



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

232330

(11) (B1)

(22) Přihlášeno 08 03 83
(21) (PV 1595-83)

(51) Int. Cl.³
G 01 N 21/27

(40) Zveřejněno 18 06 84

(45) Vydáno 15 07 86

(75)
Autor vynálezu

POSPÍŠIL RICHARD RNDr. CSc., KEPRTOVÁ EVA ing., BRNO

(54) Substrát pro přípravu elučních pufrů

Vynález se týká vodného roztoku základního koncentrátu pro přípravu elučních pufrů, použitelných pro stanovení volných aminokyselin ve fyziologických tekutinách, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje 100,0 až 110,0 g kyseliny citrónové a 120,0 až 130 g hydroxidu lithného a popřípadě vodu.

Vynález se týká substrátu pro přípravu elučních pufrů použitelných pro stanovení volných aminokyselin ve fyziologických tekutinách na automatických analyzátozech aminokyselin jednokolonovým nebo dvoukolonovým postupem.

Pro kvalitní a kvantitativní analýzu aminokyselin klasickou metodou sloupcové chromatografie se nejčastěji používají automatické analyzátory aminokyselin. Zkoumaný vzorek představuje směs aminokyselin, které jsou svými vlastnostmi navzájem podobné. Jejich rozdělení na jednotlivé složky je úkolem chromatografické kolony. Kolona je trubice naplněná umělou pryskyřicí, ionexem. Vzorek je kolonou umášen elučním pufrém, přičemž jednotlivé aminokyseliny mají k ionexu různou afinitu, čímž jsou ve svém postupu bržděny, takže složky s nejmenší afinitou k ionexu vycházejí z kolony nejdříve.

Posloupnost, v níž jednotlivé složky aminokyseliny vycházejí z kolony je určena jednak vlastnostmi ionexu, teplotou kolony a složením elučních pufrů. Po rozdělení směsi aminokyselin na jednotlivé složky se provádí jejich detekce ninhydrinovým činidlem. Ninhydrin je činidlo, které selektivně vytváří s aminokyselinami charakteristické zbarvení. Proto se pufr vytékající z kolony kontinuálně směšuje s ninhydrinovým činidlem a v konstantních podmínkách protíhá barevná reakce. Barevný produkt se při určité vlnové délce kontinuálně měří ve fotometru a na zapisovači se zapisuje ve formě vrcholů.

Absorpce světla je přímo úměrná koncentraci dané látky v roztoku. Stanovení celého spektra aminokyselin na automatickém analyzátoru aminokyselin dvoukolonovou technikou se provádí na dlouhé koloně, kde se stanoví kyselé a neutrální aminokyseliny a to v cyklu Na^+ nebo Li^+ . Bazické aminokyseliny se stanoví na střední koloně.

Nevýhodou tohoto dvoukolonového způsobu stanovení je především velká spotřeba vzorku, delší doba analýzy a větší spotřeba chemikálií pro přípravu elučních pufrů. Při stanovení spektra aminokyselin jednokolonovou technikou se celé spektrum aminokyselin stanoví na jedné koloně. Pro stanovení aminokyselin v hydrolyzátu se používá tři pufrů sodnocitrananových, zatímco pro stanovení 5 lithiocitrananových elučních pufrů.

Výše uvedené nedostatky odstraňuje substrát pro přípravu elučních pufrů pro analyzátory aminokyselin, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje 100 až 110 g kyseliny citrónové a 120 až 130 g hydroxidu lithného, popřípadě též vodu. Dále obsahuje antioxidační činidlo, například thiodiglykol. Dále obsahuje smáčedlo, například polyhydroxiethylenlaurylether. Dále obsahuje konzervační činidlo, například kyselinu kaprylovou.

Výhody vynálezu spočívají v tom, že se řeší jednotný eluční systém pro stanovení volných aminokyselin v přirozených materiálech. Tento systém je jednotný pro typy analyzátorů. Dosud každý analyzátor měl odlišnou přípravu elučních pufrů. Při práci s novým elučním systémem se dosahuje 50% úspory analyzovaného vzorku, což má velmi velký význam zejména ve zdravotnictví, poněvadž umožňuje analyzovat malý objem vzorku, který nemohl být analyzován původní metodou. Jednoduchá a snadná příprava substrátu elučního pufru, který může být dodáván i ve formě substancí. Další výhodou je univerzálnost při přípravě jednotlivých pufrů. Zavedením jednotného elučního systému je rovněž zvýšena analytická reprodukovatelnost a přesnost při srovnání analýz na obou typech analyzátorů, i na různých pracovištích.

