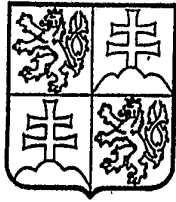


ČESKÁ A SLOVENSKÁ  
FEDERATIVNÍ  
REPUBLIKA  
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD  
PRO VYNÁLEZY

# POPIS VYNÁLEZU

## K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

272 329

(21) PV 439-88.H  
(22) Přihlášeno 22 01 88

(40) Zveřejněno 14 05 90  
(45) Vydáno 21 10 91

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>  
G 01 N 33/49

(75) Autor vynálezu MAREK MIROSLAV doc. ing. CSc.,  
VALENTOVÁ OLGA RNDr. CSc., PRAHA  
SOLICH PĚTR RNDr. CSc., LHOTA POD LIBČANY

(54) Enzymový reaktor pro stanovení močoviny

(57) Enzymový reaktor je tvořen trubičkou nebo hadičkou, v níž je na částice porézního skla potaženého polyglycidymethakrylátovým gelem imobilizována ureasa kovalentní vazbou po přímé chemické reakci enzymu s reaktivními epoxyskupinami polymeru.

Vynález se týká enzymového reaktoru pro stanovení močoviny na bázi imobilizované ureasy.

Velké možnosti využití enzymů v analytické chemii jsou dány vysokou substrátovou a účinkovou specifiitou enzymů a dále jejich schopností katalyzovat reakce při velmi nízkých koncentracích substrátů. Širšímu uplatnění enzymových metod v běžné analytické praxi však do značné míry brání poměrně vysoká cena enzymů, a tím i enzymových stanovení. Tento problém je postupně řešen náhradou rozpustných enzymů imobilizovanými enzymy použitelnými pro velký počet analys.

Vedle přesnosti a citlivosti jsou v mnoha oblastech analytické chemie, zvláště potom v klinické diagnostice, kladeny velké požadavky na rychlost analyzy automatizace. Z tohoto hlediska je velmi atraktivní poměrně nová metoda průtokové injekční analyzy. Tento analytický postup ve spojení s enzymovou katalysou umožňuje oddělit vlastní enzymovou reakci uskutečňovanou pomocí heterogenního biokatalyzátoru a následnou detekci vzniklých reakčních produktů až již na bázi kolorimetrického elektrochemického nebo jiného způsobu stanovení. V tomto uspořádání je možno provádět diagnosticky velmi důležitá stanovení močoviny ve fyziologických tekutinách. Stanovení je založeno na rozkladu močoviny pomocí imobilizované ureasy a na následné detekci vzniklého amoniaku elektrochemicky pomocí skleněné pH elektrody selektivní na  $\text{NH}_4^+$  inoty nebo jiné amonné elektrody.

Nejdůležitějším faktorem determinujícím možnosti širšího uplatnění uvedeného enzymového reaktorového systému je stabilita imobilizované ureasy. Na stabilitu imobilizovaného enzymu má vliv celá řada faktorů, z nichž největší význam mají způsob imobilizace a podmínky provozu. Problematice imobilizace ureasy byla věnována značná pozornost. Byla vypracována celá řada technik především kovalentní vazby ureasy na různé nosiče (viz například Chibata I.: Immobilized Enzymes, Research and Development, Kodansha, Tokyo (1978), Wiseman A.: Handbook of Enzyme Biotechnology, Ellis Horwood, Chichester (1975)). Přes veškeré toto úsilí zůstává otázka reaktoru s imobilizovanou ureasou, který by vyhovoval jak z hlediska rigidity systému, hydrodynamických vlastností, dostatečné enzymové aktivity a především stability imobilizované ureasy, stále otevřená.

Uvedené nevýhody odstraňuje enzymový reaktor, obsahující částice porézního skla potaženého polyglycidylmethakrylátovým gelem pro stanovení močoviny na bázi imobilizované ureasy podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že je tvořen trubičkou nebo hadičkou, ve které je na částice porézního skla potaženého polyglycidylmethakrylátovým gelem imobilizována ureasa kovalentní vazbou po přímé chemické reakci enzymu s reaktivními epoxyskupinami polymeru.

Enzymový reaktor lze používat ve spojení s následnou elektrochemickou detekcí vzniklého amoniaku nebo s jeho kolorimetrickým stanovením po smíchání reagujících komponent (fenolátů s chlornanem).

Výhodou enzymového reaktoru na stanovení močoviny podle vynálezu je vedle experimentální jednoduchosti jeho přípravy především vysoká stabilita umožňující provádět během dvou měsíců kolem tisíce analys, po kterých poklesne aktivita cca o 35 %, což umožňuje s ohledem na kapacitní rezervu imobilizované ureasy pokračující využívání reaktoru při dalších analysách.

Vynález je dokumentován příkladem použití, aniž by se jím omezoval.

#### Příklad provedení

1 g porézního skla potaženého polyglycidylmethakrylátem byl smíchán se 100 mg ureasy ve 40 ml 0,05 M fosfátového pufru pH 6,9, 20  $\mu\text{mol}$   $\text{Na}_2\text{EDTA}$  a 5  $\mu\text{mol}$  2-merkaptóetanolu. Směs byla třepána 16 h při 20  $^{\circ}\text{C}$ . Po ukončení vazebné reakce byl nosič s navázaným enzymem promýván střídavě pufrům použitým pro vazebnou reakci a tímtéž pufrům obsahujícím 1 M NaCl. Aktivita připraveného preparátu imobilizované ureasy byla 1,95 nkat/mg vlhkého nosiče. Preparát byl skladován při 4  $^{\circ}\text{C}$ .

Připravený heterogenní biokatalyzátor byl použit ve formě enzymového reaktoru pro stanovení močoviny v systému průtokové injekční analýsy.

#### P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Enzymový reaktor, obsahující částice porézního skla potaženého polyglycidylmethakrylátovým gelem pro stanovení močoviny na bázi imobilizované ureasy, vyznačující se tím, že je tvořen trubičkou nebo hadičkou, ve které je na částice porézního skla potaženého polyglycidylmethakrylátovým gelem imobilizována ureasa kovalentní vazbou po přímé chemické reakci enzymu s reaktivními epoxyskupinami polymeru.