



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

231910

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³
G 01 N 21/17

/22/ Přihlášeno 22 10 82
/21/ /PV 7496-82/

(40) Zveřejněno 14 05 84

(45) Vydáno 15 06 86

(75)

Autor vynálezu

CHROMÝ VRATISLAV ing. CSC., KONEČNÁ HANA RNDr., BRNO

(54) Dvousložkové činidlo pro fotometrické kinetické stanovení močoviny

Dvousložkové činidlo podle vynálezu obsahuje o-ftaldialdehyd a N-/1-naftyl/ethylendiamin, které sestává z vodného roztoku s obsahem o-ftaldialdehydu, kyseliny sírové a neionogenního tensidu a dále z vodného roztoku s obsahem N-/1-naftyl/ethylendiaminu a kyseliny sírové.

Dvousložkové činidlo pro fotometrické kinetické stanovení močoviny lze využít v krmivářství, biochemii, v humánní a veterinární diagnostice.

Předmětem vynálezu je dvousložkové činidlo pro fotometrické kinetické stanovení močovin.

Stanovení močoviny je široce užíváno v krmivářství, biochemii, v humánní a veterinární diagnostice. Pro tyto účely je známa řada metod. Obvyklé je fotometrické stanovení močoviny s některými alfa-diketony a jejich oximy, jako jsou například diacetyl, acetylbenzoyl, diacetylmonoxim, dimethylglyoxim a jiné. Močovina s nimi reaguje za zvýšené teploty a v silně kyselém prostředí v přítomnosti některých dalších pomocných látek za vzniku červeně zbarveného pigmentu. Nevýhodou této skupiny látek je, že reakční směs je nutné zahřívát na vysokou teplotu 80 až 100 °C a stanovení lze jen obtížně automatizovat.

Další skupina metod je založena na enzymovém stanovení močoviny enzymem ureázou, která katalyzuje její rozklad na amoniak a kysličník uhličitý. Určuje se obvykle amoniak některou z reakcí stanovení amoniaku, například po jeho převedení na barevný indofenol postupem podle Berthelota. I když je enzymové stanovení specifické, je poměrně pracné. Společnou nevýhodou všech uvedených postupů je obtížnost jejich automatizace, měření nelze provádět kineticky.

V tomto ohledu je výhodnější stanovení močoviny o-ftaldialdehydem a N-/1-naftyl/-ethylendiaminem, například v prostředí kyseliny sírové, kdy vzniká červeně zbarvený reakční produkt již při pokojové nebo jen mírně zvýšené teplotě 37 °C. Fotometrické stanovení lze provádět kineticky sledováním změny absorbance inkubační směsi v intervalu jedné až pěti minut po smíchání všech reagujících složek.

Postup stanovení byl například popsán D. Jungem a spol. v Clin. Chemistry 21, 1 136 až 1 140 /1975/. Při aplikaci této metody pro stanovení močoviny ve vzorcích obsahujících bílkoviny, například v živočišných nebo lidských sérech, bylo zjištěno, že v inkubační směsi se vzorkem vzniká často zákal, který stanovení ruší. Vznik a intenzita zákalu závisí na typu vzorku. V těchto případech nelze stanovení provést. Tímto postupem tedy nelze spolehlivě analyzovat zejména bílkovinné vzorky močoviny, a je proto žádoucí připravit činidlo, které by umožňovalo fotometrické kinetické stanovení i v těchto případech.

K odstranění těchto nedostatků směřuje dvousložkové činidlo pro kinetické fotometrické stanovení močoviny na bázi o-ftaldialdehydu a N-/1-naftyl/-ethylendiaminu /podle vynálezu/, jehož podstata spočívá v tom, že první složka je tvořena vodným roztokem obsahujícím na 1 hmotnostní díl o-ftaldialdehydu 1 až 580 hmotnostních dílů kyseliny sírové a 5 až 40 hmotnostních dílů neionogenního tenzidu, s výhodou ethoxylovaného oleylalkoholu, laurylalkoholu nebo myristylalkoholu a druhá složka je tvořena vodným roztokem, obsahujícím na 1 hmotnostní díl N-/1-naftyl/-ethylendiaminu ve formě báze nebo soli, například ve formě dichloridu nebo sulfátu, 0,5 až 4 hmotnostní díly kyseliny sírové.

