

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 891920 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **891920**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification (IPC⁴)
C12Q 1/58

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **21.04.1989**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **21.04.1989**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **30.10.1989**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etu oikeus - Prioritet - Priority

29.04.1988 DD WP 315210-4

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • VEB Arzneimittelwerk Dresden, Wilhelm-Pieck-Strasse 35 8122 Radebeul, DDR, REPUBLICA DEMOCRATA GERMANA, (DD)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Harseim, Bärbel, DDR, REPUBLICA DEMOCRATA GERMANA, (DD)

2 • Hartung, Horst, DDR, REPUBLICA DEMOCRATA GERMANA, (DD)

3 • Reichardt, Werner, DDR, REPUBLICA DEMOCRATA GERMANA, (DD)

4 • Winkler, Manfred, DDR, REPUBLICA DEMOCRATA GERMANA, (DD)

5 • Kallies, Karl-Heinz, DDR, REPUBLICA DEMOCRATA GERMANA, (DD)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Boco IP Oy Ab, Itämerenkatu 5, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Koeliuska urean määrittämiseksi sekä sen käyttö

Testband för bestämning av urea samt användning därav

Testiliuska urean määrittämiseksi ja sen käyttö
Testband för bestämning av urea samt användning därav

Keksintö kohdistuu testiliuskaan sekä sen käyttöön ureapitoisuuden nopeaksi kvantitatiiviseksi määrittämiseksi erityisesti maidosta. Sitä voidaan käyttää välittömästi sekä maataloudessa että maitoa jalostavassa teollisuudessa.

Alalla tunnetaan useita menetelmiä ureapitoisuuden kvantitatiiviseksi määrittämiseksi maidosta, esimerkiksi urean entsymaattinen pilkkominen ureaasilla ja täten muodostuneen ammoniakkin titrimetrinen määrittäminen; sinisen värin, joka muodostuu saattamalla urea reagoimaan fenolin ja alkalihypokloriitin kanssa, kolorimetrinen mittaaminen [Thaler, H. ja Sturm, W., Deut. Lebensm. Rundsch., 61 (1966) 35-40; Krom, M. D., Analyst, 105 (1980) 305-316; Broderick, G. A., Kang, J. H., Linow, F. ja Schaffner, B., Nahrung, 24 (1980) 85-87; Behringer, G. ja Klostermeyer, H. J., Lebensmittel Unters. Forsch., 172 (1981) 362-364)] tai urean ja p-dimetyyliaminobentsaldehydin väliset värireaktiot [Brown, H. H., Anal. Chem., 31 (1959) 1844-1846; McDowell, A. K. R., J. Dairy Res., 39 (1972) 27-33] tai urean ja diasetyylimonoksiimin väliset värireaktiot [Vignon, B., Väitöskirja, Université Nancy I (1976); Siast, G., Ann. Biol. Clin., 26 (1968) 431-448].

Yhtiön Boehringer ehdottama pikamääritys perustuu urean pilkkomiseen ureaasientsyymillä, minkä jälkeen tällöin muodostunut ammoniakki saatetaan reagoimaan alfa-ketoglutaraatin kanssa glutamaatti-dehydrogenaasin läsnäollessa ja sitten reaktiossa kulunut määrä yhdistettä NaOH määritetään spektrofotometrisesti. Tämän analyysimenetelmän käyttö edellyttää kuitenkin monimutkaisia ja aikaavieviä laboratorioanalyyysejä, jotka tekevät mahdottomiksi ureapitoisuuden nopean määrittämisen esimerkiksi käytännön maataloutta harjoittavissa yrityksissä.

Yhtiön Boehringer kehittämä, testiliuskaa hyväksikäyttävä

menetelmä ureapitoisuuden määrittämiseksi verestä, seerumista ja plasmasta perustuu värireaktion arviointiin ja se edellyttää heijastusfotometrin käyttöä värin voimakkuuden, joka on verrannollinen ureapitoisuuteen, määrittämiseksi.

Yhtiön Merck, Darmstadt, markkinoima testiliuska urean määrittämiseksi tekee mahdolliseksi ureapitoisuuden määrittämisen verestä, ei kuitenkaan maidosta. Sama pätee patenttijulkaisun DD-PS 137 384 mukaiselle menetelmälle urean määrittämiseksi.

