



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

217802

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 10 09 80
(21) (PV 6117-80)

(40) Zveřejněno 28 05 82

(45) Vydáno 15 07 84

(51) Int. Cl.³
G 01 N 33/52

(75)

Autor vynálezu

SVOBODA VLASTIMIL ing., HRBOTICKÁ EVA RNDr., BRNO

(54) Způsob analytického stanovení aktivity hydrolas a prostředek
k provádění tohoto způsobu

Jedná se o diagnostický proužek použitelný v lékařství.

Podstata vynálezu spočívá v tom, že nasákový nosič se skládá z části reakční a indikační. Část reakční obsahuje ve vodě nerozpustný barevný substrát, z něhož se v průběhu analytického stanovení uvolňují ve vodě rozpustné barevné štěpné produkty. Do části indikační tyto štěpné produkty migrují a jsou v ní na základě svého zabarvení vizuálně nebo fotometricky stanovovány.

Prostředek je určen k analytickému stanovení aktivity enzymů, zejména hydrolas, v různých biologických materiálech.

Předmětem vynálezu je způsob analytického stanovení aktivity enzymů, zejména hydrolas, v různých biologických materiálech.

Stanovení aktivity enzymů v biologických, mikrobiologických a biochemických laboratorích nabývá stále většího významu; přítomnost a aktivita určitých enzymů je pro řadu biologických materiálů charakteristické, takže na základě důkazu jejich přítomnosti a kvantitativního stanovení jejich aktivity lze např. jednoznačně identifikovat některé kmeny a druhy mikroorganismů, studovat a vysvětlovat projevy různých živých buněk, posuzovat funkci různých orgánů vyšších živočichů apod.

Mezi zvlášť významné enzymy patří mimo jiné tzv. hydrolasy, z nichž zejména některé glykosido-hydrolasy (systematické označení 3.2) a proteolytické enzymy (system. označení 3.4) mají obzvláštní důležitost, neboť svou schopností odbourávat polymerní molekuly polysacharidů nebo polypeptidů představují základ řady trávicích pochodů. U vyšších živočichů a člověka je pak jejich výskyt například u pankreatické nebo duodenální šťávy, případně i krvi nebo moči přímým obrazem funkce příslušného orgánu, zejména pankreatu. Stanovením aktivity některých těchto hydrolytických enzymů (alfa-amylasy, lipasy, chymotrypsinu, trypsinu, kolagenasy apod.) v séru nebo moči je pak možné s poměrně vysokým procentem pravděpodobnosti určit diagnózu některých funkčních poruch organismu.

Pro stanovení těchto hydrolytických enzymů jsou v současné době známy a používány složité fotometrické metody, založené na principu měření buď úbytku substrátu, nebo množství vzniklých štěpných produktů. Všechny tyto metody mají společnou nevýhodu v tom, že jsou zdoluhavé a vyžadují řadu manipulací, jako je přesné odměřování jednotlivých činidel, temperování, fotometrování, provedení slepých zkoušek, přepočty naměřených hodnot absorbance na jednotky aktivity enzymů apod. Je samozřejmé, že k provedení takto komplikovaných testů je zapotřebí dokonale vybavené analytické laboratoře s vysoce kvalifikovaným technickým personálem a řada čistých, speciálních a poměrně drahých chemikálií a činidel.

Tato skutečnost ukazovala již po řadu let na potřebu nalezení jednoduchého a rychlého způsobu stanovení aktivity enzymů, který by byl proveditelný i méně kvalifikovanými pracovníky s dostatečnou správností a přesností a případně bez potřeby speciálního laboratorního vybavení.

Nastíněný úkol se podařilo vyřešit předloženým vynálezem, jehož předmětem je jednoduchý prostředek k analytickému stanovení aktivity enzymů, zejména hydrolas, sestávající z nasávkového nosiče, jako je například filtrační papír, rouno ze skleněných nebo organických vláken, porézní polymerní syntetické hmoty apod., vyznačený tím, že se skládá z části reakční, obsahující nerozpustný barevný substrát, z něhož se v průběhu analytického stanovení uvolňují barevné štěpné produkty, a části indikační, do níž tyto barevné štěpné produkty migrují a jsou v ní na základě svého zabarvení vizuálně nebo fotometricky stanovovány. Vedle uvedené hlavní složky, nerozpustného barevného substrátu, obsahuje tento prostředek ještě řadu dalších látek, zajišťujících optimální průběh analytického stanovení příslušného enzymu; jsou to například tlumiče, různé stabilizátory nebo aktivátory enzymů, smáčedla, tzv. zahušňovadla a podobně.

