



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

224 488

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 10 07 81
(21) PV 5325-81

(51) Int. Cl.³ G 01 N 31/22

(40) Zveřejněno 27 05 83
(45) Vydáno 15 02 86

(75)

Autor vynálezu SVOBODA VLASTIMIL ing., BRNO
PULKRÁBKOVÁ JITKA prom.chem., LELEKOVICE

(54) Reagenční proužky k důkazu a stanovení kyseliny askorbové

1

Vynález se týká složení indikačního systému stabilních reagenčních proužků pro stanovení kyseliny askorbové.

Ke stanovení kyseliny askorbové, vitamínu C, v různých biologických, farmaceutických nebo potravinářských materiálech a produktech se užívá řady fyzikálních nebo chemických metod. I když jsou tyto metody poměrně přesné, vyžadují dokonalé laboratorní a přístrojové vybavení a jsou povětšinou dosti pracné a zdoluhavé. V řadě případů je však potřeba zjistit přítomnost kyseliny askorbové nebo určit její obsah rychlým a jednoduchým způsobem, byť i za cenu poněkud nižší přesnosti dosažených výsledků. Obzvláště často je takto potřeba zjistit přítomnost kyseliny askorbové a určit její obsah v tělních kapalinách, jako např. moč nebo krev, v nichž přítomnost kyseliny askorbové ruší některá diagnosticky významná laboratorní vyšetření, jako je stanovení glukosy v moči nebo séru, hemoglobinu nebo erythrocytů v moči a podobně.

Pro všechny tyto účely je obecně nejvhodnější použití tzv. reagenčních proužků, v nichž všechna činidla, potřebná k průběhu barevné chemické reakce, na jejímž principu je stanovení založeno, jsou obsažena v pevném stavu v indikačním systému proužku, tj. jsou nanesena na vhodném nesákavém nosiči. Pomocí těchto proužků je sice možné získat pouze semikvantitativní výsledky, zato je však práce s nimi neobyčejně jednoduchá a rychlá: celé stanovení totiž spočívá v namočení proužku do vyšetřované kapaliny a odečtení výsledku dle odstínu a intenzity vzniklého zbarvení indikační plošky.

Prvé proužky tohoto druhu byly popsány již před řadou let například v práci F. Feigl, Spot Tests in Organic Analysis, 7. vyd., 1966, na str. 475. Představují proužek filtračního papíru, na který je nanesena amonná sůl kyseliny molybdatofosforečné a dusičnan amonný,

jehož přítomnost má zvýšit stabilitu proužků. Po namočení do kapaliny obsahující kyselinu askorbovou se tyto proužky barví modře v důsledku redukce žluté molybdatofosforečné kyseliny na tzv. molybdenovou modř. Přes přídavek dusičnanu amonného jsou však tyto proužky značně nestálé, neboť se i při skladování v uzavřeném obalu barví již po několika dnech zelenavě až modře, údajně vlivem redukce kyseliny molybdatofosforečné celulosou papíru.

Nepatrně obměněné složení proužků pro stanovení kyseliny askorbové popisuje i americký patentní spis 3 771 964, který užívá ke stabilizaci dusičnan sodný nebo draselný v přítomnosti silné organické kyseliny, jako např. kyseliny malonové. Tyto proužky jsou sice poněkud stabilnější a použitelné i pro detekci a stanovení kyseliny askorbové v moči, neboť díky přítomnosti poměrně silné organické kyseliny není stanovení kyseliny askorbové rušeno přítomností kyseliny močové, která při vyšším pH rovněž redukuje kyselinu molybdatofosforečnou na molybdenovou modř. Nevýhodou těchto proužků je však opět skutečnost, že se nedají použít na tzv. polyfunkčních proužcích, tj. na proužcích obsahujících více indikačních plošek určených k současnému stanovení několika různých součástí, např. moče. Z indikační plošky pro stanovení kyseliny askorbové se totiž časem uvolňují z přítomného alkalického dusičnanu stopy kyslíčnických dusíků, které ničí ostatní indikační plošky, zejména plošky pro stanovení glukosy, krve a pH. Vedle toho jsou ale tyto proužky i málo citlivé, neboť dovolují stanovit kyselinu askorbovou teprve od koncentrace 300 mg/l a více. Navíc, barevná změna těchto proužků probíhá značně pomalu, takže i s tímto poměrně vysokými koncentracemi kyseliny askorbové nabudou proužky svého konečného modrého zabarvení teprve asi po 1 min, tedy za dobu, kdy již měl být dávno znám výsledek testu na přítomnost a koncentraci kyseliny askorbové jako složky rušící jiné barevné testy.

