



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2009135209/15, 21.09.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.09.2009

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 21.09.2009

(45) Опубликовано: 27.04.2011 Бюл. № 12

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: MORISHITA Y. et al. Total and pancreatic amylase measured with 2-chloro-4-nitrophenyl-4-O-β-D-galactopyranosylmaltoside//Clinical Chemistry, 2000, V.46, P.P.928-933. CN 1500886 A 02.06.2004. ЯКОВЛЕВА Г.Е. Набор реагентов «Амилаза-Ново» для определения α-амилазы в сыворотке крови и моче // Новости «Вектор-Бест», 1999 Декабрь, (см. прод.)

Адрес для переписки:

630117, г.Новосибирск, а/я 5, Л.Я. Кучумовой

(72) Автор(ы):

Яковлева Галина Евгеньевна (RU),
Черемисина Ксения Александровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Закрытое акционерное общество "Вектор-Бест" (RU)

(54) НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ α-АМИЛАЗЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и касается набора реагентов для определения активности панкреатической α-амилазы, включающего реагент 1, содержащий хлорид натрия, калий роданистый, азид натрия, водорастворимую соль кальция, моноклональные антитела к слюнной α-амилазе (MAT), 2-морфолиноэтансульфоновую кислоту (MES) и воду и реагент 2, содержащий 2-хлор-4-нитрофенил-4-O-β-D-галактопиранозилмальтозит (GalG₂CNP), MES

и воду, отличающегося тем, что реагент 1 дополнительно содержит EDTA и бычий сывороточный альбумин (БСА), а в качестве соли кальция - ацетат кальция, а реагент 2 дополнительно содержит EDTA и азид натрия, при указанном в формуле изобретения соотношении компонентов. Предложенный набор реагентов обладает повышенной стабильностью при сохранении высокой точности и воспроизводимости результатов анализа. 1 табл.

(56) (продолжение):

№14. ЯКОВЛЕВА Г.Е. Ферменты в клинической биохимии. - Новосибирск: «Вектор-Бест», 2005, С.18-19. ЧЕРЕМИСИНА К.А. Определение активности панкреатической α-амилазы // Новости «Вектор-Бест», 2009, №3(53). «Панкреатическая амилаза (Pancreas-amylase liquidcolor)», Реагенты фирмы «HUMAN», Германия, Перевод на русский язык ЗАО «АНАЛИТКА». - М., 2006.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION(21)(22) Application: **2009135209/15, 21.09.2009**(24) Effective date for property rights:
21.09.2009

Priority:

(22) Date of filing: **21.09.2009**(45) Date of publication: **27.04.2011 Bull. 12**

Mail address:

630117, g.Novosibirsk, a/ja 5, L.Ja. Kuchumovoj

(72) Inventor(s):

**Jakovleva Galina Evgen'evna (RU),
Cheremisina Ksenija Aleksandrovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Zakrytoe aktsionernoe obshchestvo "Vektor-Best"
(RU)****(54) KIT OF REAGENTS FOR PANCREATIC α -AMYLASE ACTIVITY TEST**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention concerns a kit of reagents for pancreatic α -amylase activity test including a reagent 1 containing sodium chloride, potassium sulphocyanate, sodium azide, water-soluble calcium salt, monoclonal salivary α -amylase antibodies (MAB), 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES) and water, and a reagent 2 containing 2-chloring-4-nitrophenyl-4-O- β -D-galactopyranosylmaltoside (GalG₂CNP), MES and

water, differing by the fact that the reagent 1 in addition contains EDTA and bovine serum albumin (BSA), and as calcium salt, it contains calcium acetate, and the reagent 2 in addition contains EDTA and sodium azide in the proportions specified in the patent claim.

EFFECT: enhanced stability of the set of reagents with maintaining high accuracy and result reproducibility of the analysis.

1 tbl, 4 ex

Изобретение относится к области медицины и биохимии, а именно к созданию реагентов, позволяющих определять активность панкреатической α -амилазы в сыворотке, плазме крови и моче.

