



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

227331

(11) (B2)

(51) Int. Cl.³

G 01 N 33/48

(22) Přihlášeno 16 09 81

(21) (PV 6831-81)

(32) (31)(33) Právo přednosti od 19 09 80
(P 30 35 465.5) Německá spolková republika

(40) Zveřejněno 29 07 83

(45) Vydáno 15 03 86

(72) Autor vynálezu

ZIEGENHORN JOACHIM dr., STARNBERG, BARTL KNUT dr., WILSHOFEN,
RÖDER ALBERT dr., SEESHÄUPT, LANG GUNTHER, MÖLLERING HANS,
TUTZING, NÄGELE ULRICH dr., BERNRIED (NSR)

(73) Majitel patentu

BOEHRINGER MANNHEIM GmbH, MANNHEIM-WALDHOF (NSR)

(54) Způsob stanovení glycerolu /

1

Vynález se týká způsobu stanovení glycerolu a činidla k provádění tohoto způsobu.

Stanovení triglyceridů, to jest glycerolesterů alifatických kyselin a delším řetězcem má pro lékařskou diagnostiku podstatný význam. Zvýšená hladina triglyceridů v krvi je rizikovým faktorem pro vznik arteriosklerózy. Při vysokých hladinách triglyceridů v krvi dochází častěji ke koronární nedostatečnosti a srdečnímu infarktu než v případech, kdy hladina triglyceridů je nízká. Vysoká hladina triglyceridů vede také častěji k vývoji arteriosklerózy a koronárních onemocnění a je tedy velmi žádoucí ji zjistit včas, aby bylo možno provádět příslušnou léčbu. Je tedy zapotřebí mít k dispozici rychlou a snadno proveditelnou metodu ke stanovení triglyceridů nebo glycerolu.

Známé a používané metody ke stanovení triglyceridů jsou založeny na enzymatické hydrolyze těchto látek lipázou a esterázou s následným stanovením uvolněného glycerolu glycerolkinázou, kinázou pyrohroznanu a naftátdehydrogenázou, jak bylo popsáno v publikaci A. W. Bahlefeld, Methods of Enzymatic Analysis IV, H. U. Bergmeyer, Ed. Academic Press, New York, Londýn, 1974, str. 1 831 až 1 835.

Tyto známé způsoby však mají podstatné nevýhody. Aby bylo možno vyloučit poruchy zbarvení krevního séra, vznikající přítomností bilirubinu nebo hemoglobinem a zákalů různého původu, je zapotřebí vždy provádět slepou zkoušku, což zvyšuje časové náklady i spotřebu reakčních činidel a tím i celkové náklady na analýzu. Mimoto reakční činidlo je vzhledem k přítomnosti různých citlivých enzymů a koenzymů jen málo trvanlivé.

Kromě těchto zkoušek jsou známy také barevné zkoušky založené na tvorbě formazánu. Při těchto postupech je také zapotřebí vždy provádět slepou zkoušku a mimoto jsou tyto

227331

zkoušky poměrně komplikované a jsou rušeny různými dalšími látkami. Mimoto je znám způsob, při němž se užívá glyceroloxidáza za vzniku peroxidu vodíku a glycerolaldehydu, které je možno stanovit. Tento enzym se však získává jen z vysoce pathogenních mikroorganismů, jako jsou bakterie moru, z jiných bakterií je možno jej získat jen v malém množství.

Z tohoto důvodu by bylo zapotřebí navrhnout způsob a činidlo, při jejichž použití by bylo možno odstranit svrchu uvedené nevýhody. Mělo by jít o způsob, který by bylo možno provádět při použití enzymu, získatelného jednoduchým způsobem v dobrém výtěžku. Mimoto by mělo být možno způsob provádět bez měření proti slepé zkoušce za získání dostatečně přesných výsledků. Zvláště by bylo žádoucí, aby bylo dosaženo barevné reakce s dostatečně vysokým extinkčním koeficientem vzniklého barviva, to jest ($\epsilon > 18 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$).

Předmětem vynálezu je způsob stanovení glycerolu, vyznačující se tím, že se glycerol inkubuje ve vodném prostředí za přítomnosti kyslíku s galaktózooxidázou a pak se měří výsledek reakce, a to spotřeba kyslíku, množství vzniklého peroxidu vodíku nebo množství glycerolaldehydu.

