

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 14, 1976, pp. 9–13

Stabilisierung des reduzierten β -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid in einem organischen Lösungsmittel

Von H. Gallati

Diagnostische Forschungsabteilung der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel

(Eingegangen am 21. August/23. Oktober 1975)

Zusammenfassung: Das NADH zeigt eine erstaunlich gute Lagerstabilität, sofern dieses Coenzym nicht in einem wäßrigen – wie bisher –, sondern in einem wasserfreien, organischen Lösungsmittel gelöst wird.

In der vorliegenden Arbeit werden die Resultate über die Stabilität des NADH mitgeteilt, das in Ethylenglykol-Tris gelöst und während 136 Tagen bei den Temperaturen 2–8°C, 19–22°C, 35°C, 45°C und 60°C inkubiert wurde. Zum Vergleich wurde parallel dazu NADH in dest. Wasser gelöst und in gleicher Weise die Stabilität geprüft.

Stabilization of reduced β -nicotinamide-adenine-dinucleotide in an organic solvent

Summary: NADH is surprisingly stable, providing it is stored in anhydrous organic solvents, and not, as hitherto, in aqueous solvents. The stability of NADH was investigated in solution in ethylene glycol-Tris over a period of 136 days at temperatures of 2–8°C, 19–22°C, 35°C, 45°C and 60°C. For comparison, the stability of NADH in solution in distilled water was studied under similar conditions.

Einleitung

Das Problem der Stabilisierung des NADH wurde in zahlreichen Arbeiten untersucht. Dabei ist zu beachten, daß die Instabilität des NADH sich nicht nur auf die reduzierte Form, sondern auch auf die Bildung eines Inhibitors bezieht, der schon in kleinsten Mengen die Aktivitätsbestimmung der Oxidoreductasen wesentlich zu stören vermag.

NADH zeigt eine gute Lagerstabilität, sofern das Salz unter Ausschluß von Feuchtigkeit und oxydierenden Substanzen aufbewahrt wird. Daher sollte es eher in kleinen Portionen (z. B. „Tages-Portionen“) konfektioniert werden (1–2).

NADH in Lösung gilt allgemein als instabil. Zur Verbesserung der Stabilität wurde der Einfluß verschiedener Puffersysteme, des pH-Wertes der NADH-Lösung, von Anionen und Kationen sowie der NADH-Konzentration bei einzelnen Lagertemperaturen untersucht (1–8). Dabei haben sich folgende Bedingungen als vorteilhaft erwiesen: 10 mmol/l NADH in 50 mmol/l Tris-EDTA-HCl, pH 7,7. Unter diesen Bedingungen ist das NADH bei Raumtemperatur 1 Tag, und bei 2–8°C 1 Woche stabil (1).

Eine entscheidende Stabilitätsverbesserung des NADH, das unseres Wissens bisher stets in wäßrigem Milieu ge-

löst wurde, konnte trotz vieler Versuche bisher nicht erreicht werden.

Wenn man aber bedenkt, daß das NADH-Salz eine gute Stabilität aufweist, sofern durch Ausschluß von Wasser und Sauerstoff die Autoxydation des NADH wie auch die Bildung des Oxidoreductase-Inhibitors unterbunden wird, so drängt sich der Versuch auf, das NADH in einem wasserfreien, organischen Lösungsmittel zu lösen und unter diesen neuen Bedingungen die Stabilität des gelösten NADH zu prüfen.

Material und Methoden

Material

Alle organischen Lösungsmittel waren von analytischer Reinheit. Ethylenglykol (1,2-Ethandiol, Glycol, puriss. p.a., 99,5%, MG: 62,07, F: –11 – –9°C, Kp: 92°C, d_4^{20} : 1.113, n_D^{20} : 1.431) wurde von Fluka bezogen, Methanol, 1-Propanol und Aceton waren von Merck.

Als Puffersubstanz wurde Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris, Fluka, puriss. p.a. MG: 121,14) eingesetzt.

NAD und NADH wurde von Boehringer-Mannheim geliefert. Beide Coenzyme waren vom Reinheitsgrad II.

Als Enzymkontrollserum wurde ein eigenes, Albumin-haltiges, lyophilisiertes Enzympräparat eingesetzt, das unmittelbar vor Gebrauch durch Zugabe von dest. Wasser rekonstituiert wurde. Die Werte für die einzelnen Enzyme lagen im leicht pathologischen Bereich.