Prostředek k analytickému stanovení aktivity enzymů dle tohoto vynálezu představuje s výhodou proužek nasávkového nosiče, široký 5 až 10 mm, na jehož dolní část je v délce 5 až 30 mm nanesen nerozpustný barevný substrát. Je výhodné, jestliže tato reakční část s nerozpustným barevným substrátem je vzdálena 3 až 10 mm od jednoho příčného okraje proužku nasávkového nosiče. Tato 3 až 10 mm volná část nasávkového nosiče pak slouží k nanesení vzorku, případně ponoření do vyšetřované kapaliny; v obou těchto případech působí jako knot, zajišťující nasátí vyšetřované kapaliny do reakční části proužku. V této reakční části dochází ke štěpení barevného nerozpustného substrátu, přičemž rozpustné barevné štěpné produkty jsou unášeny vztlínající kapalinou, tj. vyšetřovanou kapalinou nebo další tzv. vyvíjecí kapalinou, do sousední, tzv. indikační části proužku, přičemž intenzita tohoto zabarvení je

přímo úměrná množství uvolněných štěpných produktů a tím aktivitě stanoveného enzymu. Vzhledem k tomu, že vztlínající kapalina postupuje proužkem přes reakční zónu do zóny indikační zvolna, takže stanovení trvá 5 až 20 minut, je výhodné proužek nasákového nosiče pokrýt na převážné části obou stran vhodnou nepropustnou látkou, jako je například fólie ze syntetické hmoty, aby se zabránilo odpařování vztlínající kapaliny.

Jedno z možných výhodných provedení takových proužků dle vynálezu je schematicky znázorněno na přiloženém obrázku č. 1. Na nasákový nosič 1, který je naimpregnován pomocnými činidly popsanými níže, je v části 1a (část reakční) nanesen barevný nerozpustný substrát 2; až na malou část 1b na jednom konci proužku je na tento nosič z obou stran pomocí adheziva 3 nalepena fólie z bílé, neprůhledné plastické hmoty 4, 4a, 2, která na horní části proužku přesahuje filtrační papír a tvoří jakýsi "držák" (5). Horní fólie se tím skládá ze dvou částí 4 a 2, nalepených na nasákový nosič tak, že ponechávají na nasákový nosič volný průhled na indikační část 1c nasákového nosiče.

Jako nasákový nosič 1 je ve smyslu tohoto vynálezu možno použít jakoukoliv látku, mající dostatečný počet a objem vnitřních pórů, umožňujících snadné a rychlé vztlínání kapaliny. Mohou to být nosiče vláknitého typu, jako například filtrační papír z vláken přírodního původu, jako je celulóza, vlna, bavlna aj. nebo i rouno z vláken umělých, jako například polyamidu, polyesteru, skla nebo i jejich nejružnějších směsí. Vedle toho lze ovšem použít například i porézní nevláknité nosiče mající potřebné vlastnosti z hlediska nasákavosti; u látek tohoto typu jsou to zejména látky isotropně-porézního charakteru, připravené například technikou fázově inverzní polymerace nebo separace, jak jsou popisovány například v publikaci Kesting R. E., Syntetic Polymeric Membranes. Základní sloužkou prostředku dle tohoto vynálezu je nerozpustný barevný substrát; dle druhu enzymu, který má být pomocí tohoto prostředku stanoven, je nutné volit i odpovídající substrát, který svým chemickým složením a strukturou odpovídá specifickým účinkům stanoveného enzymu. Substráty tohoto druhu jsou obecně známy a pro obdobné účely používané látky, jako například tzv. RBB-Starch ke stanovení alfa-amylasy (viz Experientia 23, 1967, 805), Fibrin-Blue ke stanovení pepsinu a jiných "kyselých" proteas (Clin. Chim. Acta 21, /1968/, 197), Azocell ke stanovení kolagenasy (J. Path. Biochem. 58 /1946/, 229) aj. Obecně lze tedy použít jakýkoliv specifický substrát, na nějž bylo chemicky navázáno vhodné barvivo, který je v daném vodném prostředí nerozpustný a působením enzymu se štěpí na nižší barevné štěpné produkty, ve vodě, případně daném vodném prostředí relativně dobře rozpustné.

