



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

251145

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 27 12 85
(21) PV 9899-85

(51) Int. Cl.⁴

C 12 Q 1/26

(40) Zveřejněno 16 10 86

(45) Vydáno 15 04 88

(75)

Autor vynálezu

CHROMÝ VRATISLAV ing. CSc., BRNO

(54) Enzymové činidlo pro stanovení glukosy oxidační kopulací obsahující glukosaoxidasu, peroxidasu a 4-aminoantipyrin

Enzymové činidlo obsahuje kromě obou uvedených enzymů a 4-aminoantipyrinu polyvinylpyrrolidon v množství 0,05 až 2 g a kyselinu pentahydroxykapronovou ve formě soli v množství 0,2 až 5 g, vztaženo na 1 000 μ kat glukosaoxidasu. Enzymové činidlo se připraví buď homogenizací jeho složek v pevném stavu nebo lyofilizací vodného roztoku obsahujícího uvedené složky. Enzymové činidlo je při teplotě +8 °C stále nejméně jeden rok a je kompatibilní s analytickým systémem pro stanovení glukosy v séru, plasmě, moči nebo celé krvi, a to buď přímo, nebo po jejich deproteinaci.

Předmětem vynálezu je enzymové činidlo pro stanovení glukosy oxidační kopulací obsahující glukosaoxidasu, peroxidasu a 4-aminoantipyrin.

Stanovení glukosy je široce využíváno v potravinářství, biochemii, humánním i veterinárním lékařství. Požadavku specifity vyhovují nejlépe enzymové metody zakončené fotometrickým stanovením chinoniminového barviva vzniklého oxidační kopulací mezi fenolem a aromatickým aminem.

Glukosa se obvykle stanovuje spřaženými enzymovými reakcemi s enzymy glukosaoxidasou a peroxidasou. Glukosaoxidasa katalyzuje oxidaci glukosy kyslíkem za vzniku peroxidu vodíku kyseliny glukonové. Peroxidasa katalyzuje oxidační kopulaci peroxidem vodíku mezi fenoly a aromatickými aminy. Na rozdíl od metod využívajících chromogeny, které lze přímo oxidovat na barevné produkty, například o-dianisidin, o-tolidin a další, je výše uvedený postup citlivější a je přitom značně potlačena interference vlivem redukujících látek přítomných ve vzorku, jako jsou kyseliny askorbová, gentisová a močová.

Jako příklad oxidační kopulace při enzymovém stanovení glukosy lze uvést metodu dle Trindera (P. Trinder: Ann. Clin. Biochem. 6, 24, 1969) využívající oba uvedené enzymy, 4-aminoantipyrin a fenol. Obvyklý postup stanovení je takový, že se připraví roztok pufru obsahující fenol a dále roztok se oběma enzymy a 4-aminoantipyrinem, které se přes použitím smíchají a reakce se nastartuje vzorkem. Kompletní glukosové činidlo obsahující všechny potřebné složky je nestálé. Vlivem světla a některých stopových nečistot z použitých chemikálií se i v chladu rychle rozkládá, narůstá absorbance slepého pokusu, a po několika dnech je obvykle již pro stanovení glukosy nepoužitelné.

Podobně je nestálý i samotný roztok obou enzymů glukosaoxidasy a peroxidasy se 4-aminoantipyrinem, neboť v roztoku postupně klesá katalytická koncentrace enzymů a 4-aminoantipyrin se oxiduje na antipyrinovou červen. Proto jsou enzymové složky činidla pro stanovení glukosy oxidační kopulací připravovány vždy odděleně a v pevném stavu. Ani pevná směs obou enzymů se 4-aminoantipyrinem není stálá. Proto je někteří výrobci připravují například tak, že fixují enzymy jejich imobilizací na pevné nasávkové podložce, a to odděleně od 4-aminoantipyrinu.

Kompletní glukosové činidlo se připravuje jejich vyloučením v pufru až před vlastní analýzou. Jiný způsob spočívá v přípravě enzymové směsi v pevném stavu spolu se stabilizátory, které ale musí být kompatibilní jak s ostatními složkami glukosového činidla, tak i s biologickým materiálem a nesmějí interferovat při vlastním stanovení glukosy. Pokud se pevné směsi enzymů se 4-aminoantipyrinem připravují lyofilizací, je nutné hledat i vhodné lyofilizační médium o výše uvedených vlastnostech.