5 Наиболее распространенным для определения активности панкреатической α -амилазы является метод, одобренный Международной федерацией клинической химии (IFCC), с использованием в качестве субстрата 4,6-ethylidene-(G₇)-p-nitrophenil-(G₁)- α ,D-maltoheptaoside (4,6-этилден-(G₇)-п-нитрофенил-(G₁)- α ,D-мальтогептазид; Et-G₇PNP). Первой стадией реакции является селективное ингибирование активности
 10 слюнного изофермента α -амилазы с помощью моноклональных антител (МАТ) к слюнной α -амилазе. Оставшаяся активной панкреатическая α -амилаза расщепляет Et-G₇PNP до G₂PNP, G₃PNP, G₄PNP, Et-G₃, Et-G₄ и Et-G₅. После этого α -глюкозидаза гидролизует G₂PNP, G₃PNP и G₄PNP с образованием глюкозы и окрашенного вещества п-нитрофенола. Скорость накопления окрашенного продукта прямо
 15 пропорциональна активности панкреатической α -амилазы в образце (Kruse-Jarres J.D., Kaiser C., Hafkenschied J.C.M. et al. Evaluation of a new α -amylase assay using 4,6-ethylidene-(G₇)-1-4-nitrophenil-(G₁)- α -D-maltoheptaoside as substrate // J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1988. Vol.27. P.103-113).

20 Основным недостатком метода является использование дополнительного фермента для получения окрашенного продукта.

Наиболее близким к заявленному набору реагентов - прототипом, является набор реагентов для определения активности панкреатической α -амилазы кинетическим
 25 колориметрическим методом, состоящий из двух реагентов, имеющих следующий состав компонентов: реагент 1 - хлорид натрия 50-500 ммоль/л, калий роданистый (KSCN) 50-400 ммоль/л, азид натрия 1-90 ммоль/л, хлорид кальция 0,5-10,0 ммоль/л, МАТ 5-100 мг/л, MES (2-морфолиноэтансульфоная кислота) 50 ммоль/л, рН 5-8, вода - остальное; реагент 2 - 2-chloro-4-nitrophenyl-4-O- β -D-galactopyranosylmaltoside (2-хлор-4-нитрофенил-4-O- β -D-галактопиранозилмальтозит; GalG₂CNP) 2,4-12 ммоль/л, MES 50 ммоль/л, рН 5-8, вода - остальное (Morishita Y., Inuma Y., Nakashima N., et al. Total and pancreatic amylase measured with 2-chloro-4-nitrophenyl-4-O- β -D-galactopyranosylmaltoside // Clinical Chemistry. 2000. Vol 46. P.928-933).

35 В основу набора для определения панкреатической α -амилазы положен кинетический колориметрический метод, заключающийся в том, что на первой стадии слюнной изофермент α -амилазы ингибируется с помощью МАТ, на второй стадии - панкреатическая α -амилаза гидролизует GalG₂CNP с образованием окрашенного продукта 2-chloro-4-nitrophenol и неокрашенного - 4-O- β -D-galactopyranosylmaltose.
 40 Скорость накопления окрашенного продукта прямо пропорциональна активности панкреатической α -амилазы в образце.

Недостатком прототипа является небольшой срок хранения реагентов - 3 месяца при температуре 4°C.

45 Технической задачей изобретения является повышение стабильности набора реагентов для определения панкреатической α -амилазы в сыворотке, плазме крови и моче и продление срока его хранения при сохранении высокой точности и воспроизводимости результатов анализа.

50 Поставленная техническая задача достигается предлагаемым набором реагентов, включающим два жидких реагента, готовых к использованию, при этом первый реагент (реагент 1) дополнительно содержит EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) и бычий сывороточный альбумин (БСА), а хлорид кальция заменен на ацетат кальция; второй реагент (реагент 2) дополнительно содержит EDTA и азид натрия.

Предлагаемый набор реагентов включает следующие компоненты:

реагент 1, содержащий хлорид натрия 50-500 ммоль/л, KSCN 50-400 ммоль/л, азид натрия 1-90 ммоль/л, EDTA 0,2-5,0 ммоль/л, ацетат кальция 0,7-10,0 ммоль/л, БСА 0,5-2 мас.%, МАТ 12,0-25,0 мг/л, MES 50 ммоль/л, pH 5,5-6,5, вода - остальное; реагент 2,
5 содержащий азид натрия 1-90 ммоль/л, EDTA 0,2-5,0 ммоль/л, GalG₂CNP 2,5-20 ммоль/л, MES 50 ммоль/л, pH 5,5-6,5, вода - остальное.

Данный набор реагентов характеризуется правильностью определения активности панкреатической α-амилазы 100±5% с воспроизводимостью результатов (коэффициент
10 вариации) менее 5%. Срок хранения набора реагентов при температуре 2-8°C составляет 1 год.

Включение в состав реагента 1 новых компонентов - EDTA, образующей комплексные соединения с большинством катионов, БСА - способствующего
15 стабильности антител, а также замена хлорида кальция на консервант ацетат кальция, позволяет повысить стабильность реагента 1 и продлить срок его годности до 1 года.