Nyní však bylo zjištěno, že tyto nedostatky lze odstranit pomocí předloženého vynálezu, jehož předmětem jsou reagenční proužky k důkazu a stanovení kyseliny askorbové v různých kapalinách a materiálech, jejichž indikační systém obsahuje kyselinu molybdatofosforečnou nebo její alkalickou sůl, kyselé reagující látku a stabilizátor, vyznačené tím, že obsahují jako stabilizátor síran ceričitý nebo síran cериčito-amonný a/nebo jako kyselé reagující látku kyselinu maleinovou. Je výhodné, obsahují-li proužky podle vynálezu smáčedlo, například laurylsulfát sodný, cetyltrimethylamoniumbromid nebo polyethylenglykol, a/nebo přirozenou nebo syntetickou polymerní látku, například polyvinylpyrrolidon nebo elginát sodný a/nebo indiferentní barvivo například tartrazin.

Kyselinou molybdatofosforečnou, použitou v indikačním systému proužků dle tohoto vynálezu je myšlena běžná heteropolykyselina o složení definovaném v odborné literatuře jako kyselina fosforečnano-dodekamolybdenová, $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{MoO}_3 \cdot \text{aq}$, nebo kyselina difosforečnano-18-molybdenová, $2 \text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 18 \text{MoO}_3 \cdot \text{aq}$; se stejným výsledkem je však možné pro tento účel použít molybdatofosforečné kyseliny i jiného složení, které jsou popsány např. v monografii Gmelin's Handbuch der anorganischen Chemie, 8. vyd., sv. 53 na str. 347 až 361 a které se navzájem liší - podle podmínek přípravy - různým poměrem fosforu a molybdenu a proměnlivým obsahem krystalové vody. Pro přípravu proužků dle vynálezu je pak možné použít buď jednotlivé kyseliny nebo i jejich směsi a navíc, je možné je použít s výhodou i ve formě vhodných solí, jako jsou například soli smonná, draselná, sodná nebo lithná, neboť tyto soli reagují s kyselinou askorbovou stejně jako volné kyseliny a vedle tohoto se díky přítomnosti kyselé reagující látky v indikačním systému proužků nebo již v impregnačním roztoku ustaví vždy teková rovnováha mezi volnou kyselinou molybdatofosforečnou a její soli, která odpovídá aktuálním podmínkám pH.

Síran ceričitý nebo ceričito-amonný obsažený v indikačním systému proužků chrání kyselinu molybdatofosforečnou před postupnou samovolnou redukcí na molybdenovou modř a tím dokonale stabilizuje připravené proužky po dobu mnoha měsíců, aniž by ovšem měl výše uvedené nevýhody dosud užívaných alkalických dusičnanů. Při tom lze tento stabilizátor použít v indikačním systému proužků v poměrně malých množstvích: k dosažení dokonalé stabilizace postačuje jeho přítomnost v množství 0,05 až 15 mg, s výhodou 0,5 až 5,0 mg, vztaženo na 100 mg současně přítomné molybdatofosforečné kyseliny nebo její soli.

Jak již bylo výše naznačeno je možné tento stabilizátor se stejným výsledkem použít v kombinaci s jakoukoliv molybdatofosforečnou kyselinou nebo jakoukoliv její solí; obdobně je možné tento stabilizátor použít i za přítomnosti jakékoliv kyselé reagující látky, jejímž úkolem v indikačním systému je vytvoření hodnoty pH nižší než 5,0 s výhodou pH v rozmezí 1,5 až 3,5. Ve smyslu tohoto požadavku, je tudíž v indikačním systému proužků možné použít pevnou, netěkavou a dostatečně stálou minerální nebo organickou kyselinu nebo kyselé reagující sůl, jako je například již výše zmíněná kyselina melonová, nebo i kyselina jablčná, vinná, citronová, šťavelová, kyselý síran draselný nebo kalium dihydrogencitrát nebo směs dvou nebo více těchto sloučenin, tedy látky užívané pro obdobný účel i v jiných reagenčních proužcích. Nyní však bylo zjištěno, a je dalším předmětem tohoto vynálezu, že nejlepšími výsledky se dosáhne, jestliže indikační systém proužků obsahuje jako kyselé reagující látku kyselinu maleinovou.