Galaktózooxidáza EC 1.1.3.9. je známý enzym, který za přítomnosti kyslíku oxiduje D-galaktózu na D-galaktózoheptodialdózu a peroxid vodíku. Jde o enzym, který obsahuje měď. Vynález spočívá na překvapujícím zjištění, že je tento enzym možno s dobrým výsledkem užít ke stanovení glycerolu.

Tento výsledek nebylo možno očekávat, protože byla sice známa minimální účinnost galaktózooxidázy vzhledem ke glycerolu, avšak podle publikace Hamilton a další "Oxidases and Related Redox Systems", vyd. King, sv. 1 (1971), avšak reakční rychlost byla tak nízká, že nebylo uvažováno o použitelnosti tohoto enzymu. Protože v tělesných tekutinách, v nichž má být stanoven glycerol se může vyskytovat také galaktóza ve volné nebo vázané formě, bylo možno očekávat silné rušení této reakce galaktózou, takže vůbec nebylo možno uvažovat o možnosti kvantitativní reakce glycerolem. Bylo však neočekávaně zjištěno, že v tělesných tekutinách, zejména v krevním séru k tomuto rušení nedochází.

Způsob podle vynálezu je možno také provádět po předběžném nebo při současném enzymatickém zmydlení triglyceridů za současného uvolnění glycerolu, nebo po předběžném chemickém zmydlení triglyceridů. Zmydlení chemickým způsobem je možno provádět zejména alkoholovým roztokem hydroxidu draselného, k enzymatickému zmydlení je vhodná lipáza s esterázou nebo esteráza.

Měření spotřeby kyslíku, tvorby peroxidu vodíku nebo tvorby glycerolaldehydu se provádí známými postupy.

Vhodným způsobem měření spotřeby kyslíku je například plynová chromatografie a depolarizace. Výhodná je polarimetrická metoda při použití kyslíkové elektrody, protože tento postup je zvláště vhodný k automatickému provádění analýzy. Způsoby obdobného typu jsou známy. Zvláště vhodný je způsob, uvedený v NSR vykládacích spisech 21 30 340 a 21 30 308, tyto způsoby se týkají polarimetrického měření spotřeby kyslíku ve vodných prostředích.

Vzniklý peroxid vodíku je možno stanovit titrací nebo také potenciometrický, polarograficky, kolorimetricky nebo enzymeticky. Výhodné jsou enzymatické způsoby při použití katalázy nebo peroxidázy, protože tyto metody jsou jednak velmi specifické a dostupné, mimoto však také je možno tyto metody kombinovat s hlavní reakcí za vzniku peroxidu vodíku velmi jednoduchým způsobem. Vhodné je zejména stanovení katalázou za přítomnosti beta-diketonů, například acetylacetonu a methanolu nebo ethanolu nebo methylen glykolu, jakož i stanovení pomocí peroxidázy za přítomnosti jedné nebo většího počtu chromogenních látek.

Při stanovení pomocí katalázy, acetylacetonu a methanolu je methanol oxidován na formaldehyd, který reaguje s acetylacetonem za vzniku barevné reakce, kterou je možno

měřit. Při použití peroxidázy jsou jako chromoforní látky použity sloučeniny, které je po reakci možno měřit fotometricky. Příkladem vhodného chromoforu může být kyselina 2,2'-amino-benzthiazolinsulfonová (ABTS). Dalším příkladem je indikátorový systém podle publikace Trinder Ann. Clin. Biochem. 7 6 (1969), 24 až 27, při němž se uvádí v reakci fenol a 4-aminoantipyrin (4-AAP) za přítomnosti POD a za působení peroxidu vodíku za vzniku barviva. Místo fenolu je možno užít jiné aromatické alkoholy jako p-chlorfenol, anilinové deriváty, naftol, deriváty naftolu, naftylemin, naftylaminové deriváty, aminochinoliny, hydroxychinoliny, kyselinu dihydroxyfenyloctovou a obdobným způsobem reagující sloučeniny.

Místo 4-aminoantipyrinu je možno užít deriváty 4-aminoantipyrinu například 4-aminoantipyrinamid, kyselinu fenylendiaminsulfonovou, MBTH.