Включение в состав реагента 2 нового компонента - EDTA, образующей комплексные соединения с большинством катионов, а также добавление консерванта -
20 азида натрия позволяет повысить стабильность реагента 2 и продлить срок его годности до 1 года.

Определение активности панкреатической α-амилазы осуществляется при температуре реагентов 37°C следующим образом: к 25 мкл пробы добавляют 1 мл
25 реагента 1, выдерживают 5 минут и добавляют 0,25 мл реагента 2, через 1 мин начинают считывать оптическую плотность через равные промежутки времени в течение 1-3 мин при длине волны 405 нм, при этом количество считываний должно быть не менее трех. Активность панкреатической α-амилазы (А) в Е/л рассчитывают по формуле:

$$A = \Delta E / \text{мин} \times 2757,$$

30 Где ΔE/мин - среднее изменение оптической плотности за минуту;

2757 - фактор пересчета по уравнению Бугера-Ламберта-Бера.

Определяющими существенными отличиями предлагаемого набора реагентов для определения активности панкреатической α-амилазы в сыворотке, плазме крови и
35 моче, по сравнению с прототипом, являются:

- реагент 1 дополнительно содержит EDTA и БСА, что позволяет повысить стабильность набора реагентов при хранении;

- в реагенте 1 хлорид кальция заменен на ацетат кальция, что позволяет повысить стабильность набора реагентов при хранении;

40 - реагент 2 дополнительно содержит EDTA, что позволяет повысить стабильность набора реагентов при хранении;

все компоненты в наборе использованы в оптимальных, экспериментально подобранных концентрациях, что позволяет повысить функциональность и расширить область применения набора.

45 Изобретение иллюстрируется следующими примерами конкретного выполнения.

Пример 1

Готовят реагент 1 и реагент 2.

Для приготовления реагента 1 делают навески на аналитических весах каждого
50 компонента. Переносят их в стеклянный стакан и растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды. Раствор тщательно перемешивают на магнитной мешалке и доводят pH под контролем pH-метра до 6,0. Затем раствор переносят в мерную колбу вместимостью 1 литр, доводят объем до метки дистиллированной водой

и тщательно перемешивают.

Для приготовления реагента 2 делают навески на аналитических весах каждого компонента. Переносят все навески, кроме GalG₂CNP, в стеклянный стакан и растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды. Раствор тщательно перемешивают на магнитной мешалке, доводят рН под контролем рН-метра до 6,0. Далее раствор переносят в мерную колбу вместимостью 1 литр, доводят объем до метки дистиллированной водой, перемешивают, добавляют навеску GalG₂CNP и вновь тщательно перемешивают на магнитной мешалке.

В результате получают набор реагентов для определения панкреатической α-амилазы в сыворотке, плазме крови и моче, который включает:

реагент 1, содержащий:

Хлорид натрия, ммоль/л - 50,0

KSCN, ммоль/л - 400,0

Азид натрия, ммоль/л - 90,0

EDTA, ммоль/л - 0,2

Ацетат кальция, ммоль/л - 0,7

БСА, мас.% - 2,0

МАТ, мг/л - 12,0

MES, ммоль/л - 50,0

Вода - остальное;

реагент 2, содержащий:

Азид натрия, ммоль/л - 90,0

EDTA, ммоль/л - 0,2

GalG₂CNP, ммоль/л - 2,5

MES, ммоль/л - 50,0

Вода - остальное.

При этом значение рН реагента 1 и реагента 2 составляет 5,9

Пример 2

Приготовление реагента 1 и реагента 2 осуществляют аналогично примеру 1.

Получают набор реагентов для определения панкреатической α-амилазы в сыворотке, плазме крови и моче, который включает:

реагент 1, содержащий:

Хлорид натрия, ммоль/л - 200,0

KSCN, ммоль/л - 150,0

Азид натрия, ммоль/л - 20,0

EDTA, ммоль/л - 2,5

Ацетат кальция, ммоль/л - 5,0

БСА, мас.% - 1,0

МАТ, мг/л - 25,0

MES, ммоль/л - 50,0

Вода - остальное;

реагент 2, содержащий:

Азид натрия, ммоль/л - 20,0

EDTA, ммоль/л - 2,5

GalG₂CNP, ммоль/л - 20,0

MES, ммоль/л - 50,0

Вода - остальное.

При этом значение рН реагента 1 и реагента 2 составляет 5,5.

