



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

210467
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
G 01 N 31/22

(22) Přihlášeno 28 11 79

(21) [PV 8185-79]

(40) Zveřejněno 29 05 81

(45) Vydáno 15 02 83

(75)

Autor vynálezu

VERMOUSEK IVAN RNDr. CSc. a CHROMÝ VRATISLAV ing. CSc., BRNO

(54) Stabilní enzymový přípravek pro stanovení močoviny

1

Předmětem vynálezu je stabilní enzymový přípravek pro stanovení močoviny.

Stanovení močoviny má značný analytický, ale zejména klinický význam, neboť močovina je nejdůležitějším konečným produktem metabolismu bílkovin.

V klinické biochemii je stanovení močoviny v biologickém materiálu prováděno nejčastěji fotometricky, například reakcí s alfa-diketony a jejich oximy. V poslední době často enzymovou metodou, kdy je močovina specificky hydrolysována enzymem ureasou na kysličník uhlíčitý a amoniak, který se pak stanovuje vhodnou analytickou reakcí, například jako barevný indofenol. Enzymové stanovení močoviny je specifické a na rozdíl od reakce močoviny s alfa-diketony nebo jejich oximy nevyžaduje zahřívání na vysokou teplotu. Vlastní enzymová reakce močoviny s ureasou probíhá s optimální efektivitou ve vodných roztocích o pH 6,0 až 8,5. Tyto roztoky musí být vhodným způsobem pufovány, aby bylo zaručeno optimální pH enzymové reakce i po přidání analysovaného vzorku, a aby byly vyloučeny i změny pH amoniakem resultujícím při hydrolyse močoviny.

Velkou nevýhodou dosud známých činidel obsahujících enzym ureasu je jejich nízká stabilita, neboť zejména ve vodných ro-

2

tocích je ureasa rychle inhibována, a to již stopami těžkých kovů. Podobně jsou málo stabilní i činidla obsahující enzym ureasu v pevném stavu, jsou-li vystavena účinkům atmosférické vlhkosti.

Nežádoucí těžké kovy mohou být do reakční směsi vnášeny jako stopové nečistoty spolu s látkami užívanými jako pufrы nebo v analysovaném materiálu.

K odstranění shora uvedených nedostatků směřuje stabilní enzymový přípravek podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje 0,05 až 40 dílů hmotnostních ureasy o specifické aktivitě 1000 až 1500 000 U/g, 1 až 10 dílů hmotnostních pufrujících složky, například 5,5'-diethylbarbituranu alkalického kovu, fosforečnanů alkalických kovů, například sodíku nebo draslíku, 1 až 20 dílů hmotnostních komplexanu, například ve formě volné kyseliny nitrilotrioctové, ethylendiamintetraoctové nebo její dvojsodné soli a popřípadě 90 až 99,9 procenta hmotnostních dílů vody. Přípravek dále obsahuje 3 až 120 dílů hmotnostních azidu alkalického kovu, například azidu sodného.

Stabilní enzymový přípravek podle vynálezu obsahuje současně enzym ureasu i pufr, který nastavuje nejen pH optimální pro enzymovou reakci, ale současně stabilizuje en-

zym, jak v pevné směsi, tak i v roztoku.

Kombinací pufrující složky s komplexanem ve formě volné kyseliny s azidem sodným je dosaženo dokonalé stability přípravku nejen ve formě pevné směsi, ale i ve formě vodného roztoku pro přímé použití. Na rozdíl od dosud známých a průmyslově vyráběných forem ureasy v diagnostických soupravách, tj. suspenzí s omezenou stabilitou nejvýše 6 měsíců za snížené teploty, obsahuje enzymový přípravek podle vynálezu enzym spolu s pufrerem a stabilisujícími látkami a může být použit přímo pro enzymovou reakci, aniž je nutné dodatečně upravovat její reakční podmínky.

Enzymový přípravek může být užíván buď v pevném stavu a do reakce se dávákuje například ve formě tablety, nebo odměřením dávky prášku, nebo jako roztok. V obou případech se dávákuje do reakční směsi v takovém množství, aby reakční směs obsahovala vhodné množství enzymu ureasy, nejlépe 0,5 až 5 U. Za těchto podmínek má současně reakční směs pH optimální pro enzymovou reakci.

Jak bylo experimentálně ověřeno, je pevná směs přípravku podle vynálezu stabilní prakticky neomezeně, vodný roztok několik měsíců. Roztok tlumiče na bázi pufrující složky a komplexanu nebo i azidu eliminuje vliv těžkých kovů kombinovaných účinkem a současně v případě azidu eliminuje inhibici enzymu případnou bakteriální kontaminací. Výhodná je současně i pufrovací kapacita a z toho vyplývající nastavení optimálního pH. Činidlo podle vynálezu je možno připravit jednoduchým způsobem z levných a dostupných surovin.

Příklad 1

Připraví se pevná směs, obsahující 50 U

ureasy, 0,04 g 5,5'-diethylbarbituranu sodného, 0,03 g dvojsodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové a 0,03 g azidu sodného. Pro vlastní stanovení močoviny se do reakční směsi dávákuje 0,01 g přípravku.

Příklad 2

Připraví se pevná směs 500 U ureasy, 2,8 gramu 5,5'-diethylbarbituranu draselného a 1 g ethylendiamintetraoctové kyseliny. Pro stanovení se dávákuje 0,006 g nebo se suchá směs rozpustí v 0,25 kg vody a pro stanovení dávákuje 0,5 ml.

Příklad 3

Připraví se pevná směs, obsahující 247500 U ureasy o specifické aktivitě minimálně 15 000 U/g, 50 g 5,5'-diethylbarbituranu sodného a 100 g dvojsodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny. Pro stanovení se dávákuje 0,0044 g směsi.

Příklad 4

Připraví se pevná směs, obsahující 1 g dvojsodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové, 0,1 g hydrofosforečnanu dvojsodného a 45 000 U ureasy. Pro vlastní stanovení se rozpustí směs ve 450 ml destilované vody a pro analýzu se odměří 1,0 ml tohoto roztoku.

Příklad 5

Připraví se pevná směs ureasy (500 U), 2,8 g 5,5'-diethylbarbituranu sodného a 0,7 gramu kyseliny nitrilotrioctové. Pro stanovení se dávákuje 0,006 g této směsi.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Stabilní enzymový přípravek pro stanovení močoviny, vyznačený tím, že obsahuje 0,05 až 40 dílů hmotnostních ureasy o specifické aktivitě 1 000 až 1 500 000 U/g, 1 až 10 dílů hmotnostních pufrující složky, například 5,5'-diethylbarbituranu alkalického kovu, fosforečnanů alkalických kovů, například sodíku nebo draslíku, 1 až 20 dílů hmotnostních komplexanu, například ve

formě volné kyseliny nitrilotrioctové, ethylendiamintetraoctové nebo její dvojsodné soli a popřípadě 90 až 99,9 % hmotnostních vody.

2. Stabilní enzymový přípravek pro stanovení močoviny podle bodu 1, vyznačený tím, že obsahuje 3 až 120 dílů hmotnostních azidu alkalického kovu, například azidu sodného.