



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

207916

(11)

B1

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 02 01 79
(21) PV 8-79

(51) Int. Cl.³ G 01 N 31/22

(40) Zveřejněno 28 11 80
(45) Vydáno 02 08 83

(75)

Autor vynálezu FISCHER JIŘÍ RNDr., MEDEK JIŘÍ prom.chem., MACHÁT RICHARD ing., JURÁK KAREL PhMr.,
KEPRTOVÁ EVA ing., PARTL VLADIMÍR, KVASNIČKA JOSEF, PULKRÁBEK KAREL RNDr.,
VERMOUSEK IVAN RNDr., BRNO, BALÁČ VLADIMÍR, KYJOV, LIŠKA JAROMÍR, LELEKOVICE

(54) Činidlo ke stanovení aktivity alfa-amylázy

Činidlo ke stanovení aktivity alfa-amylázy.
V klinické biochemii slouží zvýšená aktivita k diagnostice akutních příhod podjaterní krajiny, hlavně pankreatid a k diagnostice paratitid. Stanovení aktivity alfa-amylázy má význam nejen v humánní ale i ve veterinární medicíně. Činidlo pro stanovení aktivity alfa-amylázy ve formě tablety nebo vodné suspenze sestává z daných množství upraveného škrobu, stabilizátoru pH činidla, aktivátorů reakčního systému, chloridů alkalických kovů, albuminu, polyvinylpyrrolidonu v určitých poměrech.

Předmětem vynálezu je činidlo ke stanovení aktivity alfa-amylázy.

Pro stanovení aktivity alfa-amylázy (alfa-1,4-glukan-4-glukanohydrolázy E.C.3.3.1.1.) byla navržena celá řada postupů založených na schopnosti alfa-amylázy štěpit škrob a jeho složky amylázu a amylopektin.

Přihlédneme-li k způsobu využití průběhu lytické reakce pro analytické účely, lze rozdělit postupy do čtyř skupin.

Do první skupiny patří metody sacharometrické, určující aktivitu z přírůstků redukujících skupin. Vzhledem k tomu, že aktivita enzymů se určuje jako množství rozštěpených vazeb substrátu za sekundu, je její sacharometrické určení, oproti postupům zbylých tří skupin, poměrně jednoduché.

Do druhé skupiny patří postupy amyloklastické, určující aktivitu z poklesu koncentrace toho podílu substrátu, který je schopen vytvořit s jodem modře zbarvený komplex. Do této skupiny je třeba zařadit metody viskozimetrické a nefelometrické, všechny jsou v podstatě funkcí molekulové váhy substrátu.

Třetí skupinu metod, rozvíjejících se v současné době, představuje postupy chromolytické, u nichž se určuje aktivita z přírůstků štěpných průduktů vzniklých působením enzymu na kovalentně obarvený škrob. Při vhodné úpravě postupu lze pak docílit toho, že se sleduje vznik nízkomolekulárních štěpných produktů, čímž se modeluje pseudosacharometrický charakter postupu.

Do čtvrté skupiny lze zařadit metody, které nemají určený profil jednoznačně. Patří sem postupy enzymatické, založené v podstatě na enzymatickém stanovení maltózy. Maltóza se stanoví pomocí vhodné enzymatické reakce na glukosu. Hexokináza, glukosodehydrogenáza.

Současný metodický rozvoj je spojen se stále rostoucím významem stanovení alfa-amylázy. Tak v klinické biochemii zvýšená aktivita slouží k diagnostice akutních příhod podja-terní krajiny, hlavně pankreatid a k diagnostice paratitid. Stanovení aktivity alfa-amylázy má význam nejen v humánní, ale i ve veterinární medicíně. S nástupem využívání moderních bioinženýrských postupů jako kotvené enzymy apodobně se tento vývoj promítá v běžné biochemické praxi. Pro rutinní provoz se nejčastěji užívá metod druhé a třetí skupiny, které umožňují velmi jednoduchá provedení postupu. Jejich nevýhodou, společnou i pro metody čtvrté skupiny je, že není možné přímé zjištění aktivity analyzovaného produktu, že je nutná kalibrace. V současné době se rozvíjí metody třetí skupiny a v souladu s rozvojem automatických analyzátorů i speciální enzymové postupy čtvrté skupiny. Z ekonomického, analytického i praktického hlediska pro běžnou praxi se jeví nejúčelnější využívání metod třetí skupiny. Spřezané enzymové metody jsou ekonomicky značně náročnější, a to jak z hlediska složení reakční směsi, tak z hlediska provedení, neboť počáteční průběh reakce je nelineární. Jsou využívány pouze u některých druhů automatických analyzátorů.

