

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

29 220

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12N 11/12 (2006.01)

C12Q 1/46 (2006.01)

G01N 31/22 (2006.01)

G01N 33/18 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2015-31510**

(22) Přihlášeno: **14.09.2015**

(47) Zapsáno: **08.03.2016**

(73) Majitel:
ORITEST spol. s r.o., Praha 5 Smíchov, CZ

(72) Původce:
doc. Ing. Vladimír Pitschmann, CSc., Praha, CZ
Ing. Lukáš Matějovský, Hostivice, CZ
doc. PharmDr. Mgr. David Vetchý, Ph.D.,
Hvozdec, CZ

(54) Název užitého vzoru:
**Trubičkový detektor inhibitorů
cholinesteráz ve vodě**

CZ 29220 U1

Trubičkový detektor inhibitorů cholinesteráz ve vodě

Oblast techniky

Technické řešení se týká trubičkového detektoru pro rychlé a vysoce citlivé zjišťování přítomnosti vojensky i nevojensky významných inhibitorů cholinesteráz ve vodě a vodných roztocích.

5 Dosavadní stav techniky

Mezi inhibitory cholinesteráz patří zejména nervově paralytické látky (sarin, soman, tabun, VX, R-33 a další) jako nejvýznamnější skupina novodobých bojových chemických látek, nebo velké množství organofosfátů a karbamátů používaných v zemědělství ve formě insekticidních přípravků. Anticholinesterázovou aktivitu však vykazují i celá řada dalších, chemicky různorodých 10 přírodních i syntetických látek, s nimiž lze přijít do kontaktu v různých oborech činnosti. Analýza těchto látek je tudíž vysoce aktuální. Vzhledem k jejich až extrémní toxicitě se v praxi zpravidla používají metody založené na enzymatické reakci, kdy enzym (acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza) katalyzuje hydrolýzu příslušného substrátu na reakční produkt vhodný k indikaci 15 nejrozumnějšími technikami (pH-metricky, elektrochemicky, kolorimetricky). Enzymatická reakce se celkem běžně používá i v trubičkových detektorech určených ke zjišťování inhibitorů cholinesteráz v ovzduší. Trubičkové detektory jsou určeny zpravidla ke zjišťování plynů, par a výjimečně i aerosolů, ale mohou se uplatnit i při analýze vod a kapalin [Pitschmann V.: Analýza toxických látek detekčními trubičkami. Econt Consulting, Drahelčice 2005]. Obvykle se jedná o prostředky pro detekci a semikvantitativní stanovení těžkých kovů, běžných aniontů nebo organických sloučenin významných z hlediska hygieny nebo životního prostředí [Zolotov Y. A., Ivanov V. M., Amelin V. G.: Chemical test methods of analysis. Elsevier, Amsterdam 2002]. 20

Je rovněž známý trubičkový detektor inhibitorů cholinesteráz, který v principu umožňuje jejich průkaz ve vzduchu i ve vodě [Tušarová I., Halánek E., Orel J.: CZ 285 242 (1999)]. Tento prostředek obsahuje dvě ampulky s tlumivým roztokem, srovnávací vrstvu z drceného skla impregnovanou směsí substrátu a chromogenního činidla (Ellmanovo činidlo nebo guinejská zeleň), 25 případně chromogenním substrátem 1-(thiazolylazo)-2-acetoxy-5-methylbenzen dimethylsulfátem, a indikační vrstvu z granulované celulózy s imobilizovaným enzymem. Podle zkušeností je tento prostředek vhodný k detekci inhibitorů cholinesteráz ve formě par, ale jeho použití k analýze ve vodě nebo roztocích je konstrukčně poněkud omezeno. Hlavní problém, tj. odběr vzorku a expozice indikační vrstvy, je pak odstraněn použitím trubičkového detektoru podle technického řešení. 30

Podstata technického řešení

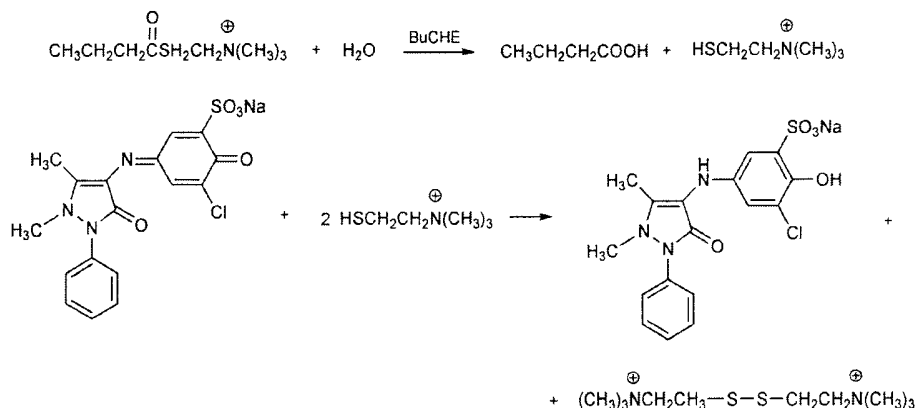
Podstatou technického řešení je trubičkový detektor inhibitorů cholinesteráz ve vodě a vodných roztocích, který obsahuje vrstvu drceného porcelánu impregnovaného 0,1 až 1,0 % hmotn. tetra- 35 boritanem sodným, indikační vrstvu z granulovaného kompozitního materiálu z mikrokryalické celulózy, laktózy a polyvinylpyrrolidonu s imobilizovanou butyrylcholinesterázou o specifické aktivitě 10 až 50 nkat (nmol.s^{-1}) na 1 g nosiče, vrstvu z drceného skla impregnovanou směsí butyrylthiocholinjodidu a chromogenního činidla N-(2,3-dimethyl-5-oxo-1-fenyl-3-pyrazolin-4-yl)-2-chlor-5-sulfo-4-iminobenzochinonu v hmotnostním poměru 10:1 až 20:1, a konečně ampulku 40 s tlumivým roztokem pH 6 až 10.