Nanesení tohoto substrátu na nasákový nosič je možné provést nejružnějšími způsoby: například je možné substrát rozpustit ve vhodném rozpouštědle, jako je dimetylsulfoxid, etanol, aceton, apod. nebo jejich směsí, vzniklým roztokem napojit nosič do nasycení a rozpouštědlo odstranit vysušením. Jiný použitelný způsob je rozpouštění barevného substrátu například ve vodném roztoku hydroxidu nebo uhličitanu alkalického kovu nebo i jiné, alkalicky reagující látky, nanesení tohoto roztoku na nosič a vysrážení substrátu na nosiči v nerozpustné formě okyselením vhodnou kyselinou. Dále je pak možné připravit nosič s barevným substrátem i tak, že se částice substrátu zabudují do nosiče již při jeho výrobě, tj. například jemně rozemletý substrát se přidá do papíroviny, z níž se pak odleje papír, většinou substrátu je konečně možno na nosič nanést tak, že se pevný, jemně práškový substrát mechanicky vetře do pórů nasákového nosiče. Z hlediska požadovaných vlastností prostředku dle tohoto vynálezu je však výhodné - a také nejjednodušší - pevný, práškový substrát nalepit na adhezivní povrch samolepicí pásky a s touto páskou jej pak pevně připojit k povrchu nosiče.

Jak již bylo výše uvedeno, obsahuje prostředek k analytickému stanovení aktivity enzymů dle vynálezu ještě také řadu dalších látek, potřebných pro optimální průběh enzymové reakce, na níž je stanovení založeno. Je to v první řadě tlumič, zajišťující při použití prostředku takové podmínky, při nichž je stanovený enzym dostatečně stabilní a jeho aktivita nejvyšší. Druh použitého tlumiče a jeho hodnota pH se přitom řídí druhem enzymu, k jehož stanovení je prostředek dle vynálezu určen. Obecně je však možno použít známé a pro

obdobná stanovení aktivity enzymů běžně používané tlumiče, jako jsou například tlumiče fosforečnanové, citrátové, tlumiče na bázi tris-hydroxymetylaminoetanu a kyseliny chlorovodíkové apod., o hodnotách pH odpovídajících maximu enzymové aktivity a stability stanoveného enzymu a uvedených například ve známé monografii H. U. Bergmayera *Methods of Enzymatic Analysis*.

Další součástí prostředku k analytickému stanovení aktivity enzymů mohou být tzv. aktivátory enzymové aktivity. Jsou to například chloridy a/nebo kyselina cholová, bromidy v prostředku pro stanovení aktivity alfa-amylasy, hořečnaté soli, jako například síran nebo chlorid hořečnatý v prostředku pro stanovení aktivity trypsinu, vápenaté soli v prostředku určeném ke stanovení aktivity alfa-chymotrypsinu apod. Obecně se opět jedná o látky, jejichž specifické aktivační účinky jsou známy a jsou používány i při jiných způsobech stanovení aktivity enzymů. Jejich přítomnost v reakční části prostředku dle vynálezu je však nutná jen v některých případech; má-li prostředek sloužit například ke stanovení aktivity alfa-amylasy v moči nebo séru, pak přítomnost chloridů v prostředku není bezpodmínečně nutná, neboť obě uvedené vyšetřované biologické kapaliny obsahující relativně vysoké koncentrace chloridových iontů, které v průběhu vlastního stanovení stanovený enzym dostatečně aktivují.

Vedle těchto látek může prostředek dle vynálezu obsahovat i tzv. stabilizátory enzymů, tj. látky, které brání inaktivaci enzymů v průběhu jejich stanovení, jako jsou například vápenaté soli pro stabilizaci alfa-amylasy nebo trypsinu. Obdobně jako u výše uvedených aktivátorů enzymové aktivity není přítomnost stabilizátorů enzymů nutná v prostředku dle vynálezu, je-li určen ke stanovení aktivity enzymů v prostředcích obsahujících dostatečné množství těchto stabilizátorů, jako jsou některé biologické kapaliny.

Prostředek dle vynálezu může konečně s výhodou obsahovat i různá smáčedla a/nebo tzv. zahušňovadla. Jako smáčedla, jejichž úkolem je urychlit proniknutí enzymu k nerozpustnému barevnému substrátu a migraci solubilizovaných barevných štěpných produktů, lze použít jakákoliv běžná smáčedla, tj. obecně známá a průmyslově vyráběná povrchově aktivní látky anionaktivního, kationaktivního nebo i neionogenního charakteru, jako jsou například různé aryl- případně aralkylsulfonáty, kvarterní amoniové soli s delšími alkylovými nebo aralkylovými řetězci, nebo neionogenní polymery alkylenoxidů s různými delšími alifatickými řetězci. Druh smáčedla, vhodný pro použití v prostředku dle tohoto vynálezu, se pak volí s ohledem na účel použití prostředku, tj. řídí se druhem enzymu, k jehož stanovení je prostředek určen. Obecně se však jeví nejvýhodnějším použitím neionogenních smáčedel na bázi substituovaných polyoxyalkylenů.