Maidon voimakkaasta puskurivaikutuksesta johtuen ureaasientsyymin tuottama ammoniakki pysyy reaktiovyöhykkeessä eikä diffundoidu indikaattorikerrokseen. Maidon ja testiliuskan väliset kostutusvaikeudet vaikeuttavat osittain asianmukaista määrittystä.

Keksinnön tavoitteena on kehittää taloudellinen ja nopea menetelmä ureapitoisuuden kvantitatiiviseksi määrittämiseksi maidosta, jossa menetelmässä sopivan testiliuskan avulla päästään eroon tunnettujen menetelmien haitoista.

Keksintö perustuu tehtävään kehittää taloudellinen ja nopea koemenetelmä ureapitoisuuden kvantitatiiviseksi määrittämiseksi maidosta, jota menetelmää voidaan käyttää maataloudessa harjoitetun karjankasvatuksen olosuhteissa. Keksinnön tehtävänä on samoin päästä ammoniakin vapautumiseen reaktiovyöhykkeestä ureaasientsyymin aktiivisuutta tällöin kuitenkin olennaisesti heikentämättä.

Tämä tehtävä ratkaistaan keksinnön mukaisesti siten, että maitonäytteen ureapitoisuus määritetään kantajalle levitetyllä urean testiliuskalla, joka koostuu reaktiovyöhykkeestä ja indikaattorivyöhykkeestä. Todettiin, että reaktiovyöhyke, joka saa aikaan reaktiovyöhykkeeseen tuodussa maidossa läsnäolevan urean entsyymaattisen pilkkoutumisen, saadaan syntymään kyllästämällä imukykyinen kantajamateriaali ureaasientsyymillä,

glukoosilla, emäksellä ja tensidillä.

Reaktiovyöhykkeen kantajamateriaali voi koostua luonnonkuiduista tai synteettisistä kuiduista, kunhan vain kantajamateriaali ei vaikuta millään tavalla tapahtuvaan reaktioon ja kunhan vain se on riittävän imukykyistä. Edullisesti voidaan käyttää suodatinpaperia, jonka neliömassa on 60...400 g/m².

Emäksinä tulevat kysymykseen reaktiovyöhykettä valmistettaessa natriumhydroksidi, kaliumhydroksidi, edullisesti kuitenkin heikkojen happojen suolat kuten kaliumkarbonaatti, natriumkarbonaatti, magnesiumkarbonaatti tai natriumsitraatti. Emäs ei saa olla liian vahvaa (lipeä), jotta entsyymi ei tuhoutuisi, ja jotta järjestelmä pysyisi optimaalisella pH-alueella. Toisaalta maito on vielä luonnollisestikin puskuroitava, jotta ammoniakki saataisiin ylipäänsä poistumaan siitä.

Ollaan todettu, että ei-ionisia tensidejä, kuten alkyylifenyyli-
lipolyetyleeniglykolia tai alkyylipolyglykolieetterisulfaat-
tia, tai anionisia tensidejä, kuten esimerkiksi alkyylisulfaat-
teja käyttämällä päästään maidossa läsnäolevien proteiinien ja
kalsiumin hyvään liukenemiseen. Tällöin päästään myös lujite-
tun reaktiovyöhykkeen hyvään kostumiseen näytenesteenä toimi-
valla maidolla, tämän kostumisen ollessa huonompaa kationisia
tensidejä käytettäessä.

Reaktiovyöhyke on kyllästetty seuraavasti:

ureaasilla pitoisuutena 0,30...0,90 mg/cm²,

edullisesti pitoisuutena 0,70 mg/cm²,

glukoosilla pitoisuutena 0,05...0,30 mg/cm²,

edullisesti pitoisuutena 0,17 mg/cm²,

tensidillä pitoisuutena 0,25...1,30 mg/cm²,

edullisesti pitoisuutena 0,63 mg/cm²,

emäksellä pitoisuutena 0,2...0,4 mg/cm²,

edullisesti pitoisuutena 0,28 mg/cm².

Ureaasin aktiivisuus ei kärsi, kun jotakin mainittua emästä käytetään esitetyllä pitoisuusalueella. Tällöin kuitenkin ammoniakki kykenee vapautumaan maidon suoloista ja diffundoitumaan indikaattorivyöhykkeeseen.