Stanovení glycerolaldehydu se stanoví pomocí běžně užívaných reakčních činidel, s výhodou pomocí hydrazinového derivátu, který reaguje s aldehydovými skupinami za vzniku hydrazonu, například při použití 2,4-dihydrofenylyhydrazinu. Vzniklý hydrazon je možno stanovit kolorimetricky.

Zvláště výhodná je reakce za přítomnosti peroxidázy a chromogenní sloučeniny, například ABTS. V tomto případě je možno dosáhnout krátké reakční doby a současně lineární závislosti mezi rozdílem v extinkci a koncentrací glycerolu, takže se toto provedení způsobu podle vynálezu zvláště hodí pro kinetické stanovení. Je však možno je stejně dobře užít i ke stanovení koncového bodu.

Dosažená úměrnost mezi extinkcí a obsahem glycerolu je doložena na přiloženém obr. 1. Graficky je znázorněna souvislost mezi extinkcí s obsahem glycerolu.

Na ose úseček je uvedena koncentrace glycerolu v 10^{-2} mol/l. Na ose pořadnic je uvedena odpovídající extinkce.

Podle výhodného provedení způsobu podle vynálezu se stanoví provádění za přítomnosti glyceroldehydrogenázy a jejího koenzymu NAD. Glyceroldehydrogenáza EC 1.1.1.6 je známá a je možno ji získat z mikroorganismů, například *Enterobacter aerogenes* a je běžně užívána. Bylo zjištěno, že za přítomnosti glyceroldehydrogenázy (Glyc-DH) je citlivost a specifická způsobu stanovení ještě dále zlepšena. Při této výhodné formě provedení způsobu podle vynálezu je možno přidat NAD v přebytku vzhledem ke stechiometricky nutnému množství, s výhodou se však přidává katalytické množství NAD a systém, který za přítomnosti NAD tuto látku regeneruje.

Vhodným systémem pro regeneraci NAD je například systém popsán v DOS 28 34 705. Výhodným systémem pro regeneraci NAD pro použití při provádění způsobu podle vynálezu sestává z laktátdehydrogenázy a jejího substrátu pyrohroznanu. V případě, že se NAD přidá v přebytku, je možno místo peroxidu vodíku opticky měřit také redukovaný NAD.

Při této formě provedení způsobu podle vynálezu je vhodné udržet hodnotu pH v rozmezí 7,0 a 9,0, protože v tomto rozmezí mají všechny ostatní enzymy, které se účastní reakce, a to galaktózooxidáza (Gal-OD), Glyc-DH a popřípadě peroxidáza (POD) dobrou účinnost.

Je překvapující, že při této formě provedení probíhá reakce hladce a kvantitativně při spotřebě molekulárního kyslíku a tvorbě peroxidu vodíku, přestože dochází ke konkurenci obou enzymů Gal-OD a Glyc-DH o glycerin a také Glyc-DH vytváří kromě kyslíku peroxid vodíku.

Při výhodném použití Gal-OD a současně Glyc-DH se citlivost udrží na $0,001$ mol/litr.

Provádění tohoto způsobu se vypočítává z rozdílu mezi slepou zkouškou a zkušebním vzorkem nebo kinetickým způsobem. Na přiloženém obr. 3 je zřejmé, že při použití obou těchto forem provedení se získá lineární vztah mezi koncentrací glycerolu a rozdílem extinkce alespoň až do koncentrace glycerolu $0,0005$ mol/litr.

Také tato forma provedení způsobu podle vynálezu může být provedena za současného enzymatického zmýdelnění triglyceridů, takže dochází k uvolnění a rychlému stanovení glycerolu.

Způsob podle vynálezu je zvláště vhodný pro automatické analyzátory, protože je možno provádět cejchování koncentrace glycerolu velmi přesně při použití standardu.

Reakční činidlo ke stanovení glycerolu sestává z galaktózooxidázy, systému pro stanovení peroxidu vodíku nebo systému ke stanovení glycerolaldehydu. Při prvním výhodném provedení sestává reakční činidlo v podstatě z galaktózooxidázy, peroxidázy, alespoň jedné chromogenní sloučeniny a pufru, a to jednotlivě nebo ve směsi. Jako chromogenní látky se s výhodou užíje ABTS. Dalším vhodným barevným indikátorovým systémem je systém, který byl uveden ve svrchu uvedené Trinderově publikaci.

