



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

224 156 ✓

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlášené 26 05 80

(21) PV 3663-80

(51) Int. Cl.³ A 61 K 49/00

(40) Zverejnené

29 04 83

(45) Vydané

01 07 84

(75)

Autor vynálezu KUNIAK ĽUDOVÍT ing. CSc., BRATISLAVA
ZEMEK JURAJ ing. CSc., LEDNICA

(54) Spôsob prípravy chromogénneho škrobu pre detekciu izoenzýmov alfa amylázy

224 158

Vynález sa týka spôsobu prípravy chromogénneho škrobu vhodného pre detekciu izoenzýmov alfa amylázy.

Chromogénne substráty stali sa v posledných rokoch veľmi dobrými pomocníkmi pri stanovení úrovne rôznych enzýmových aktivít v biologických tekutinách, čím je možné spoľahlivo potvrdiť alebo vylúčiť niektoré druhy interných ochorení. Sú teda nepostrádateľné v modernej diagnostickej klinickej praxi [Pharmacia AB: Clinical and technical information (1972), J. Kenedy: *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, 29, 350, (1974)]. Tak napr. veľmi rozšíreným klinickým testom je stanovenie úrovne alfa amylázy v krvnom sére a v moči pacienta. Hodnota aktivity alfa amylázy v biologických tekutinách umožňuje stanoviť funkčné poruchy pankreasu prípadne niektoré infekčné choroby [Kuniak Ľ., Zemek J.: A.O. č. 192210, 192202, Kuniak Ľ., Zemek J., Gergel J.: A.O. č. 202761].

Pri niektorých chorobách najmä v ich počiatočných štádiách možno využiť výsledky hodnôt stanovenia pomeru izoenzýmov alfa amylázy v biologických tekutinách. Izoenzýmy alfa amylázy sa v súčasnej dobe stanovujú elektroforetickým delením na vhodnom géli a po elektroforéze sa prevedie detekcia rozdelených izoenzýmov vhodným detekčným činidlom.

Jedným z možných spôsobov detekcie izoenzýmov alfa amylázy je detekcia pomocou farebného škrobu so špecificky veľmi vysokou citlivosťou ku enzýmovej aktivite izoenzýmov alfa amylázy.

Prípravu takéhoto chromogénneho substrátu na báze škrobu s veľmi vysokou citlivosťou rieši táto prihláška vynálezu.

Podstata vynálezu spôsobu prípravy chromogénneho škrobu pre detekciu izoenzýmov alfa amylázy spočíva v tom, že zemiakový škrob sa v prvom stupni sietuje v 0,1 mol hydroxide sodnom pri teplote 15 až 25 °C po dobu 18 až 24 h za použitia epichlorhydrínu v množstve 0,03 až 0,1 % počítané na hmotnosť suchého škrobu a za súčasného použitia elektrolytu s výhodou síranu sodného a/alebo octanu sodného v množstve 30 až 50 % počítané na hmotnosť suchého škrobu, načo sa v druhom stupni na zosieťovaný škrob kovalentne naviaže farbivo s výhodou dvojsodná soľ kyseliny 8-amino-5-[3-(sulfoetylsulfonyl)anilino]-6-antrochinonsulfonovej v množstve 10 až 15 % počítané na hmotnosť suchého škrobu v alkalickom prostredí pri teplote 15 až 25 °C po dobu 1 až 3 h, pri koncentrácii hydroxidu sodného 0,7 až 1,0 % hmot. a koncentrácii pomocného elektrolytu a zemiakového škrobu 3 až 7 % počítané na hmotnosť reakčného roztoku a v treťom stupni sa chromogénny škrob kvantitatívne zbaví voľného farbiva premývaním vodným roztokom alkoholu a/alebo acetónu s výhodou zriedeného v pomere 1:1.

Chromogénny škrob pripravený podľa postupu prihlášky vynálezu má veľmi vysoký napúšťací objem vo vode (12 až 20 ml/g), čo je prvým nevyhnutným predpokladom vysokej citlivosti substrátu k enzýmovej aktivite. Obsah viazaného farbiva sa pohybuje okolo 12 až 16 % hmot., čo je rovnako optimálne množstvo pre zachovanie maximálnej citlivosti substrátu k aktivite izoenzýmov alfa amylázy.

Použitie pomocného elektrolytu zabezpečuje vyššiu účinnosť sietovacej reakcie epichlórhydrínu a rovnako vyššiu účinnosť kovalentného viazania farbiva za použitých reakčných podmienok.

Pri premývaní farebného škrobu sa môže použiť jednak priame premývanie na vhodnom filtri, taktiež sa môže premývať dekantáciou, alebo pomocou kontinuálnej odstredivky.

Po dokonalom vymytí nezreagovaného farbiva sa z premytého škrobu vytesní voda premývaním etanolom alebo acetónom za použitia koncentračného gradientu aby sa nevytvorili zo škrobu tvrdé agregáty, ale jemný prášok.

