ČESKÁ A SLOVENSKÁ FEDERATIVNÍ REPUBLIKA
(19)

FEDERÁLNÍ ÚŘAD PRO VYNÁLEZY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

272 192

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.[5]
G 01 N 31/22

(21) PV 5216-87.F
(22) Přihlášeno 03 07 87

(40) Zveřejněno 14 05 90
(45) Vydáno 07 10 91

(75)
Autor vynálezu
MALÝ MILAN RNDr.,
CHROMÝ VRATISLAV ing. CSc., BRNO

(54) Stabilizované činidlo na stanovení katalytické koncentrace aspartátaminotransferasy

(57) Předmětem řešení je stabilizované činidlo pro stanovení katalytické koncentrace aspartátaminotransferasy na bázi L-aspartátu, malátdehydrogenasy a nikotinamidadenosinu, které obsahuje určité množství kyseliny askorbové a albuminu. Činidlo se používá při stanovení katalytické koncentrace asparátaminotransferasy v krevním séru nebo plazmě a vyniká oproti doposud používaným především vyšší stabilitou.

CS 272192 B1

Stanovení katalytické koncentrace aspartátaminotransferasy, tj. L-aspartát- 2-oxoglutarátaminogransferasy EC 2.6.1.1. v krevním séru nebo plazmě je velmi rozšířenou analýzou, umožňující značné zpřesnění diferenciální diagnostiky jaterních a srdečních chorob. Stanovení katalytické koncentrace aspartátaminotransferasy je jednou ze základních analýz prováděných v klinické biochemii.

V současné době se připraví činidlo na stanovení katalytické koncentrace aspartátaminotransferasy tak, že se k pufru obsahujícím L-aspartát a pyridoxal-5-fosfát přidá indikátorový enzym malátdehydrogenasa a jeho substrát nikotinamidadenosindinukleotid. Tento roztok je stabilní v temnu při teplotě +4 °C asi tři týdny. 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 zmrazením, které je velmi hojně užíváno, nelze v tomto případě použít, protože při zmrazení dochází k poškození indikátorového enzymu malátdehydrogenasy, a tím i k poklesu její katalytické aktivity.

Stabilita zásobních roztoků může být několikanásobně prodloužena, přidají-li se do roztoku látky, které ochrání enzymy před jejich poškozením a antioxidanty zamezující nežádoucí oxidaci nikotinamidadenosindinukleotidu. Mnohé antioxidanty, jako je například propylgalát, ethylenglykol a kyselina citronová hojně užívané v potravinářství a farmacii, mají nepříznivý vliv na katalytickou koncentraci indikátorového enzymu, malátdehydrogenasy. Proto je žádoucí nalézt takovou látku, která zabrání oxidaci nikotinamidadenosindinukleotidu a zároveň nebude mít nepříznivý vliv na katalytickou koncentraci enzymů.

Zmíněné nedostatky výrazně potlačuje stabilizované činidlo na stanovení katalytické koncentrace aspartátaminotransferas podle vynálezu. Jeho podstata spočívá v tom, že činidlo obsahuje 0,5 $\mu mol.l^{-1}$ až 10 $\mu mol.l^{-1}$ kyseliny askorbové a 0,5 až 10 $g.l^{-1}$ albuminu.

Činidlo s kyselinou askorbovou a albuminem má následující přednosti. Albumin působí jako ochranné médium malátdehydrogenasy. Katalytická koncentrace malátdehydrogenasy za přítomnosti albuminu při teplotě +4 °C zůstává zachována po několik týdnů. Také koncentrace redukované formy nikotinamidadenosindinukleotidu v přítomnosti kyseliny askorbové zůstává téměř zachována více než jeden týden.

Albumin a kyselina askorbová jsou přitom kompatibilní s analytickými systémy nejčastěji užívanými pro stanovení katalytické koncentrace aspartátaminotransferasy, na rozdíl od jiných ochranných systémů.

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

Příklad 1

K 1 litru pufru s L-aspartátem se přidá 0,5 $\mu mol$ kyseliny askorbové a k pevné enzymové směsi obsahující malátdehydrogenasu a nikotinamidadenosindinukleotid se přidá 10 g albuminu. Po smíchání obou komponent se získá stabilizované činidlo pro stanovení katalytické koncentrace aspartátaminotransferasy.

Příklad 2

K enzymové směsi obsahující malátdehydrogenasu a nikotinamidadenosindinukleotid se přidá 5 $\mu mol$ kyseliny askorbové a 0,5 g albuminu. Po smíchání enzymové směsi s roztokem pufru obsahujícím L-aspartát se získá 1 litr stabilizovaného činidla pro stanovení katalytické koncentrace aspartátaminotransferasy.

Příklad použití

K 1 ml stabilizovaného činidla na stanovení katalytické koncentrace asparátaminotransferasy obsahující 120 $mmol.l^{-1}$ tris-(hydroximethyl)-aminomethan, 240 $mmol.l^{-1}$ L-aspartát, 0,12 $mmol.l^{-1}$ pyridoxal-5-fosfát, 0,216 $mmol.l^{-1}$ niktinamidadenosindinukleotid, 8,4 $\mu kat.l^{-1}$ malátdehydrogenasa, 0,5 $\mu mol.l^{-1}$ kyselina askorbová a 10,0 $g.l^{-1}$ albuminu připraveného podle příkladu 1 se přidá 0,1 ml analyzovaného séra. Po desetiminutové preinkubaci při 30 °C je anzymová reakce nastartována přídavkem 0,1 ml kyseliny 2-oxoglutarové o koncentraci 144 $mmol.l^{-1}$. Zaznamenává se změna absorbance při 340 nm za časovou jednotku při teplotě 30 °C.

## PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Stabilizované činidlo na stanovení katalytické koncentrace aspartátaminotransferasy na bázi L-aspartátu, malátdehydrogenasy a nikotinamidadenosinu, vyznačující se tím, že obsahuje 0,5 $\mu mol.l^{-1}$ až 10 $\mu mol.l^{-1}$, kyseliny askorbové a 0,5 až 10 $g.l^{-1}$ albuminu.