Výhodným reakčním činidlem je činidlo, sestávající v podstatě z galaktózooxidázy, katalázy, acetylacetonu, methanolu a pufru, a to jednotlivě nebo ve směsi.

Reakční činidlo může také sestávat z galaktózooxidázy, hydrazinového derivátu, který reaguje s aldehydovými skupinami ze vzniku hydrazonu a z pufru. Jako hydrazinový derivát se s výhodou použije 2,4-dinitrofenylhydrazin.

Reakční činidla mohou kromě uvedených složek obsahovat ještě běžná rozpouštědla, stabilizátory a/nebo smáčedla. Všechny tyto další možné přísady jsou známy a jsou vhodné pro použití v systémech pro stanovení peroxidu vodíku i glycerolaldehydu. S výhodou obsahují reakční činidla, kromě svrchu uvedených složek ještě enzymy, štěpicí tuky, například lipázu a esterázu nebo pouze esterázu, aby bylo možno stanovit také vázaný glycerol, nacházející se ve formě triglyceridů.

Reakční činidla k provádění způsobu podle vynálezu obsahují jednotlivé složky s výhodou v následujících poměrech.

1. 15 až 30 jednotek/ml galaktózooxidázy
0,5 až 100 jednotek/ml peroxidázy
0,05 až 20 $\mu\text{ml/ml}$ chromogenní látky
a popřípadě
0,001 až 0,1 g/ml smáčedla a pufr k úpravě pH na 6 až 9
2. 15 až 30 jednotek/ml galaktózooxidázy
1 až 10 $\mu\text{mol/l}$ 2,4-dinitrofenylhydrazinu
a popřípadě
0,001 až 0,1 g/ml smáčedla a pufr k úpravě pH na 6 až 9.

Podle výhodného provedení způsobu podle vynálezu obsahuje reakční činidlo ještě Glyc-DR, NAD a popřípadě systém, regenerující NAD.

Pro systémy, regenerující NAD platí totéž, co bylo uvedeno svrchu pro způsob podle vynálezu. Výhodný systém pro regeneraci NAD sestává z laktátdehydrogenázy (LDH) a pyrohroznanu. Přítomnost systému, regenerujícího NAD umožňuje s katalytickým množstvím koenzymu NAD pro reakci s Glyc-DH vystačit, protože v průběhu reakce vznikající NADH se okamžitě regeneruje zpět na NAD oxidací. Za přítomnosti tohoto regeneračního systému pro NAD je možno snížit množství systému NAD až na 0,05 $\mu\text{mol/l}$.

Při tomto výhodném provedení obsahuje reakční činidlo podle vynálezu Glyc-DH v množství 5 až 100 jednotek/ml. Je samozřejmé, že je možno použít i většího množství, není to však již hospodárné. Množství nižší než 5 jednotek/ml je také možno použít, výhody, dosažené použitím Glyc-DH však se snižují.

Vhodný pufr je možno zjistit jednoduchými předběžnými pokusy. Vhodnými pufrů jsou například glycylglycinový pufr a bicinový pufr (N,N-bis-/2-hydroxyethyl/glycin) v koncentracích 0,05 až 0,2 mol/litr. Svrchu uvedené enzymatické jednotky pro galaktózooxidázy se týkají galaktózy jako substrátu, jak bylo popsáno například v publikaci Fazur a další "Carbohydrates, Nucleosides, Nucleotides" 4, 147 (1977).

Vynález bude osvětlen následujícími příklady.

P ř í k l a d 1

Reakční činidlo: pufr s fosforečnanem draselným (0,1 mol/l, pH 7,5),
peroxidáza (12 500 jednotek/l),
galaktózooxidáza (20 000 jednotek/l) ABTS (2 mmol/l).

Vzorky: vodné roztoky glycerolu o koncentraci 0,005 až 0,06 molu/l.

Způsob stanovení: měření bylo prováděno při použití rtuťové lampy při 405 nm,
kyveta měla šířku 1 cm, inkubační teplota 25 °C.