Keksinnön mukaisen tensidin lisääminen tekee mahdolliseksi lujitetun reaktiovyöhykkeen kostumisen siten, että reaktiovyöhykkeeseen imeytyy tietty määrä näytenestettä.

Hydrofobista materiaalia, edullisesti vettä läpäisemätöntä muovimateriaalia olevan alustan yhteen päähän on sijoitettu edellä kuvatulla tavalla valmistettu reaktiovyöhyke ja välittömästi sen viereen ammoniakin kanssa reagoiva, sinänsä tunnetulla tavalla aikaansaatu indikaattorivyöhyke. Ulottuvuudet ovat edullisesti kantajan (alustan) tapauksessa 70 x 6 mm, reaktiovyöhykkeen tapauksessa 6 x 6 mm ja indikaattorivyöhykkeen tapauksessa 40 x 6 mm, reaktiovyöhykkeen ja indikaattorivyöhykkeen välisen etäisyyden ollessa 5 mm. Reaktio- ja indikaattorivyöhyke on kiinnitetty alustaan veteen liukenemattomalla liimalla. Tällainen testiliuska on sijoitettu määrityksen toteuttamista varten pieneen, yksipuolisesti suljettuun putkeen siten, että reaktiovyöhyke koskettaa suljettua päätä.

Keksinnön mukaisen testiliuskan etuna on sen helppo käsiteltävyys myös käytännön maataloudessa vallitsevissa olosuhteissa erityisiä laitteita tai mittausinstrumentteja käyttämättä.

Määrittäminen toteutetaan siten, että reaktiovyöhykkeen käsiteltävä testiliuska upotetaan 3 sekunniksi tutkittavaan maitonäytteeseen tai 15 μ l näyteliuosta pipetoidaan liuskan päälle. Olennaista on tällöin se, että reaktiovyöhykkeen päälle saadaan tällä tavalla annostelluksi tutkittavaa näytettä 0,040...0,070 ml/cm², edullisesti 0,056 ml/cm² oleva määrä. Tämän jälkeen liuska laitetaan yksipuolisesti suljettuun lasiputkeen siten, että reaktiovyöhyke sijaitsee vaakasuorassa makaavan putken pohjalla. 120 minuutin kuluttua mitataan indi-

kaattorivyöhykkeen värjäytyneen osan pituus, joka on verrannollinen maitonäytteessä läsnäolleen ureamäärään.

Ureapitoisuus voidaan määrittää vertaamalla indikaattorivyöhykkeen värjäytyneen osan pituutta toisella menetelmällä aikaansaadussa kalibrointitaulukossa esitettyihin arvoihin.

Vaihtoehtoisesti on mahdollista käsitellä näytteen värjäämän indikaattorivyöhykkeen ohella indikaattorivyöhykettä urean vesiliuoksella, jonka pitoisuus tunnetaan (esim. 10 mg/100 ml). Mittaamalla indikaattorivyöhykkeiden värjäytyneet osat saadaan suureet

x = näytteellä saadun osan pituus,

y = standardilla saadun osan pituus,

joiden avulla ureapitoisuus voidaan laskea kaavoista

$$\frac{\text{mg ureaa}}{100 \text{ ml}} = \frac{x \cdot \text{standardin pitoisuus}}{y \cdot 0,76} \quad \text{I}$$

$$\frac{\text{mmol ureaa}}{1000 \text{ ml}} = \frac{x \cdot \text{standardin pitoisuus} \cdot 7,89}{y} \quad \text{II}$$

Keksinnön mukaista testausmateriaalia ja sen käyttöä havainnollistetaan lähemmin seuraavien esimerkkien avulla.

Esimerkki 1

Lasiastian, jonka ulottuvuudet ovat 300 x 40 x 30 mm, laiteaan 200 ml viinihapon (0,161 g) etanoliliuosta ja 100 ml bromikresolivihreän (0,256 g) etanoliliuosta. 37 paperiliuskaa, joiden ulottuvuudet ovat 300 x 40 mm, kyllästetään tällä liuoksella siten, että liuskat upotetaan liuokseen (1 minuutiksi), niitä kuivataan ilmassa ja sitten kuivauskaapissa 70 °C:n lämpötilassa tunnin ajan. Näistä liuoskoista saadaan indikaattorivyöhykkeitä leikkaamalla liuskoja, joiden leveys on 6 mm ja pituus 40 mm.