Pri technologických operáciách je veľmi dôležité aby nedošlo ku kontaktu chromogénneho škrobu s prstami lebo aj nepatrné stopy alfa amylázy prítomné na pokožke môžu viesť ku enzymatickej hydrolýze chromogénneho substrátu.

224 158

Taktiež je dôležité, aby sa pripravený produkt počas výroby nekontaminoval mikroorganizmami, ktoré sú schopné degradovať α (1 $\rightarrow$ 4) glukány.

Výhodou navrhovaného spôsobu prípravy chromogénneho škrobového gélu pre detekciu izoenzýmov alfa amylázy je, že poskytuje vysoko citlivý gél s homogennou distribúciou kovalentne viazaného farbiva, je energeticky nenáročný, lebo všetky reakcie i technologické operácie prebiehajú pri laboratórnej teplote, pričom zabezpečuje vysokú účinnosť sietovacej reakcie a kovalentného viazania farbiva na škrobový substrát.

Príklad 1

Do 1000 ml vody sa rozpustí 4,5 g hydroxidu sodného a 250 g octanu sodného. Po dokonalom rozpustení sa za stáleho miešania pridá 0,4 ml epichlórhydrínu a roztok sa mieša asi 5 min. kedy je epichlórhydrín rozpustený. Potom sa za stáleho miešania pridá 560 g zemiakového škrobu (sušina 89 %) a reakčná zmes sa mieša 2 h pri laboratórnej teplote. Po dvoch h sa miešanie zastaví a nechá sa staticky reagovať 24 h pri laboratórnej teplote. Po 24 h sa zapne miešanie a pridá sa 6,5 litra vody v ktorej sa predom rozpustilo 100 g farbiva dvojsodná soľ kyseliny 8-amino-5-[3-(sulfoethylsulfonyl)anilino]-6-antrachinonsulfonovej a 70 g hydroxidu sodného a nechá sa reagovať 2 h pri laboratórnej teplote. Po ukončení reakcie sa reakčná zmes neutralizuje so 100 ml konc. kyseliny octovej zriedenej s vodou v pomere 1:1 a reakčná zmes sa mieša aspoň 5 min.

Potom sa do reakčnej zmesi pridá 7,5 l etanolu a filtruje sa cez sklenný filter a na filtri sa premýva tak dlho zriedeným etanolom (1:1) až je filtrát bezfarebný.

Potom sa na koniec premýva postupne stále koncentrovanejším etanolom až nakoniec bezvodým a chromogénny škrob sa po dokonalom odsatí etanolu suší voľne na vzduchu alebo v sušiarňi pri 60 °C. Výsledný produkt má napúšťací objem 15 ml/g a obsah viazaného farbiva 15,2 % hmot.

Príklad 2

Postup podľa príkladu 1, s tým rozdielom, že na sietovanie

sa použije len 1,33 ml epichlórhydrínu.

Výsledný produkt mal napúčací objem 22 ml/g a obsah farbiva 15,5 % hmot.

Príklad 3

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že sa použilo na farbenie škrobu 75 g farbiva.

Výsledný produkt mal napúčací objem 14 ml/g a obsah viazaného farbiva 11,5 % hmot.

Vynález má použitie v klinickej diagnostike porúch metabolismu uhlohydrátov a v základnom výskume pri štúdiu izoenzýmov alfa amylázy. Chromogénny škrob pripravený podľa tejto prihlášky vynálezu spĺňa všetky kritériá i pre prípravu testovacích tablet na stanovenie glukoamylázy v biologických tekutinách, ktorá je indikátorom niektorých nádorových ochorení.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

224 158

Spôsob prípravy chromogénneho škrobu pre detekciu izoenzýmov alfa amylázy, v y z n a č e n ý tým, že zemiakový škrob sa v prvom stupni sietuje v 0,1 mol hydroxide sodnom pri teplote 15 až 25 °C po dobu 18 až 24 h za použitia epichlórhydrínu v množstve 0,03 až 0,1 % počítané na hmotnosť suchého škrobu a za súčasného použitia elektrolytu s výhodou síranu sodného a/alebo octanu sodného v množstve 30 až 50 % počítané na hmotnosť suchého škrobu, načo sa v druhom stupni na zosieťovaný škrob kovalentne naviaže farbivo s výhodou dvojsodná soľ kyseliny 8-amino-5-[3-(sulfoetylsulfonyl)anilino]-6-antrachinonsulfonovej v množstve 10 až 15 % počítané na hmotnosť suchého škrobu v alkalickom prostredí pri teplote 15 až 25 °C po dobu 1 až 3 h, pri koncentrácii hydroxidu sodného 0,7 až 1 % hmot. a koncentrácii pomocného elektrolytu a zemiakového škrobu 3 až 7 % počítané na hmotnosť reakčného roztoku a v treťom stupni sa chromogénny škrob kvantitatívne zbaví voľného farbiva premývaním vodným roztokom alkoholu a/alebo acetónu s výhodou zriedeného v pomere 1:1.