Z výše uvedených důvodů vyplývá, že u chromolytických metod pro stanovení alfa-amylázy se soustřeďuje pozornost nejvíce na jednoduchost a správnost postupů a provedení. Z těchto důvodů se rozšiřuje užití komerčních přípravků v podobě roztoků nebo tablet. Takto

upravená činidla jsou zvláště výhodná, protože umožňují pohodlné startování enzymové reakce substrátem dle mezinárodních doporučení.

Činidla v podobě tablety se musí dostatečně rychle rozpadnout a musí zajistit pro vlastní reakci snadné oddělení supernatantu od nerozpustných zbytků tablety. U některých stávajících tablet se však setkáváme s tím, že se právě tyto zbytky těžko odstraňují a zvyšuje se tím pracnost a jsou i příčinou chyb při vlastním měření.

Výše uvedené nevýhody podstatně omezuje složení činidla podle vynálezu. Jeho podstata spočívá v tom, že činidlo pro stanovení aktivity alfa-amylázy sestává z 25 až 95 % hmotnostních upraveného škrobu, 4 až 20 % hmotnostních stabilizátoru pH činidla v rozmezí hodnot 6,5 až 7,5, 1 až 55 % hmotnostních aktivátorů reakčního systému, například kyseliny cholové nebo jejích derivátů, chloridů alkalických kovů, například sodného nebo draselného, albuminu, polyvinylpyrrolidonu nebo jejich směsí, například směs kyseliny cholové, chloridu sodného a albuminu v hmotnostním poměru 1 ku 5 ku 20 až 1 ku 25 ku 100 nebo směs kyseliny desoxycholové, chloridu sodného a albuminu v poměru 1 ku 4 ku 20 až 1 ku 30 ku 100 nebo směs kyseliny cholové, chloridu draselného a polyvinylpyrrolidonu v poměru 1 ku 8 ku 10 až 1 ku 20 ku 50. Činidlo s výhodou obsahuje 20 až 30 % hmotnostních stabilizátoru vodné suspenze, například bentonitu, talku, mikrokrystalické celulosy, koloidního kysličníku křemičitého, kysličníku titaničitého, křemeliny nebo jejich směsí, například směs koloidního kysličníku křemičitého, mikrokrystalické celulosy a křemeliny v hmotnostním poměru 1 ku 5 ku 10 až 1 ku 20 ku 100 nebo směs koloidního kysličníku křemičitého, bentonitu, mikrokrystalické celulosy a křemeliny v hmotnostním poměru 1 ku 1 ku 3 ku 6 až 1 ku 2 ku 10 ku 50 nebo směs koloidního kysličníku křemičitého, bentonitu, talku, mikrokrystalické celulosy a křemeliny v hmotnostním poměru 1 ku 2 ku 2 ku 5 ku 5 až 1 ku 3 ku 5 ku 10 ku 50. Upravený škrob je s výhodou frakcionovaně přesrážený obarvený škrob, jeho složky nebo jeho frakce. Jako stabilizátoru pH v rozmezí hodnot 6,5 až 7,5 se s výhodou použije fosfátový tlumič, tris(hydroxymethyl)-aminomethanový tlumič nebo tlumič na bázi derivátů kyseliny barviturové.