Lasiastiaan laitetaan 75 ml ureaasientsyymin (1,2 g) vesiliuosta, 0,3 g glukoosia, 0,450 ml kaliumkarbonaatin kylläistä vesiliuosta sekä 1,12 g alkyyliipolyglykolieetterisulfaattia. 15 paperiliuskaa, joiden ulottuvuudet ovat 300 x 40 mm, kylästetään tällä liuoksella siten, että liuskat upotetaan tähän liuokseen 1 minuutiksi ja niitä kuivataan sitten ilmassa. Valmiita reaktiovyöhykkeitä saadaan leikkaamalla paperipaloja, joiden ulottuvuudet ovat 6 x 6 mm.

Vettä läpäisemättömälle muoviliuskalle, jonka ulottuvuudet ovat 70 x 6 mm, liimataan kulloinkin yksi reaktiovyöhyke ja indikaattorivyöhyke siten, että reaktiovyöhyke sijaitsee liuskan päässä ja indikaattorivyöhyke sijaitsee 5 mm:n etäisyydellä reaktiovyöhykkeestä. Liimaaminen tulee toteuttaa kautsuhpohjaisella, veteen liukenemattomalla liimalla.

Testiliuska upotetaan maitonäytteeseen noin 3 sekunniksi, kunnes reaktiovyöhyke on kastunut täydellisesti. Liiallinen neste pyyhitään pois. Tämän jälkeen liuska työnnetään yksipuolisesti suljettuun lasiputkeen, jonka halkaisija on 6,5 mm, siten, että reaktiovyöhyke sijaitsee suljetussa päässä. Indikaattorivyöhykkeen värjäytyneen osan pituus mitataan 120 minuutin kuluttua. Ureapitoisuus saadaan kalibrointitaulukosta. Kalibrointitaulukko laaditaan toista ureamenetelmää vastaan (esim. Conway-määrittely). Kalibrointitaulukko pätee kaikille valmistetuille testiliuskoille.

Esimerkki 2

Esimerkin 1 mukaiseen reaktiovyöhykkeeseen pipetoidaan 15 µl maitoa. Testiliuska työnnetään esimerkissä 1 esitetyllä tavalla lasiputkeen. Samalla tavalla käsitellään urean kahta vesiliuosta, joiden pitoisuus on tunnettu (20 mg/100 ml ja 30 mg/100 ml). Mittaamalla indikaattorivyöhykkeistä värjäytyneiden osien pituus saadaan kaavoihin I ja II sijoitettavat suureet x ja y.

Kun kyseessä on maito, jonka ureapitoisuus on 25 mg/100 ml, niin 120 minuutin piuisen reaktioajan jälkeen saadaan seuraavat mittausarvot:

maito: $x = 8,5 \text{ mm}$

20 mg/100 ml: $y = 9,5 \text{ mm}$ eli keskiarvo:

30 mg/100 ml: $y = 13,0 \text{ mm}$ 25 mg/100 ml: $y = 11,25 \text{ mm}$

$$\frac{\text{mg ureaa}}{100 \text{ ml}} = \frac{8,5 \cdot 25}{11,25 \cdot 0,76} = 24,85$$

Patenttivaatimukset

1. Testiliuska urean määrittämiseksi ureaasin avulla, johon liuskaan kuuluva, pienessä putkessa sijaitseva kantaja käsittää reaktio- ja indikaattorivyöhykkeen, t u n n e t t u siitä, että yksipuolisesti suljetussa pienessä putkessa sijaitsevalle hydrofobiselle kantajalle, sinänsä tunnetun, happamalla alueella muuttuvan indikaattorivyöhykkeen viereen on sijoitettu reaktiovyöhyke, joka käsittää ureaasista, glukoosista, emäksestä ja ei-ionisesta tensidistä tai anionisesta tensidistä muodostuvan reaktiojärjestelmän.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen testiliuska, t u n n e t t u siitä, että reaktiovyöhykkeessä ureaasin pitoisuus on 0,30...0,90 mg/cm², edullisesti 0,70 mg/cm², glukoosin pitoisuus on 0,05...0,3 mg/cm², edullisesti 0,17 mg/cm², emäksen pitoisuus on 0,2...0,4 mg/cm², edullisesti 0,28 mg/cm², tensidin pitoisuus on 0,25...1,30 mg/cm², edullisesti 0,63 mg/cm².

