



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

266 651

(21) PV 253-86.F
(22) Přihlášeno 13 01 86

(40) Zveřejněno 12 05 89
(45) Vydáno 3.12.1990

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴

G 01 N 31/22

(75)
Autor vynálezu

ZAHRADNÍČEK LUDĚK RNDr.,
CHROMÝ VRATISLAV ing. CSc.,
MALÝ MILAN RNDr., BRNO

(54)

Činidlo pro stanovení katalytické koncentrace
gama-glutamyltransferasy

(57) Řešení se týká činidla pro stanovení katalytické koncentrace gama-glutamyltransferasy, které se používá v humánní medicíně při diagnostice jaterních chorob. Činidlo podle vynálezu obsahuje kyselinu amidosulfonovou nebo její soli, kyselinu naftalen-2,5-disulfonovou nebo její soli, N-naftylethylethylendiamin a polyethylenglykol v určitých molárních poměrech a dále polyethylenglykol a popřípadě kyselinu. Činidlo dále obsahuje amidosulfonan amonný, kyselinu naftalen-2,5-disulfonovou v dané koncentraci. Činidlo je ve srovnání s doposud používanými metodami stabilní, citlivé.

Vynález se týká činidla na stanovení katalytické koncentrace gama-glutamyltransferasy.

Stanovení katalytické koncentrace gama-glutamyltransferasy v krevním séru nebo plazmě je velmi cennou analýsou, umožňující značné zpřesnění diferenciální diagnostiky jaterních chorob. Proto se stalo od svého zavedení do klinické praxe v první polovině sedmdesátých let jednou z nejčastěji prováděných analýs v klinické biochemii. Gama-glytamiltransferasa (E.C.2.3.2.2.) katalyzuje zejména reakci gama-glutamyl-NH-R s aminokyselinou za vzniku gama-glutamylaminokyseliny a organického amínu. Nejčastěji používanými donorovými substráty jsou gama-glutamyl-4-nitroanilid a v poslední době stále častěji gama-L-glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilid, doporučený jako donorový substrát i referenční metodou Mezinárodní federací klinické biochemie (IFCC). Stanovení katalytické koncentrace enzymu GMT lze provést dvěma základními způsoby:

Sledování vzrůstu koncentrace barevného reakčního produktu 2-amino-5-nitrobenzoátu v závislosti na čase, kinetická metoda.

Katalyzovaná reakce se nechá probíhat určenou dobu, poté se reakce zastaví okyselením, například kyselinou octovou nebo chlo-
rovodíkovou a určí se koncentrace reakčního produktu. Kinetická metoda stanovení vyžaduje speciální přístrojové vybavení, které je nákladné. Proto se katalytické koncentrace enzymů stanovují převážně metodou s konstantním časem. Metoda s konstantním časem se provádí v podstatě dvěma způsoby; v prvním se reakce zastaví přidáním kyseliny, zpravidla kyseliny octové a změří se absorban-
ce roztoku. Ve druhém případě se využívá barevné reakce reakčního produktu katalyzované reakce, např. s N-naftylethylendiaminem za vhodných podmínek. První z těchto dvou možností má ty nevýhody,

že ke každému vzorku je třeba provést kontrolní sérový roztok, což zdvojnásobuje pracnost i náklady na analýsu. Kromě toho, molární absorbanční koeficient reakčního produktu je nízký a metoda je proto málo citlivá, čímž se zhoršuje její diagnostická hodnota. Druhé možnosti bylo dosud využito pouze s 4-nitroanilinem jako reakčním produktem; citlivost této reakce je sice několikanásobně vyšší než citlivost prvního způsobu, ale výsledný barevný produkt je nestálý, což způsobuje značné nepřesnosti výsledků a rovněž zhoršuje diagnostickou hodnotu analýsy. Pro reakční produkt 2-amino-5-nitrobenzoát zatím této druhé možnosti nebylo využito.

Činidlo pro stanovení katalytické koncentrace GMT dle vynálezu řeší uvedené nevýhody tím, že je v širokém časovém intervalu stálé, reakce s činidlem je citlivá, takže diagnostická hodnota výsledků není zkreslena nepřesnostmi měření, není třeba provádět kontrolní sérový roztok, čímž se snižuje pracnost i náklady na jednu analýsu. Nadto je barevné činidlo na stanovení katalytické koncentrace GMT vhodné pro určení obou uvedených reakčních produktů.