Vynález bude osvětlen následujícími příklady

pH pufru	$2,2 \pm 0,02$	$2,64 \pm 0,02$	$3,50 \pm 0,02$	$4,30 \pm 0,02$
Základní koncentrát (ml)	100	100	100	400
Koncentrace citrátu (M)	0,05	0,05	0,05	0,20

pH pufru	2,2 $\pm$ 0,02	2,64 $\pm$ 0,02	3,50 $\pm$ 0,02	4,30 $\pm$ 0,02
Koncentrace Li ⁺ (M)	0,15	0,15	0,15	0,60
Methylcellosolve (ml) (2-methoxyethanol)	-	45	-	-
Thiodiglykol (ml)	2	-	-	-
Kyselina kaprylová p.a.	0,2	0,2	0,2	0,2
Polyhydroxyethylenlauryl- ether (50 g rozpuštěno ve 150 ml deionizované vody (ml)	2	2	-	-
HCl konc. p. a. (cca ml)	30	25	20	60
Konečný objem (l)	1	1	1	1

Pro ředění standardů a vzorků se používá pufr s pH 2,2. Příprava jednotlivých pufrů podle vynálezu: Thiodiglykol se přidává jako antioxidační činidlo, aby během chromatografie nedocházelo k oxidaci sirných aminokyselin. Polyhydroxyethylenlaurylether (Brij 35) se užívá jako smáčedlo. Kyselina kaprylová slouží jako konzervační prostředek.

Při přípravě pufrů se velmi pečlivě dbá na přesné nastavení hodnoty pH u jednotlivých pufrů k získání reprodukovatelných elučních časů. Kontrola pH se provede až po ustálení rovnováhy, tj. po 24 hodinách, a to vždy, je-li nutné pufrů upravovat na žádané pH. Pro každou připravenou dávku pufru je nutné udělat na analyzátoru kalibrační test.

Protože chování aminokyselin při eluci je citlivé na pH, je možné podle polohy jednotlivých vrcholů na chromatogramu pufrů velmi přesně nastavit. Pufr pH 2,2 používáme k ředění vzorků a standardních roztoků, ostatní pufrů pH 2,64, 3,5 a 4,30 slouží k eluci aminokyselin. K regeneraci kolony se používá roztok 0,3 N hydroxidu lithného. Příprava ninhydriového činidla se provádí podle postupu uvedeného k jednotlivým analyzátorům. Je vypracován nový jednotný eluční systém, tabulka 1, který umožňuje stanovení volných aminokyselin na analyzátorech stejným způsobem a stejnými elučními pufrů.

Stanovení se provádí jednokolonovou technikou a nevyžaduje žádnou elektronickou úpravu analyzátorů. Pro přípravu elučních pufrů o různém pH a pufru pro ředění pH vzorků se využívá ředění substrátu základního koncentrátu elučního pufru. K přípravě základního roztoku, rovněž tak ostatních elučních pufrů používáme upravenou vodu, například deionizovanou a převařenou. Voda nesmí obsahovat amoniak. Například v deionizované vodě rozpustíme 105,0 g kyseliny citrónové a 126,0 g hydroxidu lithného. Konečný objem roztoku je 1 000 ml. Tento koncentrát se pak přidává do složení lithiocitronanových elučních pufrů.

Analyzátory aminokyselin nacházejí využití v biochemických laboratořích základního výzkumu, ve výzkumu výživy lidí i zvířat, v potravinářském a krmivářském průmyslu, ve zdravotnictví jako v diagnostice dědičných metabolických poruch, zejména u dětí, tak ve farmacii a v řadě příbuzných vědeckých i průmyslových oborů.

T a b u l k a 1

Příklad použití pufrů při analýzách

Typ analyzátoru:	1.	2.
Typ ionexu	Ostion LGKS 0803	Ostion LGANB
Rozměr kolony:	0,8 x 62,0 cm	0,37 x 45,0 cm
Výška ionexu v koloně:	57,0 cm	23,5 cm
Průtok pufru	70 ml.h ⁻¹	15,0 ml.h ⁻¹
Průtok ninhydrinu	35 ml.h ⁻¹	10,0 ml.h ⁻¹
Teplota: T ₁	38 °C	38 °C
T ₂	60 °C	60 °C
Pufr: P I	pH 2,64±0,02	pH 2,64±0,02
P II	pH 3,50±0,02	pH 3,50±0,02
P III	pH 4,30±0,02	pH 4,30±0,02
Program: Změny pufru	0 až 194 min pufr. I (za vrchol Ala)	0 až 56 min pufr I (na vrchol Glu)
	194 až 301 min pufr. II (za vrchol Tyr)	56 až 131 min pufr. II (za vrchol Tyr)
	301 až 560 min pufr. III (do konce analýzy)	131 až 272 min pufr. III (do konce analýzy)
Teplotní změny:	0 až 156 min T ₁ (za Pro)	0 až 56 min T ₁ (na vrcholu Glu)
	156 až 560 min T ₂ (do konce analýzy)	56 až 272 min T ₂ (do konce analýzy)
Celková doba analýzy:	560 min	272 min
Doba regenerace:	20 min	20 min
Doba stabilizace:	120 min	100 min

Poznámka: U obou analyzátorů je zapotřebí použít předkolon k odstraňování amoniaku z prvního pufru.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Substrát pro přípravu elučních pufrů pro analyzátory aminokyselin na bázi citrátu lithného, vyznačující se tím, že obsahuje 100 až 110 g kyseliny citronové a 120 až 130 g hydroxidu lithného a popřípadě vodu.
2. Substrát podle bodu 1, vyznačující se tím, že obsahuje antioxidační činidlo například thiodiglykol.
3. Substrát podle bodu 1 nebo 2, vyznačující se tím, že obsahuje smáčedlo, například polyhydroxiethylenlaurylether.
4. Substrát podle bodu 1 nebo 2, vyznačující se tím, že obsahuje konzervační činidlo, například kyselinu kaprylovou.