Пример 3

Приготовление реагента 1 и реагента 2 осуществляют аналогично примеру 1. Получают набор реагентов для определения панкреатической α -амилазы в сыворотке, плазме крови и моче, который включает:

реагент 1, содержащий:

Хлорид натрия, ммоль/л - 500,0

KSCN, ммоль/л - 50,0

Азид натрия, ммоль/л - 1,0

EDTA, ммоль/л - 5,0

Ацетат кальция, ммоль/л - 10,0

БСА, мас. % - 0,5

МАТ, мг/л - 20,0

MES, ммоль/л - 50,0

Вода - остальное;

реагент 2, содержащий:

Азид натрия, ммоль/л - 1,0

EDTA, ммоль/л - 5,0

GalG₂CNP, ммоль/л - 10,0

MES, ммоль/л - 50,0

Вода - остальное.

При этом значение pH реагента 1 и реагента 2 составляет 6,5.

Пример 4 Определение активности панкреатической α -амилазы в контрольных сыворотках.

К 1 мл реагента 1, прогретому до температуры 37°C, добавили 25 мкл контрольной сыворотки «Precinorm U», выдержали 5 минут при температуре 37°C и добавили 0,25 мл реагента 2. Через 1 мин начали считывать оптическую плотность через равные промежутки времени в течение 1-3 мин при длине волны 405 нм. Аналогичную процедуру повторили для контрольных сывороток «Precipath U», «c.f.a.s.», «Contornorm», «Contropath», «BioCal E». Результаты анализа приведены в таблице.

| Таблица | | |
|-----------------------------------|---|---------------------------|
| Контрольная сыворотка | Аттестованное значение активности панкреатической α -амилазы (IFCC), Е/л | Полученный результат, Е/л |
| «Precinorm U» («Roche», Германия) | 40,8 (33,6-48,0) | 40 |
| «Precipath U» («Roche», Германия) | 102(84-120) | 102 |
| «c.f.a.s.» («Roche», Германия) | 162 | 164 |
| «Contornorm» («Biocon», Германия) | 40,1 (32,9-47,3) | 41 |
| «Contropath» («Biocon», Германия) | 102 (84-120) | 101 |
| «BioCal E» («Biocon», Германия) | 171 | 177 |

Из таблицы 1 видно, что предлагаемый реагент обеспечивает высокую точность определения активности панкреатической α -амилазы в сыворотке, плазме крови и моче.

Использование предлагаемого набора реагентов позволит, по сравнению с прототипом:

- увеличить срок годности набора до 1 года путем обеспечения стабильности реагентов;

- расширить область применения и повысить функциональность набора за счет обеспечения возможности работы с ним в условиях клинико-диагностических, поликлинических и биохимических лабораторий.

Предлагаемый набор реагентов доступен для любой клинико-диагностической, поликлинической и биохимической лаборатории и позволяет получать точные, достоверные результаты анализа, соответствующие зарубежным стандартам.

5

Формула изобретения

Набор реагентов для определения активности панкреатической α -амилазы, включающий реагент 1, содержащий хлорид натрия, калий роданистый, азид натрия, водорастворимую соль кальция, моноклональные антитела к слюнной α -амилазе (МАТ), 2-морфолиноэтансульфоновую кислоту (MES) и воду и реагент 2, содержащий 2-хлор-4-нитрофенил-4-O- β -D-галактопиранозилмальтозит (GalG₂CNP), MES и воду, отличающийся тем, что реагент 1 дополнительно содержит EDTA и бычий сывороточный альбумин (БСА), а в качестве соли кальция - ацетат кальция, а реагент 2 дополнительно содержит EDTA и азид натрия, при следующем соотношении компонентов:

15

| | | |
|----|--------------------------------|-------------------|
| | реагент 1 | |
| | Хлорид натрия, ммоль/л | 50,0-500,0 |
| | KSCN, ммоль/л | 50,0-400,0 |
| 20 | Азид натрия, ммоль/л | 1,0-90,0 |
| | EDTA, ммоль/л | 0,2-5,0 |
| | Ацетат кальция, ммоль/л | 0,7-10,0 |
| | БСА, мас. % | 0,5-2,0 |
| | МАТ, мг/л | 12,0-25,0 |
| 25 | MES, ммоль/л | 50,0 |
| | Вода, л | Остальное до 1 л; |
| | реагент 2 | |
| | Азид натрия, ммоль/л | 1,0-90,0 |
| | EDTA, ммоль/л | 0,2-5,0 |
| 30 | GalG ₂ CNP, ммоль/л | 2,5-20,0 |
| | MES, ммоль/л | 50,0 |
| | Вода, л | Остальное до 1 л, |

при этом значение рН реагента 1 и реагента 2 составляет 5,5-6,5.

35

40

45

50