Podstata činidla pro stanovení katalytické koncentrace gamma-glutamyltransferasy na bázi N-naftylethylendiaminu podle vynálezu spočívá v tom, že obsahuje kyselinu amidosulfonovou nebo její soli, kyselinu naftalen-2,5-disulfonovou nebo její soli, N-naftylethylendiamin a polyethylenglykol v molárních poměrech amidosulfonová kyselina ku N-naftylethylendiaminu 20 000 ku 1 až 1 ku 10; N-naftylethylendiamin ku naftalen-2,5-disulfonové kyselině 10 ku 1 až 1 ku 20 000; kyselina naftalen-2,5-disulfonová ku kyselině amidosulfonové 1 ku 200 až 100 ku 1 a dále polyethylenglykol v množství 0,01 g až 0,5 g v 1 g činidla, popřípadě kyselinu, například chlorovodíkovou, mravenčí, octovou, sírovou, fosforečnou, citronovou, maleinovou, jablečnou, šťavelovou nebo vinnou. Činidlo podle vynálezu dále obsahuje amidosulfonan amonný v koncentraci 1 až 100 mmol.l^{-1} , kyselinu naftalen-2,5-disulfonovou v koncentraci 0,5 až 100 mmol.l^{-1} , N-naftylethylendiamin v koncentraci 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ až 10 mmol.l^{-1} , polyethylenglykol v koncentraci 0,1 až 50 g.l^{-1} a kyselinu chlorovodíkovou v koncentraci 0,01 až 2 mol.l^{-1} .

Příklad 1

266 651

Rozpuštěním uvedených látek se připraví činidlo o složení: 1 mmol.l⁻¹ amidosulfonanu amonného, 0,5 mmol.l⁻¹ kyseliny naftalen-2,5-disulfonové, 5 μmol.l⁻¹ N-naftylethylendiaminu, 0,1 g.l⁻¹ polyethylenglykolu a 10 mmol.l⁻¹ kyseliny chlorovodíkové.

Příklad 2

Připraví se pevná směs z 11,4 g amidosulfonanu amonného, 30,3 g naftalen-2,5-disulfonanu disodného, 2,912 g N-naftylethylendiamin dihydrochloridu a 50 g polyethylenglykolu a 189 g kyseliny citronové.

Příklad 3

Připraví se tableta obsahující amidosulfonan amonný v množství 0,3 g, 0,36 g kyseliny naftalen-2-disulfonové dvojsodné soli, 0,02 g N-naftylethylendiamin dihydrochloridu a 2 g polyethylenglykolu.

Činidlo se připraví rozpuštěním tablety ve 200 ml kyseliny sírové 0,15 mol.l⁻¹.

Příklad 4

K 220 μl reakční směsi obsahující 150 mmol.l⁻¹ glycinu, 6 mmol.l⁻¹ gama-L-glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilidu, 7,2 mmol.l⁻¹ dusitanu sodného a sérum, objemový poměr inkubační směs + sérum 10 + 1, se po patnáctiminutové inkubaci při 30 °C přidají 2 ml čerstvě připraveného barevného činidla na stanovení katalytické koncentrace gama-glutamyltransferasy. Po 5 až 20 minutách se změří absorbance výsledného roztoku při vlnové délce 540 nm.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

266 651

1. Činidlo pro stanovení katalytické koncentrace gama-glutamyltransferasy na bázi N-naftylethyldiaminu, vyznačené tím, že obsahuje kyselinu amidosulfonovou nebo její soli, kyselinu naftalen-2,5-disulfonovou nebo její soli, N-naftylethyldiamin a polyethylenglykol v molárních poměrech amidosulfonová kyselina ku N-naftylethyldiaminu 20 000 ku 1 až 1 ku 10, N-naftylethyldiamin ku naftalen-2,5-disulfonové kyselině 10 ku 1 až 1 ku 20 000, kyselina naftalen-2,5-disulfonová ku kyselině amidosulfonové 1 ku 200 až 100 ku 1 a dále polyethylenglykol v množství 0,01 až 0,5 g v 1 g činidla, popřípadě kyselinu, například chlorovodíkovou, mravenčí, octovou, sírovou, fosforečnou, citronovou, maleinovou, jablečnou, šťavelovou nebo vinnou.
2. Činidlo podle bodu 1, vyznačené tím, že obsahuje amidosulfonan amonný v koncentraci 1 až 100 mmol.l^{-1} , kyselinu naftalen-2,5-disulfonovou v koncentraci 0,5 až 100 mmol.l^{-1} , N-naftylethyldiamin v koncentraci 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ až 10 mmol.l^{-1} , polyethylenglykol v koncentraci 0,1 až 50 g.l^{-1} a kyselinu chlorovodíkovou v koncentraci 0,01 až 2 mol.l^{-1} .