



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

253 602

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 21 12 85
(21) PV 9696-85

(51) Int. Cl.⁴

G 01 N 31/22

(40) Zveřejněno 12 03 87
(45) Vydáno 2.5.1989

(75)

Autor vynálezu

CHROMÝ VRATISLAV ing. CSc.,
FISCHER JIŘÍ RNDr.,
SVOBODA VLASTIMIL ing., BRNO

(54)

Analytické činidlo pro stanovení substrátů
oxidační kopulací

Řešení se týká analytického činidla pro stanovení substrátů oxidační kopulací obsahujících pufr, kopulační složky a enzymy, které podle vynálezu obsahuje redukující látky v určitém množství v poměru k roztoku kompletního analytického činidla. Oproti současně používaným činidlům uvedené činidlo potlačuje vliv pozitivně interferujících látek.

Vynález se týká analytického činidla pro stanovení substrátů oxidační kopulací podléhající vlivu pozitivně interferujících látek a způsob jeho přípravy.

Analytické systémy založené na oxidační kopulaci jsou v současné době široce využívány pro stanovení látek, které se vlivem specificky působících enzymů oxidují kyslíkem za vzniku oxidačních produktů a peroxidu vodíku. Peroxid vodíku se využívá v další reakční sekvenci k oxidační kopulaci katalyzované nejčastěji enzymem peroxidasou a vzniklé zbarvení se měří fotometricky. Jako kopulační složky se obvykle používají 4-aminoantipyrin, s různými fenoly nebo 3-methyl-2-benzothiazolinon hydrazon s aromatickými amíny. Tímto postupem jsou například stanovovány glukosa, cholesterol, kyselina močová, triacylglyceroly a další látky. Oxidace glukosy je katalyzována enzymem glukosa-~~per~~oxidasou, oxidace kyseliny močové enzymem urikasou, oxidace cholesterolu enzymem cholesteroloxidasou.

Zatímco první reakční sekvence využívající enzymů specificky katalysujících oxidaci analytu, který je současně pro daný enzym substrátem, je specifická, je druhá reakční sekvence, při níž probíhá kopulace, reakcí nespecifickou. Může být totiž vyvolána jak peroxidem vodíku vznikajícím v první reakční sekvenci, tak i jinými peroxosloučeninami nebo dalšími látkami, které mohou samy působit oxidačně, nebo jako katalysátory kopulace přímo na vzdušný kyslík.

Průběh oxidační kopulace je výrazně rušen prakticky většinou redukujících látek, které snižují obsah peroxide vodíku vzniklého první reakční sekvencí, a tím negativně ovlivňují analýzu. Je známo, že tyto analýzy jsou rušeny kyselinami askorbovou, gentisovou, močovou a dalšími redukujícími látkami pří-

tomnými například v biologickém materiálu. Některá z redukovadel jsou dokonce schopná odbarvovat vzniklé barvivo.

Bylo zjištěno, že zejména některé chemikálie, jako jsou pufrý a detergenty, které jsou používány v činidlech pro stanovení oxidační kopolyací, obsahují látky vyvolávající kopulační reakce i bez přítomnosti stanoveného analytu. Tím nespecifickým způsobem narůstá absorbance reakční směsi, mění se současně citlivost stanovení, jeho přesnost a správnost a u metod využívajících kinetické způsoby měření se mění počáteční rychlost nekontrolovatelným způsobem.

Uvedené interference lze částečně potlačit například výběrem chemikálií bez interferujících látek, nebo chemikálie speciálně čistit. V obou případech narůstají prudce náklady na analýsu. Některí výrobci diagnostik volí ke korigování uvedených pozitivních interferencí projevujících se zvyšováním nespecifické absorbance samotného činidla jiný postup. Například do reakčního systému pro stanovení glukosy přidávají předem stanovený analyt, v tomto případě glukosu, který zvyšuje počáteční absorbanci činidla na definovanou hodnotu, čímž se zdánlivě potlačí nespecifický vliv rušivých látek. Toto řešení má ale několik nevýhod. Jednou z nich je vyšší počáteční hodnota absorbance kompletního činidla. Obecným požadavkem kladeným na analytické metody totiž je, aby hodnota slepého pokusu byla co nejnižší. Mimo to má vznik zbarvení v činidle nepříznivý vliv na jeho stabilitu. V prvním přiblížení lze říci, že čím intenzivnější je počáteční zbarvení činidla, tím méně je stálé. Z uvedeného rozboru dosavadních nedostatků analytických systémů založených na oxidační kopulaci plyne, že počáteční intenzivní zbarvení činidel nepříznivě ovlivňuje jejich vlastnosti i vlastnosti analytické metody.