Jednotlivé prvky mají následující funkce:

Vrstva drceného porcelánu zajišťuje úpravu pH vzorku vody.

Vrstva z kompozitního nosiče s imobilizovaným enzymem slouží jako vrstva indikační, na níž probíhá jednak reakce enzymu s jejími inhibitory, jednak hydrolýza substrátu a reakce vzniklého 45 thiocholinu s chromogenním činidlem (obr. 1). Jako chromogenní činidlo byl navržen redoxní indikátor N-(2,3-dimethyl-5-oxo-1-fenyl-3-pyrazolin-4-yl)-2-chlor-5-sulfo-4-iminobenzochinon (chemický analog známého 2,6-dichlorfenolindofenolu), který poskytuje barevný přechod červená - bílá.

Vrstva z drceného skla umožňuje smytí nanesené směsi substrátu a chromogenního činidla na indikační vrstvu pomocí tlumivého roztoku, který je umístěn ve skleněné ampulce.



Obr. 1 Schéma hydrolyzy substrátu a redukce chromogenního činidla

5 Příklad uskutečnění technického řešení

Trubičkový detektor je tvořen skleněnou obalovou trubicí o vnitřním průměru 5 mm naplněnou ze spodu vrstvou drceného porcelánu, vrstvou kompozitního nosiče, vrstvou drceného skla a ampulkou. Jednotlivé vrstvy vysoké 10 mm jsou od sebe odděleny a proti pohybu a přesypávání zajištěny polyamidovými sítkami a polyethylenovými hvězdičkami, které propouštějí vzduch i kapalinu. Trubice dlouhá 100 mm je na obou koncích hermeticky uzavřena zatavením.

Drcený porcelán o velikosti zrn 0,5 až 0,7 mm je impregnovaný 0,5% roztokem tetraboritanu sodného (boraxu). Kompozitní nosič o velikosti pelet 0,8 až 1,0 mm, připravený z mikrokrystallické celulózy, laktózy a pylyvinylpyrrolidonu v hmotnostním poměru 48:48:4 postupem obvyklým pro přípravu lékových forem [Vetchý D., Lešinová H., Tušarová I.: Československá farmacie 61, 234-239 (2012)], je impregnovaný butyrylcholinesterázou o specifické aktivitě 30 nkat (nmol.s⁻¹) na 1 g nosiče. Na 100 g nosiče je použito 50 ml impregnačního činidla, který obsahuje enzym, 5 % dextranu a 0,5 % neionogenního tenzidu typu Slovasol ve vodě. Skleněná drť o velikosti zrn 0,7 až 0,9 mm je impregnovaná roztokem, který obsahuje 10% substrát butyrylthiocholinjodid a 0,5% indikátor N-(2,3-dimethyl-5-oxo-1-fenyl-3-pyrazolin-4-yl)-2-chlor-5-sulfo-4-iminobenzochinon v methanolu. Spotřeba na 100 g nosiče je 25 ml impregnačního roztoku.

Použití detektoru

Trubičkový detektor je na obou koncích otevřen a ponořen do analyzované vody tak, aby došlo k namočení vrstvy drceného porcelánu i kompozitního nosiče s imobilizovaným enzymem. Po 2 minutách inkubace je rozdrcena ampulka a její obsah setřesen přes vrstvu skleněné drti až na vrstvu nosiče s enzymem, jejíž zabarvení je sledováno vizuálně (volným okem) během následujících 6 minut. Důkazem nepřítomnosti inhibitorů cholinesteráz ve vzorku je odbarvení celé vrstvy, naopak přetrvávající červené zabarvení svědčí o tom, že vzorek je kontaminován. Detekční limit je závislý na konkrétním inhibitoru, například pro eserin činí 0,5 µg/ml a pro sarin 0,000 5 µg/ml.

Průmyslová využitelnost

Trubičkový detektor podle technického řešení může nalézt uplatnění v průmyslové výrobě prostředků chemického průzkumu a chemické kontroly, případně technických prostředků určených ke kontrole hygienických a ekologických limitů.

NÁROKY NA OCHRANU

- 5 **1.** Trubičkový detektor inhibitorů cholinesteráz ve vodě a vodných roztocích, **v y z n a ě u - j í c í s e t í m**, že obsahuje vrstvu drceného porcelánu impregnovaného 0,1 až 1,0% (hmotn.) tetraboritanem sodným, indikační vrstvu z granulovaného kompozitního materiálu z mikrokry-
talické celulózy, laktózy a polyvinylpyrrolidonu s imobilizovanou butyrylcholinesterázou o spe-
cifické aktivitě 10 až 50 nkat (nmol.s^{-1}) na 1 g nosiče, vrstvu z drceného skla impregnovanou
směsí butyrylthiocholinjodidu a chromogenního činidla N-(2,3-dimethyl-5-oxo-1-fenyl-3-pyra-
zolin-4-yl)-2-chlor-5-sulfo-4-iminobenzochinonu v hmotnostním poměru 10:1 až 20:1, a konečně
ampulku s tlumivým roztokem pH 6 až 10.

Konec dokumentu