3. Patenttivaatimusten 1 tai 2 mukainen testiliuska, t u n n e t t u siitä, että reaktiojärjestelmä sisältää emäksenä natriumhydroksidia, kaliumhydroksidia, edullisesti kuitenkin heikkojen happojen suoloja kuten kaliumkarbonaattia, natriumkarbonaattia, magnesiumkarbonaattia tai natriumsitraattia.

4. Patenttivaatimusten 1 tai 2 mukainen testiliuska, t u n n e t t u siitä, että reaktiojärjestelmä sisältää ei-ionisena tensidinä alkyylifenyyliipolyetyleeniglykolia tai alkyylipolyglykolieetterisulfaattia.

5. Patenttivaatimusten 1 tai 2 mukainen testiliuska, t u n n e t t u siitä, että reaktiojärjestelmä sisältää anionisena tensidinä alkyylisulfaattia.

6. Jonkin patenttivaatimuksen 1...5 mukainen testiliuska, t u n n e t t u siitä, että reaktiovyöhyke sijaitsee putken suljetussa päässä.

7. Jonkin patenttivaatimuksen 1...6 mukainen testiliuska, t u n n e t t u siitä, että reaktiovyöhyke ja indikaattorivyöhyke on kiinnitetty hydrofobiseen kantajaan veteen liukene-mattomalla liimalla.

8. Jonkin patenttivaatimuksen 1...7 mukainen testiliuska, t u n n e t t u siitä, että kantajan ulottuvuudet ovat 70 x 6 mm, reaktiovyöhykkeen ulottuvuudet ovat 6 x 6 mm ja indikaattorivyöhykkeen ulottuvuudet ovat 40 x 6 mm, ja että reaktiovyöhyke ja indikaattorivyöhyke sijaitsevat kantajalla pienellä etäisyydellä, edullisesti 5 mm:n päässä toisistaan.

9. Menetelmä jonkin patenttivaatimuksen 1...8 mukaisen testi-liuskan käyttämiseksi, t u n n e t t u siitä, että reaktiovyöhykkeeseen laitetaan näyte, reaktiovyöhykkeen käsittävä testi-liuska työnnetään ensin vaakasuorassa makaavaan, yksipuoli-sesti suljettuun pieneen putkeen, indikaattorivyöhykkeen värjäytyminen mitataan ja urean pitoisuus määritetään komparatto-rilla tai vertaamalla urean vesiliuosstandardiin seuraavien kaavojen mukaisesti:

$$\frac{\text{mg ureaa}}{100 \text{ ml}} = \frac{x \cdot \text{standardin pitoisuus}}{y \cdot 0,76} \quad \text{I}$$

$$\frac{\text{mmol ureaa}}{1000 \text{ ml}} = \frac{x \cdot \text{standardin pitoisuus}}{y} \cdot 7,89 \quad \text{II}$$

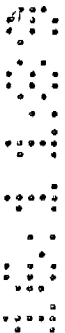
missä x = näytteellä saadun värjäytymisen pituus ja
y = standardilla saadun värjäytymisen pituus.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että reaktiovyöhykkeeseen laitetaan näytettä määränä, joka on 0,040...0,070 ml/cm², edullisesti 0,056 ml/cm².

11. Jonkin patenttivaatimuksen 10 ja 11 mukainen menetelmä,

t u n n e t t u siitä, että näyte laitetaan reaktiovyöhykkeeseen upottamalla reaktiovyöhyke 3 sekunniksi näytteeseen tai pipetoimalla siihen n. 15 µl näytettä.

12. Jonkin patenttivaatimuksen 9...11 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että indikaattorivyöhykkeen värjäytymisen mitataan 120 minuutin kuluttua.



Viitejulkaisuja - Anförda publikationer*Muutustutkimusta ei ole suoritettu.*

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI

CH

DE

DK

FR

GB

NO

SE

US

Merkintä hakemusjulkaisun esin. saksa. Offenlegungsschrift. n. n. numeron
eteen ja vastaavasti kuulutus ja patenttijulkaisun numeron eteen k. ja p.

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

81.5.91 *Pell K*

Allekirjoitus