2,0 ml reakčního činidla se pipetou vnese do kyvety, přidá se 0,1 ml vzorku a směs se promísí. Měří se změny extinkce mezi druhou a desátou minutou. ΔE_{2-10} . Při kvantitativním stanovení glycerolu se tento rozdíl vztahuje na koncentraci glycerolu ve standardu.

P ř í k l a d 2

Stanovení glycerolu v séru

Reakční činidlo: pufr s fosforečnanem draselným (0,1 mol/l, pH 7,5),
peroxidáza (12 500 jednotek/l),
galaktózooxidáza (20 000 jednotek/l), ABTS (2 mmol/l).

Vzorky: jako vzorek bylo užito krevní sérum, které obsahovalo různá množství glycerolu, který byl přidán do koncentrace 0,006 až 0,07 molu/l.

Způsob stanovení: měření bylo prováděno při použití rtuťové lampy při 405 nm, tloušťka kyvety byla 1 cm a inkubační teplota 25 °C.

Stanovení se provádí tak, že se pipetou vnese do kyvety 2,0 ml reakčního činidla, přidá se 0,1 ml vzorku a směs se promísí. Po skončení lag-fáze se měří změna extinkce v průběhu druhé až 10. minuty. Lineární závislost mezi koncentrací glycerolu a změnami extinkce je zřejmá z přiloženého obr. 2.

Na ose úseček je uvedena koncentrace glycerolu v 10^{-2} mol/l. Na ose pořadnic se nachází odpovídající extinkce při 405 nm.

P ř í k l a d 3

Reakční činidlo má následující složení:

Složka	Množství
glycylglycinový pufr o pH 8,0	0,1 mol/l
síran amonný	0,16 mol/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 mmol/l
uhličitan sodný	0,078 mmol/l

Složka	Množství
4-aminoantipyridin-NH ₂	0,5 mmol/l
p-chlorfenol	10 mmol/l
POD	10 000 jednotek/l
LDH	10 000 jednotek/l
pyrohroznán	2,25 mmol/l
Gal-OD	20 000 jednotek/l
Glyc-DH	50 000 jednotek/l
NAD ⁺	1,5 mmol/l

Zkušební vzorky:

Vodné roztoky glycerolu v koncentračním rozmezí 0,001 až 0,01 mmol/litr. Místo vodných roztoků glycerolu je možno použít extrakty séra, další tělesné tekutiny a například také extrakty z potravin.

Podmínky při měření:

Vlnová délka: 546 nm
 Tloušťka vrstvy: 1 cm
 Teplota: 25 °C až 37 °C

1,0 ml reakčního činidla se vloží do kyvety a přidá se 0,01 ml zkušební vzorku. Extinkce se měří po 30 minutách proti slepé zkoušce. Pro kvantitativní stanovení se vztahuje tato ΔE proti standardu ke zjištění koncentrace glycerolu.

Není zapotřebí provádět kontrolní zkoušku bez přítomnosti roztoku, v němž se glycerol nachází. Křivka, získaná nanesením koncentrace glycerolu v mol/l proti extinkci při 546 nm je znázorněna na obr. 3.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob stanovení glycerolu, vyznačující se tím, že se glycerol inkubuje ve vodném prostředí za přítomnosti kyslíku s galaktózooxidázou a pak se měří výsledek reakce, a to spotřeby kyslíku, množství vzniklého peroxidu vodíku nebo množství glycerolaldehydu.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se spotřeba kyslíku měří polarograficky.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se vzniklý peroxid vodíku stanoví enzymaticky při použití katalázy nebo peroxidázy.

4. Způsob podle bodu 3, vyznačující se tím, že se přidá peroxidáza a chromogenní sloučenina a měří se zbarvení nebo změny extinkce.

5. Způsob podle bodů 1 až 4, vyznačující se tím, že se měření provádí kineticky v předem stanoveném časovém intervalu.

6. Způsob podle bodů 1 až 5, vyznačující se tím, že se k inkubačnímu prostředí přidá glyceroldehydrogenáza a NAD.

7. Způsob podle bodu 6, vyznačující se tím, že se přidává NAD spolu se systémem pro regeneraci NAD.

8. Způsob podle bodu 7, vyznačující se tím, že se jako systém pro regeneraci NAD užije pyrohroznán a laktátdehydrogenáza.