Použití této kyseliny v indikačním systému reagenčních proužků dosud nebylo popsáno. Důvodem je zřejmě okolnost, že obecně jako kyselina nevykazuje tato látka ve srovnání s jinými používanými kyselinami žádné přednosti. Překvapující však bylo zjištění, že v indikačním systému proužků chová se současně sama kyselina askorbová jako stabilizátor a tím ještě zvyšuje stabilizační účinky jiných stabilizátorů, jako jsou například dosud užívané dusičnany nebo v tomto vynálezu popisovaný síran ceričitý případně ceričito-amonný. V indikačním systému proužků dle vynálezu má tudíž kyselina maleinová dvojí funkci: jako poměrně silná kyselina vytváří v indikačním systému pH potřebné pro optimální průběh redukce kyseliny molybdatofosforečné kyselinou askorbovou a současně i pro potlačení interferencí jiných náhodných redukujících součástí vyšetřovaného materiálu, jako je například kyselina močová v některých tělních kapalinách.

Tato první a základní funkce kyseliny maleinové také určuje její potřebné množství v indikačním systému proužků, tj. množství schopné po namočení proužku do vyšetřované kapaliny vytvořit a udržet v systému pH nižší než 5,0 s výhodou v rozmezí pH 1,0 až 3,0. Z tohoto hlediska je účelné použít kyselinu maleinovou v množství 1 až 30 g, s výhodou 5 až 15 g na 100 ml impregnačního roztoku, pomocí něhož je indikační systém nanášen na nasádkový nosič proužku, což představuje 1 až 20, s výhodou 2 až 8 násobek množství současně přítomné kyseliny molybdatofosforečné. Toto množství kyseliny maleinové je současně vyhovující i z hlediska její druhé funkce v indikačním systému proužků dle vynálezu, tj. funkce stabilizátoru. Jako kyselé reagující látku lze však kyselinu maleinovou použít nejen samotnou, ale i ve směsi s jinými kyselinami nebo kyselé reagujícími látkami, jejichž příklady jsou uvedeny výše. V tomto případě se pak v indikačním systému použije množství všech kyselé reagujících látek v rozmezí uvedeném výše. Z hlediska stabilizační funkce kyseliny maleinové je však nutné, aby její váhové množství činilo v tomto případě nejméně 50 % hmotnostních množství současně přítomné kyseliny molybdatofosforečné.

Je výhodné, jestliže proužky podle tohoto vynálezu obsahují v indikačním systému vedle uvedených tří základních součástí, tj. kyseliny molybdatofosforečné, kyselé reagující látky a stabilizátoru ještě také některé další pomocné látky, jejichž použití v indikačním systému proužků pro stanovení kyseliny askorbové sice dosud nebylo popsáno, které se však používají obecně ke zlepšení funkčních vlastností jiných reagenčních proužků. Jsou to zejména různé smáčedla anionaktivní, kationaktivní nebo i neionogenní povahy, jako například laurylsulfát sodný, cetyltrimethylaminiumbromid nebo polyethylenglykol. Tyto látky zvyšují smáčivost indikační zóny proužků, usnadňují proniknutí vyšetřované kapaliny k činidlům a tím zrychlují průběh barevné reakce.

Vedle toho však přispívají i ke zvýšení čistoty a brilance zabarvení, vzniklého při pozitivní reakci. Indikační systém může dále obsahovat s výhodou i tzv. zahušťovadla, tj. přirozené nebo syntetické polymerní látky, jako například polyvinylpyrrolidon, alginát sodný nebo želatinu. Tato zahušťovadla celý indikační systém mírně stabilizují a vedle toho mají pozitivní vliv na egalizaci vybarvení proužků při pozitivní reakci. Dále je výhodné, jestliže indikační systém proužků dle vynálezu obsahuje ještě také vhodné indi-

ferentní barvivo, které koriguje barevný odstín proužků při pozitivní reakci. I když principiálně lze pro tento účel použít nejrůznější barviva, nejlépe se osvědčila žlutá barviva jako například tartrazin, kyselina pikrová nebo fluorescein.

Reagenční proužky k důkazu a stanovení kyseliny askorbové podle tohoto vynálezu, tj. proužky jejichž indikační systém obsahuje kyselinu molybdatofosforečnou a síran ceričito-amonný a/nebo kyselinu maleinovou vykazují proti dosud známým proužkům nejen dokonalou stabilitu po dobu mnoha měsíců, ale i vysokou citlivost vůči kyselině askorbové a uspokojivou reakční rychlost: pomocí těchto proužků lze spolehlivě zachytit i množství okolo 30 až 50 mg/l kyseliny askorbové například v moči, přičemž odečtení výsledku je možné provést již 15 až 20 sekund po namočení do vyšetřované kapaliny.