Tzv. zahušňovadla jsou polymerní, ve vodě rozpustné látky přírodního nebo syntetického původu jako je například želatina, albumin, agar, alginát sodný, karboxymetylcelulóza, polyvinylpyrrolidon, polyvinylalkohol, polyakrylamid apod. Tyto látky zdokonalují migraci barevných štěpných produktů enzymové reakce a zvyšují stejnoměrnost vybarvení indikační části prostředku.

Všechny tyto látky jsou v prostředku přítomny v nasákavém nosiči, na nějž se nanesou ve formě roztoku ve vodě, nebo jiných vhodných inertních kapalinách a vysuší. Způsob tohoto nanesení je obecně znám a používán i při výrobě obdobných tzv. reagenčních proužků.

Podrobnější složení prostředku dle vynálezu a způsob jeho přípravy vyplývá z níže uvedených příkladů, které popisují několik provedení a ukazují i obecnou použitelnost prostředku pro stanovení různých hydrolas.

P ř í k l a d 1

Proužky ke stanovení alfa-amylasy v moči

Pruh filtračního papíru Whatman č. 4, široký 40 mm se naimpregnuje následující směsí roztoků a vysuší při teplotě okolo 60 °C:

fosfátový tlumič, pH = 7,0, 0,2 mol/l	10,0 ml
chlorid sodný 0,2 mol/l	10,0 ml
2 g% etanolový roztok TRITONU X-100	2,0 ml
1 g% roztok kyseliny cholové	1,0 ml
1 g% roztok agaru	2,5 ml
0,5 g% roztok alginátu sodného	0,5 ml

Současně se na jednu adhezivní stranu oboustranné samolepicí pásky o šíři 20 mm přilepí stejně široký pruh bílé fólie PVC o síle 0,2 mm. Na druhou adhezivní stranu samolepicí pásky se nanese 10 mm široký pás jemně rozetřeného, práškového substrátu a přitlačením fixuje tak, aby po obou stranách tohoto pásu zbyly 5 mm široké proužky volné adhezivní plochy; těmito adhezivními plochami se samolepicí páska s fólií PVC a naneseným barevným substrátem přilepí podélně na pruh naimpregnovaného papíru 6 mm od jeho jednoho podélného okraje. Poté se na druhou stranu naimpregnovaného papíru přilepí - opět pomocí oboustranné samolepicí pásky - fólie PVC, široké 34 mm tak, aby fólie byla vzdálena 6 mm od okraje papíru, stejně jako páska se substrátem. Nakonec se na papír - 6 mm od fólie se substrátem - nalepí "držák" z fólie PVC, široké 48 mm. Celý tento pás se poté příčně nařeže na proužky o šíři 6 mm.

Jako substrát je možné použít některou z těchto látek: bramborový škrob s kovalentně navázanou remazolovou brilantní modří R, bramborový škrob s remazolovou brilantní violetí 5R, škrob s ostazinovou modří, škrob s ostazinovou brilantní žlutí H-5G, škrob s ostazinovou brilantní červení S-5B.

Použije-li se při přípravě těchto proužků jako substrát bramborový škrob s kovalentně navázanou remazolovou brilantní modří, získají se diagnostické proužky, vhodné ke stanovení aktivity amylasy například v lidské moči. Toto stanovení se provede tak, že se vyčnívající část papíru namočí po dobu 4 až 5 s do vyšetřované moče a proužek se vloží do mikrozkušky. Po 10minutové inkubaci se proužek vyjme a krátce namočí - opět vyčnívající částí papíru - do vyvíjecí kapaliny, složené z 0,4 mol/l NaOH, k němuž bylo přidáno 0,5 % cetylpyridiniumbromidu. Papírek se poté vrátí do zkumavky a po 5 ± 2 minuty vyvíjení se vzniklé modré zbarvení indikační části proužků vyhodnotí buď vizuálně srovnáním se stupnicí nebo fotometricky. Intenzita tohoto zbarvení je přímo úměrná aktivitě alfa-amylasy ve vyšetřované moči v rozsahu 500 až 10 000 U/l.