Touto úpravou činidla se získá snadno odstranitelný zbytek i čirý supernatant. Složení činidla je voleno tak, aby po přidání do inkubačního roztoku se vytvořila stabilní suspenze. Použité pomocné látky jsou voleny tak, aby po zastavení reakce strhly zbytky substrátu a tím vyčerily supernatant.

Pro praktické použití jsou níže uvedeny tyto příklady možného složení činidla:

P ř í k l a d 1

Barvený škrobový substrát	40 %
Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát	6 %
Dihydrogenfosforečnan draselný	1,5 %
Albumin hovězí lyofilisovaný	5 %
Kyselina cholová	0,1 %
Chlorid sodný	0,9 %
Křemelina	27,5 %

Celulosa mikrokrytalická	15 %
Koloidní kysličník křemičitý	2,5 %
Bentonit (upravovaný přírodní materiál na bázi křemičitanu hlinitého)	1,5 %
Váha tablety v rozmezí 0,1 až 0,2 g.	

P ř í k l a d 2

Barevný škrobový substrát	35 %
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan	1 %
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan hydrochlorid	7 %
Albumin hovězí lyofilizovaný	4 %
Kyselina choleová	0,2 %
Křemelina	38,3 %
Celulosa mikrokrytalická	12 %
Koloidní kysličník křemičitý	2,5 %
Váha tablety v rozmezí 0,1 až 0,2 g.	

P ř í k l a d 3

Barevný škrobový substrát	76,3 %
Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát	8 %
Dihydrogenfosforečnan draselný	1,5 %
Chlorid draselný	4 %
Polyvinylpyrrolidon	10 %
Váha tablety v rozmezí 0,1 až 0,2 g.	

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Činidlo pro stanovení aktivity alfa-amylázy ve formě tablety nebo vodné suspenze vyznačené tím, že sestává z 25 až 95 % hmotnostních upraveného škrobu, 4 až 20 % hmotnostních stabilizátoru pH činidla v rozmezí hodnot 6,5 až 7,5, 1 až 55 % hmotnostních aktivátorů reakčního systému například kyseliny choleové nebo jejích derivátů, chloridů alkaliických kovů například sodného nebo draselného, albuminu, polyvinylpyrrolidonu nebo jejich směsí například směsi kyseliny choleové, chloridu sodného a albuminu v hmotnostním poměru 1 ku 5 ku 20 až 1 ku 25 ku 100 nebo směsi kyseliny desoxycholeové, chloridu sodného a albuminu v poměru 1 ku 4 ku 20 až 1 ku 30 ku 100 nebo směsi kyseliny choleové, chloridu draselného a polyvinylpyrrolidonu v poměru 1 ku 8 ku 10 až 1 ku 20 ku 50 a popřípadě 20 až 30 % hmotnostních stabilizátoru vodné suspenze například bentonitu, talku, mikrokrytalické celulosy, koloidního kysličníku křemičitého, kysličníku titaničitého, křemeliny nebo jejich směsí například směsi koloidního kysličníku křemičitého, mikrokrytalické celulosy a křemeliny v hmotnostním poměru 1 ku 5 ku 10

až 1 ku 20 ku 100 nebo směs koloidního kysličníku křemičitého, bentonitu, mikrokrytalické celulosy a křemeliny v hmotnostním poměru 1 ku 1 ku 3 ku 6 až 1 ku 2 ku 10 ku 50 nebo směs koloidního kysličníku křemičitého, bentonitu, talku, mikrokrytalické celulosy a křemeliny v hmotnostním poměru 1 ku 2 ku 2 ku 5 ku 5 až 1 ku 3 ku 5 ku 10 ku 20.

2. Činidlo podle bodu 1 vyznačené tím, že upraveným škrobem je frakcionovaně přesrážený obarvený škrob, jeho složky nebo jeho frakce.
3. Činidlo podle bodu 1 nebo 2 vyznačené tím, že stabilizátorem pH v rozmezí hodnot 6,5 až 7,5 je fosfátový tlumič tris(hydroxymethyl)-aminomethanový tlumič nebo tlumič na bázi derivátů kyseliny barbiturové.