Dvousložkové činidlo podle vynálezu umožňuje rychlé a spolehlivé stanovení močoviny fotometrickou kinetickou metodou i ve vzorcích obsahujících bílkoviny, například v živočišných sérech, aniž by v inkubační směsi vznikal nežádoucí zákal. Přítomnost neionogenního tenzidu na bázi ethoxylovaných vyšších alkoholů má specifický vliv na potlačení zákalu působeného bílkovinami a současně solubilizuje a stabilizuje o-ftaldialdehyd. Při stanovení močoviny ve vzorcích obsahujících až 10 hmotnových procent bílkovin je tvorba zákalu zcela potlačena a kalibrační funkce $DA = f/c$, kde c je koncentrace močoviny ve vzorku v mmol/l, má lineární průběh až do obsahu močoviny 50 mmol/l.

Činidlo podle vynálezu je vhodné připravovat ve formě dvou roztoků jednak s ohledem na jeho vyšší stabilitu, jednak proto, že s ním lze provádět fotometrické kinetické stanovení močoviny různými postupy a s využitím různých typů automatických kinetických analyzátorů, nebo i manuálně pomocí jednoduchého digitálního fotometru.

Jak bylo nalezeno, s činidlem podle vynálezu jsou i při analýze krevních sér získány přesné a správné hodnoty močoviny, korelující se stanovením močoviny diacetylmonoximem nebo

se stanovením enzymovým. Činidlo podle vynálezu lze vyrábět ve stabilní formě z dostupných surovin.

P ř í k l a d 1

Připraví se 2 200 ml vodného roztoku obsahujícího 1,3 g o-ftaldialdehydu, 20 g ethoxylovaného oleylalkoholu a 0,7 ml koncentrované kyseliny sírové.

Připraví se 800 ml vodného roztoku obsahujícího 1,3 g N-/1-naftyl/ethylendiamin dihydrochloridu a 180 ml koncentrované kyseliny sírové.

P ř í k l a d 2

Připraví se 250 ml vodného roztoku obsahujícího 0,1 g o-ftaldialdehydu, 36 g koncentrované kyseliny sírové a 0,5 g ethoxylovaného myristylalkoholu.

Připraví se 80 ml vodného roztoku obsahujícího 0,1 g N-/1-naftyl/ethylendiamin-sulfátu a 10 g koncentrované kyseliny sírové.

P ř í k l a d 3

Připraví se 250 ml vodného roztoku obsahujícího 0,1 g o-ftaldialdehydu, 58 g koncentrované kyseliny sírové a 4 g ethoxylovaného laurylalkoholu.

Připraví se 50 ml vodného roztoku obsahujícího 0,1 g N-/1-naftyl/ethylendiaminu a 0,05 g koncentrované kyseliny sírové.

P ř í k l a d 4

Oba roztoky činidel podle vynálezu z příkladů 1 až 3 se před analýzou vytemperují na 37 °C. Do temperované kyvety fotometru se odměří 2,5 ml roztoku o-ftaldialdehydu podle příkladů 1 až 3, přidá se 0,05 ml vzorku a reakce se nastartuje 0,5 ml roztoku N-/1-naftyl/ethylendiaminu podle příkladů 1 až 3. Sleduje se změna absorbance mezi 30 až 90 s po startu. Ze změny absorbance vzorku $/dA_1/$, standardu močoviny $/dA_2/$ a blenku obsahujícího místo vzorku vodu $/dA_3/$ se vypočte obsah močoviny ve vzorku.

Je možné postupovat i tak, že se bezprostředně před analýzou smíchají oba roztoky podle vynálezu podle příkladů 1 až 3 v poměru 5 : 1, ke 3 ml směsi se přidá 0,05 ml vzorku a sleduje se změna absorbance podobně jako v předešlém případě.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Dvousložkové činidlo pro fotometrické kinetické stanovení močoviny na bázi o-ftaldialdehydu a N-/1-naftyl/ethylendiaminu, vyznačené tím, že první složka je tvořena vodným roztokem obsahujícím na 1 hmotnostní díl o-ftaldialdehydu 1 až 580 hmotnostních dílů kyseliny sírové a 5 až 40 hmotnostních dílů neionogenního tenzidu, s výhodou ethoxylovaného oleylalkoholu, laurylalkoholu nebo myristylalkoholu a druhá složka vodným roztokem obsahujícím na 1 hmotnostní díl N-/1-naftyl/ethylendiaminu ve formě báze nebo soli, například dihydrochloridu nebo sulfátu 0,5 až 4 hmotnostních dílů kyseliny sírové.