Pro stabilizaci enzymů se nejčastěji používá albumin, který je současně i lyofilizačním médiem. Jak jsme zjistili, přítomnost albuminu v kompletním glukosovém činidle značně snižuje stálost výsledného zbarvení chinoniminového barviva, jehož absorbance klesá. Vysvětlení může být pravděpodobně oxidace albuminu katalysovaná peroxidasou (A. Gemant: Molecular Biology Report 3, 283 - 287, 1977). Podobně jsou nekompatibilní i další vysokomolekulární látky používané obecně pro stabilizaci enzymů jako jsou například dextran, polyvinylalkohol a polyethylenglykol, které ve spojení s kompletním glukosovým činidlem nebo s biologickým vzorkem vyvolávají v reakční směsi zákal.

Je zřejmé, že stabilizace enzymů glukosaoxidasy a peroxidasy se 4-aminoantipyrinem není jednoduchou záležitostí a vyžaduje specifické řešení zaručující, kromě dobré stability enzymového přípravku, i jeho kompatibilitu s ostatními složkami reakční směsi při analytickém stanovení glukosy.

K odstranění uvedených nedostatků směruje enzymové činidlo pro stanovení glukosy oxidační kopulací obsahující glukosaoxidasu, peroxidasu a 4-aminoantipyrin, vyznačené tím,

že na 1 000 μ kat glukosa oxidasy obsahuje 0,05 až 2 polyvinylpyrrolidonu o molekulové hmotnosti 10 000 až 160 000 g/mol a 0,2 až 5 g kyseliny 1,2,3,4,5-pentahydroxykapronové, s výhodou ve formě sodné, draselné nebo vápenaté soli. Enzymové činidlo lze připravit tak, že se všechny jeho uvedené složky homogenizují v pevném stavu nebo se připraví jejich roztok, který se ihned zmrazí a voda se odstraní lyofilizací.

Polyvinylpyrrolidon má v enzymovém činidle podle vynálezu synergický, dvojitý účinek, neboť stabilizuje jeho složky a je současně i lyofilizačním médiem. Jeho specifickou výhodou je, že je zcela kompatibilní s ostatními složkami kompletního glukosového činidla i s biologickým vzorkem. Ve spojení s různými typy biologických tekutin jako jsou sérum, plasma, moč nebo celá krev po deproteinaci, nevyvolává zákal v reakční směsi pro vlastní analýzu glukosy. Vliv kyseliny 1,2,3,4,5-pentahydroxykapronové, spečívá zřejmě v mechanismu zpětné regulace a projevuje se vyšší stálostí glukosa oxidasy v roztoku kompletního glukosového činidla.

Enzymové činidlo podle vynálezu připravené výše uvedeným postupem je při uchovávání při teplotě +8 °C stále nejméně jeden rok. Jak bylo s překvapením zjištěno, má vyšší stálost i kompletní roztok glukosového činidla připravený rozpuštěním enzymového činidla podle vynálezu v roztoku pufru s fenolem. Kompletní roztok glukosového činidla takto připraveného je v chladu stálý až dva měsíce, při teplotě místnosti až 15 dnů.

Na rozdíl od postupů, využívajících ke stabilizaci obou uvedených enzymů se 4-aminoantipyrinem jejich oddělenou imobilizaci na nasávkovém nosiči, což vyžaduje speciální strojní zařízení, lze enzymové činidlo podle vynálezu vyrábět přímo, bez oddělování jeho složek a na běžném strojním zařízení. K objasnění předmětu vynálezu jsou uvedeny následující příklady.

Příklady provedení

P ř í k l a d 1

Připraví se 200 ml vodného roztoku obsahujícího 5 g 4-aminoantipyrinu, 400 μ kat peroxidasy, 5 000 μ kat glukosa oxidasy, 10 g polyvinylpyrrolidonu o molekulové hmotnosti 10 000 g/mol a 25 g draselné soli kyseliny 1,2,3,4,5-pentahydroxykapronové. Rostok se ihned zmrazí a lyofilizuje se.

P ř í k l a d 2

Připraví se pevná homogenní směs obsahující 1 g 4-aminoantipyrinu, 100 μ kat peroxidasy, 1 000 μ kat glukosa oxidasy, 50 mg polyvinylpyrrolidonu o molekulové hmotnosti 160 000 g/mol a 200 mg sodné soli kyseliny 1,2,3,4,5-pentahydroxykapronové.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Enzymové činidlo pro stanovení glukosy oxidační kopulací obsahující glukosa oxidasu, peroxidasu a 4-aminoantipyrin vyznačené tím, že na 1 000 μ kat glukosa oxidasy obsahuje 0,05 až 2 g polyvinylpyrrolidonu o molekulové hmotnosti 10 000 až 160 000 g/mol a 0,2 až 5 g kyseliny 1,2,3,4,5-pentahydroxykapronové, s výhodou ve formě sodné, draselné nebo vápenaté soli.