Nyní bylo s překvapením zjištěno, že tyto nežádoucí pozitivní interference projevující se intenzivním zbarvením, lze potlačit pomocí některých látek jinak obecně rušících při stanovení s oxidační kopulací, pokud jsou k analytickému systému přidány specifickým způsobem a v úzce vymezeném koncentračním intervalu.

Předmětem vynálezu je složení analytického činidla pro stano-

vení substrátů oxidační kopulací obsahující pufr, kopulační složky a enzymy, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje redukující látky, například kyselinu askorbovou, siřičitan, cystein nebo hydroxylamin v množství 1 až 500 $\mu\text{mol/l}$, vztaženo na roztok kompletního analytického činidla.

Redukující látka se přidá k jednotlivým činidlům neb o složkám analytického systému nebo k jeho kombinacím před tím, než může dojít ke vzniku nežádoucího zbarvení, s výhodou před přidáním kopulačních složek a enzymů, a nechá se reagovat po dobu potřebnou k odstranění interferujících látek, s výhodou 4 až 48 hodin.

Složkami, které nejčastěji obsahují pozitivně interferující látky, jsou puřovací substance, povrchově aktivní látky užívané jako smáčedla nebo i další látky, u nichž se zjistí, že vyvolávají pozitivní interferenci. Prostředkem k potlačení pozitivních interferencí může být jedna látka nebo kombinace několika redukujících látek. K objasnění předmětu vynálezu jsou uvedeny následující příklady.

Příklad 1

Činidlo pro stanovení glukosy

K 1000 ml roztoku fosforečnanového pufru o koncentraci 0,05 až 0,5 mol/l a pH 6 až 9 se přidá kyselina askorbová v množství 1 $\mu\text{mol/l}$, roztok se promíchá a nechá se stát do druhého dne. Pak se v tomto roztoku postupně rozpustí fenol v množství 5 až 10 mmol/l, 4-aminoantipyrin v množství 1 až 5 mmol/l a enzymy glukosaoxidasa v katalytické koncentraci 83 až 340 $\mu\text{kat/l}$ a enzym peroxidasa v katalytické koncentraci 8 až 33 $\mu\text{kat/l}$.

Příklad 2

Činidlo pro stanovení cholesterolu

Připraví se rozpuštěním pevné puřovací směsi obsahující 0,37 molů hydrogenfosforečnanu draselného, 0,35 molů dihydrogenfosforečnanu draselného, 2 g neionogenního tensidu a 500 $\mu\text{molů}$ hydroxylaminu v asi 800 ml destilované vody. Přidá se 70 ml metha-

nolu a nechá se stát 48 hodin ve tmě. Pak se k roztoku přidá 8 až 24 mmolů fenolu, 0,5 až 4 mmoly 4-aminoantipyrinu, 1 až 5 μ kat cholesteroloxidasy, 0,8 až 2 μ kat peroxidasy a roztok se doplní vodou do 1000 ml.

Příklad 3

Činidlo pro stanovení kyseliny močové

V destilované vodě se rozpustí 0,061 molů hydrogenfosforečnanu draselného, 0,39 molů dihydrogenfosforečnanu draselného a 8 μ molů cysteinu. Doplní se vodou do 1000 ml. Roztok se nechá stát 24 hodin.

Podobně se rozpustí ve vodě 10 g neionogenního tensidu, přidá se 400 μ molů hydrogensířičitanu sodného, doplní se vodou do 1000 ml a nechá se stát 24 hodin.

Oba roztoky se smíchají a v jejich směsi se rozpustí 0,3 až 3 mmoly 4-aminoantipyrinu, 25 až 50 μ molů ferrokyanidu draselného a 0,8 až 2 μ kat enzymu urikasa a 15 až 25 μ kat enzymu peroxidasa.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Analytické činidlo pro stanovení substrátů oxidační kopulací obsahující pufr, kopulační složky a enzymy, vyznačené tím, že obsahuje redukující látky, například kyselinu askorbovou, siřičitan, cystein nebo hydroxylamin v množství 1 až 500 μ mol/l vztaženo na roztok kompletního analytického činidla.