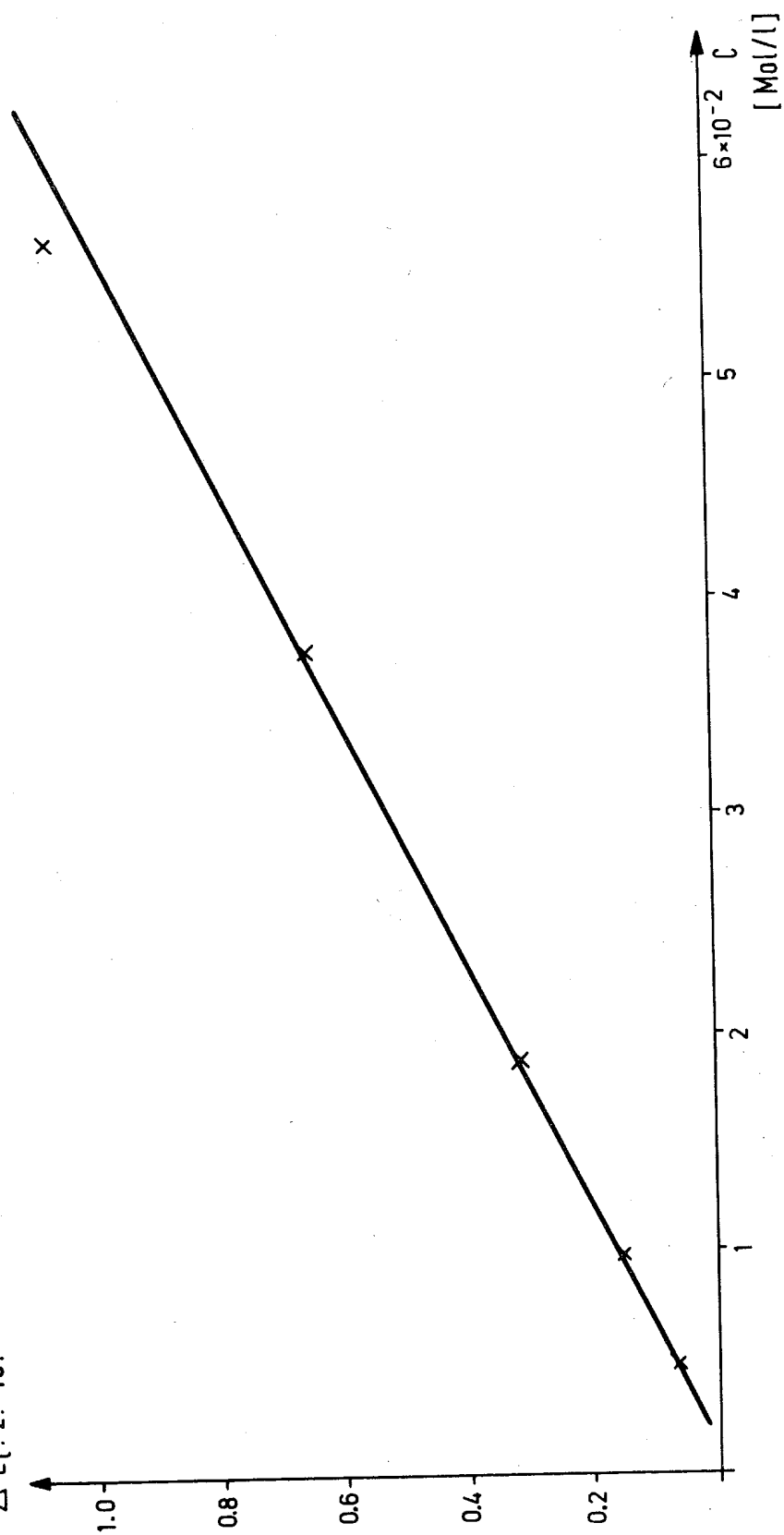
9. Způsob podle bodů 1 až 8, vyznačující se tím, že se postup provádí při pH 7,0 až 9,0.

10. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se vzniklý glycerolaldehyd převede působením hydrazinového derivátu na odpovídající hydrazon a tato látka se pak měří.

