného média obsahujícího aktivní ureasu a vytvořený amoniak je detegován některou z uvedených metodik. Z důvodu snížení spotřeby enzymu, a tím i výrazného zefektivnění analytického postupu, je mnohem výhodnější použití ureasy v imobilizované formě, která se v podobě tzv. „enzymové reaktorové elektrody“ používá ve spojení s elektrochemickou detekcí vzniklých produktů za vlastním „reaktorem“, tj. za kolonkou či kapilárou s imobilizovanou ureasou. V tomto uspořádání však není možno dosáhnout větší frekvence nástřiků než 20 za hodinu, poněvadž pro každou analýzu je potřebná určitá doba k ustanovení rovnováhy elektrochemického detektoru.

Uvedenou nevýhodu odstraňuje způsob enzymového stanovení močoviny analýzou, skládající se z hydrolyzy močoviny imobilizovanou ureasou a z kolorimetrického stanovení uvolněného amoniaku průtokovou injekční analýzou, vyznačený tím, že se do nosného proudu fosfátového pufru aplikuje vzorek obsahující močovinu, nosný proud se uvede do kontaktu s imobilizovanou ureasou umístěnou pevně na nosiči v enzymovém reaktoru a po průchodu se nosný proud s uvolněným amoniakem postupně smísí s činidlem I, obsahujícím 0,1 až 0,5 M salicylanu sodného, 1 až 8 mM nitroprusidu sodného, 0,2 až 0,3 M hydroxidu alkalického kovu a 10 až 40 % obj. methanolu, a s činidlem II obsahujícím 0,01 až 0,5 M chlornanu alkalického kovu, načež se směs zahřeje na teplotu 25 až 60 °C a fotometricky se stanoví absorbance při 700 μm , z níž lze stanovit množství močoviny v analyzovaném vzorku.

Výhodou enzymového stanovení močoviny podle vynálezu je především rychlost analýzy, kdy při průtoku kolem 1 ml/s nosného média je možno provádět 60 analýz za hodinu s lineární odezvou pro koncentraci močoviny 25 až 500 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v nástřiku 40 až 90 μl .

Vynález je dokumentován příklady, aniž by se jimi omezoval.

Příklad 1

Stanovení močoviny v krevním séru

Vzorky krevního séra byly ředěny vodou v poměru 1 : 50 a aplikovány bez deproteinace do nosného proudu 0,2 M fosfátového pufru pH 6,9 systému průtokové injekční analýzy. Po průchodu média s aplikovaným vzorkem enzymovým reaktorem obsahujícím imobilizovanou ureasu byla reakční směs se vzniklým amoniakem smíchána s činidlem I, obsahujícím 0,37 M salicylan sodný, 4 mM nitroprusid sodný, 0,25 M hydroxid sodný a 30 obj. %ní methanol ve vodě, a potom s činidlem II, obsahujícím 0,03 M chlornan sodný. Reakční směs potom byla průchodem přes reakční cívku zahřata na 50 °C a množství vytvořeného barviva bylo proměřeno v průtokové kyvetě. Hodnota absorbance při 700 nm je přímo úměrná množství močoviny obsažené v aplikovaném vzorku v rozsahu koncentrací 25 až 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Při frekvenci 60 analýz za hodinu byla reprodukovatelnost stanovení močoviny charakterizována hodnotou relativní směrodatné odchylky 1,1 %.

P ř í k l a d 2

Stanovení močoviny v moči

Způsobem shodným jako v příkladu 1 až na to, že činidlo II obsahovalo 0,03 M chlornanu draselného, bylo prováděno stanovení obsahu močoviny ve vzorcích moči zředěných vodou 1 : 1 000 až 1 : 2 000 se stejnou frekvencí nástřiků. Interferující obsah amonných iontů ve vzorcích moči byl odečten na základě shodného stanovení, aniž byl vzorek podroben účinku imobilizované ureasy v enzymovém reaktoru.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob enzymového stanovení močoviny analýzou, skládající se z hydrolýzy močoviny imobilizovanou ureasou a z kolorimetrického stanovení uvolněného amoniaku průtokovou injekční analýzou, vyznačený tím, že se do nosného proudu fosfátového pufru aplikuje vzorek obsahující močovinu, nosný proud se uvede do kontaktu s imobilizovanou ureasou umístěnou pevně na nosiči v enzymovém reaktoru a po průchodu se nosný proud s uvolněným amoniakem postupně smísí s činidlem I, obsahujícím 0,1 až 0,5 M salicylanu sodného, 1 až 8 mM nitroprusidu sodného, 0,2 až 0,3 M hydroxidu alkalického kovu a 10 až 40 obj. % methanolu, a s činidlem II obsahujícím 0,01 až 0,5 M chlornanu alkalického kovu, načež se směs zahřeje na teplotu 25 až 60 °C a fotometricky se stanoví absorbance při 700 μm, z níž lze stanovit množství močoviny v analyzovaném vzorku.