P ř í k l a d 1

Impregnační roztok

A. Voda destilovaná	40,0 ml
Hydroxid sodný, vodný roztok	
c(NaOH) = 1,0 mol	10,0 ml
Kyselina molybdatofosforečná	3,0 g
B. Voda destilovaná	50,0 ml
Kyselina malonová	7,0 g
Dioktysulfojantaran sodný,	
0,4% vodný roztok	10,0 ml

Roztoky A a B se připraví postupným rozpouštěním svých složek v uvedeném pořadí a navzájem se smíchají. Poté se přidá ještě:

Tartrazin, 1% vodný roztok	1,5 ml
Síran ceričito-amonný,	
2% vodný roztok	3,0 ml

a vše se znovu dobře promíchá.

Tento roztok se nanese na pruh filtračního papíru o plošné hmotnosti 180 g/m² a dokonale vysuší proudem horkého vzduchu. Vysušený papír se poté rozřeže na štvřečky 6 x 6 mm a nalepí - například pomocí oboustranné samolepicí pásky - na podložku z bílé plastické hmoty.

V moči bez kyseliny askorbové je indikační ploška těchto proužků čistě žlutá, v močích s obsahem 50, 100, 200, 400 a 600 mg/l kyseliny askorbové vykazují barevnou změnu ze zelenožluté přes žlutozelenou a čistě zelenou do temně šedomodré v závislosti na koncentraci kyseliny askorbové.

Proužky nemění tyto své vlastnosti po dobu mnoha měsíců, jsou-li uchovávány v dobře uzavřených obalech nad silikagelem nebo molekulovým sítem.

P ř í k l a d 2

Impregnační roztok se připraví stejným způsobem jako v příkladu 1, avšak v roztoku A se použije 6,0 g kyseliny molybdatofosforečné a v roztoku B se místo 7,0 g kyseliny malonové rozpouští v 50 ml destilované vody použije směs 10 ml citrátového tlumiče o pH = 3,0 a 40 ml vody.

Tímto roztokem se naimpregnuje filtrační papír a zpracuje dále na hotové proužky stejně jako v příkladu 1. Připravené proužky vykazují při dokonalé stabilitě stejné funkční vlastnosti, jako proužky připravené podle příkladu 1.

Příklad 3

Připraví se dva impregnační roztoky způsobem popsaným v příkladu 1, avšak bez pří-
davku roztoku síranu ceričito-amonného; ve druhém impregnačním roztoku se mimoto ještě
nahradí kyselina malonová 8,0 g kyseliny maleinové. S použitím těchto roztoků se pak
připraví proužky jako v předchozích příkladech. Bezprostředně po přípravě jsou oba
druhy proužků vzhledově naprosto stejné a jsou prakticky rovnocenné i z hlediska svých
funkčních vlastností. Proužky s kyselinou malonovou, připravené s použitím prvního impregnač-
ního roztoku se však již po několika dnech uchovávání začínají barvit žlutozeleně a v mo-
dích poskytují falešně vyšší výsledky; naproti tomu proužky s kyselinou maleinovou, skla-
dované stejným způsobem, si svou původní čistě žlutou barvu i funkční vlastnosti zachová-
vají nezměněny po dobu mnoha měsíců.

Příklad 4

Připraví se reagenční proužky dle příkladu 1, avšak s použitím impregnačního rozto-
ku, v němž byla kyselina malonová nahrazena 8,0 g kyseliny maleinové. Současně se připraví
proužky přesně podle postupu uvedeného v příkladu 1 a sledují se vlastnosti a stabilita
obou druhů proužků. Bezprostředně po přípravě jsou oba druhy jak vzhledově, tak i z hlediska
funkčních vlastností naprosto rovnocenné. Proužky obsahující kyselinu malonovou při skla-
dování po cca 12 měsících počínají mírně zelenat a jejich reakce jsou mírně falešně zvý-
šeny, zatímco proužky s kyselinou maleinovou po stejné době skladování vykazují naprosto
nezměněné vlastnosti.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Reagenční proužky k důkazu a stanovení kyseliny askorbové v kapalinách a mate-
riálech, jejichž indikační systém obsahuje kyselinu molybdatofosforečnou nebo její alka-
lickou sůl, kyselé reagující látku a stabilizátor, vyznačené tím, že obsahují jako sta-
bilizátor síran ceričitý nebo síran ceričito-amonný a/nebo jako kyselé reagující látku
kyselinu maleinovou.

2. Reagenční proužky podle bodu 1, vyznačené tím, že obsahují sváčedlo, například
laurylsulfát, sodný, cetyltrimethylamoniumbromid nebo polyethylenglykol, a/nebo přirozenou
nebo syntetickou polymerní látku například polyvinylpyrrolidon nebo alginát sodný a/nebo
indiferentní barvivo, například tartrazin.