11. Způsob podle bodu 6, vyznačující se tím, že se stanoví redukovaný NAD.

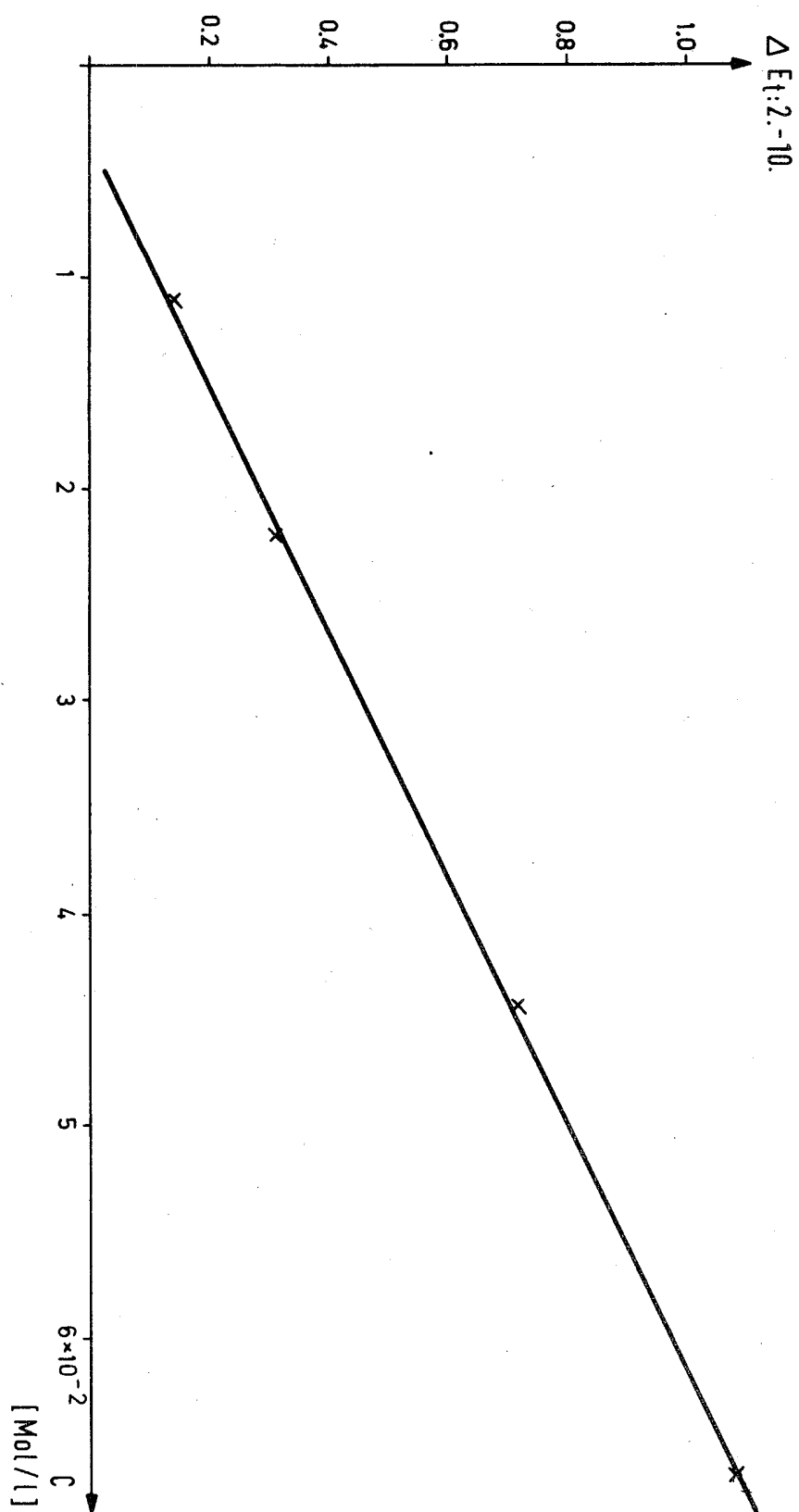
3 výkresy

Obr. 1

 $\Delta E_t: 2.-10.$ 

227331

Obr. 2



227331