P ř í k l a d 2

Proužky ke stanovení aktivity trypsinu

Proužky se připraví stejným způsobem, jak popsáno v příkladě 1, avšak s použitím impregnačního roztoku o složení:

Tris-tlumič, 0,2 mol/l, pH ~ 8,0	10,0 ml
chlorid sodný, 0,2 mol/l	8,5 ml
chlorid vápenatý, 0,2 mol/l	2,5 ml
Triton X-100, 2% etanolový roztok	2,0 ml
agar, 1% vodný roztok	2,5 ml
alginát sodný, 0,5% vodný roztok	0,5 ml

Jako substrát se použije tzv. OBR-kolagen, tj. kolagen s kovalentně navázanou ostazinovou brilantní červení. Stanovení trypsinu, resp. jeho aktivity se provede stejným způsobem jako stanovení alfa-amylasy, popsané v předešlém příkladě. Indikační část proužku se přitom zbarví růžově až sytě karmínově červeně, přičemž intenzita tohoto zbarvení je úměrná aktivitě trypsinu v rozmezí 100 až 1 500 jednotek BAEE/ml ve vyšetřovaném vzorku.

Příklad 3

Proužky ke stanovení aktivity chymotrypsinu

Proužky se připraví stejným způsobem jak je popsáno výše, avšak s použitím impregnačního roztoku o složení:

Tris tlumič, 0,2 mol/l, pH ~ 8,0	10,0 ml
chlorid sodný, 0,2 mol/l	8,5 ml
chlorid vápenatý, 0,2 mol/l	2,5 ml
Triton X-100, 2% etanolový roztok	2,0 ml
karboxymethylcelulóza, 1% vodný roztok	2,5 ml
alginát sodný, 0,5% vodný roztok	0,5 ml

Jako substrát se použije nerozpustný komplex kožní prášek-kongočerveně. Stanovení aktivity chymotrypsinu se provede stejným způsobem jako stanovení alfa-amylasy, popsané v příkladě 1.

Příklad 4

Proužky pro stanovení aktivity pepsinu

Proužky se připraví stejným způsobem jak je popsáno v předešlém příkladě, avšak s použitím impregnačního roztoku obsahujícího tlumič o pH = 2,0. Jako substrát se použije kolagen s kovalentně navázanou remazolovou brilantní violetí 5R. Stanovení aktivity pepsinu pomocí těchto proužků se provede stejně jako stanovení alfa-amylasy popsané v příkladě 1. Indikační část proužku se přitom barví fialově, přičemž dle intenzity tohoto zbarvení lze s poměrně vysokou přesností stanovit aktivitu pepsinu ve vyšetřovacím vzorku.

PŘEDMĚT VÝNÁLEZU

1. Způsob analytického stanovení aktivity hydrolas, vyznačený tím, že se analyzovaný roztok enzymu nanese na proužek nasávkového nosiče a nechá vzlínat přes reakční část nosiče, na níž je nanesen ve vodě enzym a po průchodu touto částí se vizuálně nebo fotometricky vyhodnotí intenzita zbarvení, způsobená barevnými rozpustnými produkty, uvolněnými hydrolytickým působením enzymu z nerozpustného barevného substrátu a transportovanými vzlínající kapalinou do indikační části proužku, ležící za částí s naneseným nerozpustným substrátem.

2. Způsob analytického stanovení aktivity hydrolas dle bodu 1, vyznačený tím, že stanovovaná hydrolysa je alfa-amylasa, celulóza, pektinasa, trypsin, chymotrypsin, pepsin, kolagenasa, elastasa.

3. Prostředek k analytickému stanovení aktivity hydrolas dle bodu 1, vyznačený tím, že sestává z proužku nasávkového nosiče (1), např. filtračního papíru, rouna ze synt. vláken nebo porézního polymeru, naimpregnovaného tlumičem o pH 1-10, o sobě známými aktivátory enzy-

mové aktivity nebo stabilizátory stanovovaného enzymu, smáčedly kationaktivního, anionaktivního nebo neionogenního typu a popřípadě zahušťovadly jako např. polyvinylpyrrolidon, polyvinylalkohol, želatina nebo agar, a sestávající z reakční části (1a), na níž je nanesen ve vodě nerozpustný barevný substrát (2), a pokrytý s výhodou z obou stran fólií z neprůhledného materiálu (4, 4a a 5), připojenou k nosiči např. pomocí adhesiva (3), a kromě indikační části nosiče (1c) a obnaženého konce nosiče (1b).

1 list výkresů

