



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

203704

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 07 02 79
(21) (PV 841-79)

(40) Zveřejněno 30 06 80

(45) Vydáno 15 05 83

(51) Int. Cl.³
G 01 N 33/50

(75)

Autor vynálezu

CHROMÝ VRATISLAV ing. CSc.
a VALÍČKOVÁ MARTA prom. farm., BRNO

(54) Stabilní enzymový přípravek pro stanovení kyseliny močové

1

Předmětem vynálezu je stabilní enzymový přípravek pro stanovení kyseliny močové.

Kyselina močová je hlavním purinem obsaženým v plasmě a u člověka představuje konečný produkt purinového metabolismu. Její nadměrná tvorba nebo nedostatečné vylučování z organismu, hyperurikemie má vztah k celé řadě chorob. Stanovení kyseliny močové v biologických tekutinách, zejména pak v krevním séru, má tedy značný diagnostický význam. Metody stanovení kyseliny močové jsou založeny na její chemické nebo enzymové oxidaci na allantoin. V poslední době převládají metody enzymové s enzymem urikasou, které jsou specifické. Stanovuje se buď allantoin fotometricky v ultrafialové oblasti spektra nebo se využívá stanovení přes souběžně vznikající peroxid vodíku. Do této skupiny lze zařadit stanovení s enzymem katalasou, která za přítomnosti peroxidu vodíku oxiduje methanol na formaldehyd, jež lze stanovit kopulací s acetylacetone a amonnými ionty jako žlutý 3,5-diacetyl-1,4-dihydrolutidin.

Enzymové stanovení s urikasou přináší řadu problémů souvisejících se stabilitou enzymu. Komerčně je enzym urikasa převážně dodáván buď v lyofilizovaném stavu,

2

jako stabilizovaný roztok v glycerolu nebo jako suspenze se síranem amonným. Jak bylo ověřeno, jsou roztoky v glycerolu jen omezeně stálé, neboť i při uchovávání v chladu klesá aktivita enzymu po několika měsících o 50 až 80 %. Suspenze enzymu v síranu amonném je pro fotometrické stanovení kyseliny močové nevhodná, neboť reakční směs by bylo nutno filtrovat. Při fotometrickém stanovení kyseliny močové je obvykle nutné zaručit, aby koncentrace urikasy v reakční směsi byla asi 0,05 U/ml. Běžně dostupné lyofilizované přípravky vykazují obvykle aktivitu 0,5 až 20 U/mg a pro stanovení kyseliny močové je nutné enzym vhodným způsobem ředit, přičemž vodné roztoky rychle ztrácejí účinnost.

K odstranění uvedených nedostatků směruje stabilní enzymový přípravek pro stanovení kyseliny močové podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že na 1 U urikasy obsahuje 0,003 až 0,150 g D(—)-N-methylglukaminu, 0,001 až 0,05 g D(—)-N-methylglukaminiumchloridu. Dále může přípravek obsahovat neutrální plnidla na bázi glycidů, například glukosu, laktosu, sacharosy, maltosu nebo jejich směsi s výhodou v poměru 1 ku 1 v množství 0,002 až 0,100 g na 1 U urikasy. V případě kapalného přípravku obsahuje dále 0,5 až 10

g vody. Stabilní enzymový přípravek pro stanovení kyseliny močové podle vynálezu může být připraven buď v pevném stavu, nebo v roztoku. Přípravek v pevném stavu je stálý stejně jako například lyofilisovaná urikasa. Kapalný přípravek je stálý podobně jako například stabilisovaný roztok urikasy v glycerolu.

D(—)-N-methylglukamin s D(—)-N-methylglukaminchloridem představuje slabě alkalický pufr, jehož pH se pohybuje v rozmezí 8,5 až 10,5, jež je optimální pro stabilisaci urikasy ve vodném roztoku. D(—)-N-methylglukamin má současně mohutný solubilizační efekt a usnadňuje převedení urikasy do roztoku. Neutrální plnidla na bázi glycidů slouží jako trituration a usnadňují manipulaci, zejména navažování nebo odměřování pevného přípravku.

Jak bylo ověřeno, lze stabilní enzymový přípravek podle vynálezu výhodně užít pro stanovení kyseliny močové a může být snadno vyroben z dostupných surovin.

Pro ilustraci složení stabilního enzymového přípravku ke stanovení kyseliny močové slouží následující příklady.

Příklad 1

Připraví se pevná směs obsahující 1 U urikasy, 150 mg D(—)-N-methylglukaminu, 50 mg D(—)-N-methylglukaminiumchloridu a 100 mg sacharosy.

Příklad 2

Připraví se pevná směs obsahující 7,2 U urikasy, 66 mg D(—)-N-methylglukaminu, 22 mg D(—)-N-methylglukaminiumchloridu a 200 mg glukosy.

Příklad 3

Připraví se pevná směs obsahující 1 U urikasy, 3 mg D(—)-N-methylglukaminu, 1 mg D(—)-N-methylglukaminiumchloridu a 2 mg směsi laktosy s maltosou v poměru 1 ku 1. Před použitím se rozpustí v 0,5 ml vody.

Příklad 4

Připraví se pevná směs obsahující 10 U urikasy, 30 mg D(—)-N-methylglukaminu, 10 mg D(—)-N-methylglukaminiumchloridu. Před použitím se rozpustí v 5 mg vody.

Pro fotometrické stanovení kyseliny močové se ve zkumavce smíchá 0,2 ml vzorku, například séra, přidá se činidlo obsahující enzym katalasu, acetylaceton a methanol ve fosfátovém pufru o pH 6,7, promíchá se a přidají se 3 mg pevné směsi podle příkladu 2 nebo 4 mg pevné směsi podle příkladu 1 nebo 0,1 ml roztoku urikasy podle příkladu 3 nebo 4. Inkubuje se při 37 °C po dobu 70 min a změří se absorbance v kyvetě 1 cm při vlnové délce 420 mm proti vodě. Současně se provede měření standardního roztoku a slepého pokusu. Měření slepého pokusu se provádí bez enzymu urikasy.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Stabilní enzymový přípravek pro stanovení kyseliny močové, vyznačený tím, že na 1 U urikasy obsahuje 0,003 až 0,150 g D(—)-N-methylglukaminu a 0,001 až 0,05 g D(—)-N-methylglukaminiumchloridu.

2. Stabilní enzymový přípravek pro stanovení kyseliny močové podle bodu 1 vyznačený tím, že obsahuje 0,002 až 0,1 g ne-

utrálních plnidel na bázi glycidů, například glukosu, laktosu, sacharosy, maltosu nebo jejich směsí, s výhodou v poměru 1 ku 1.

3. Stabilní enzymový přípravek pro stanovení kyseliny močové podle bodu 1 vyznačený tím, že obsahuje 0,5 až 10 g vody.