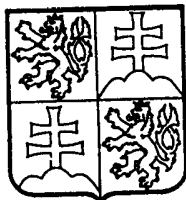


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU (12)

(22) 15.11.90

(32) 15.11.89

(31) 89/436823

(33) US

(40) 18.03.92

(21) 05664-90.R

(13) A3

5(51) G 01 N 33/493,
30/90

(71) APPENDITECH INC., Littleton, Colorado, US

(72) Bar-Or David, Denver, Colorado, US

(54) Zjišťování zápalu slepého střeva určením koncentrace kyseliny delta hydroxyhipurové v moči

(57) Zápal slepého střeva u lidí s podezřením na toto onemocnění se může zjišťovat stanovením prahové koncentrace kyseliny d-hydroxyhipurové 10 mg/l moče. Tato prahová koncentrace se může stanovovat kvalitativně, semikvantitativně nebo kvantitativně způsoby zahrnujícími HPLC, TLC, radioimuno zkoušku, kolorimetrické zkoušky, NMR, hmotovou spektroskopii, elektroforesu, zkoušky monoclonálních protilátek a enzymatické zkoušky.

PRIL. 1	URAD PRO VYNALEZY A OBJEVY	0 2 3 3 7 5	0 8 . V . 9 1
		0 8 . V . 9 1	0 8 . V . 9 1

Způsob zjišťování zápalu slepého střeva měřením koncentrace kyseliny σ -hydroxyhippurové v moči

Obřst techniky

Vynález se týká způsobu zjišťování zápalu slepého střeva u lidí. Především se vynález týká zjišťování zápalu slepého střeva na základě chemické analýzy moče lidí, u kterých je podezření na zápal slepého střeva.

Dosavadní stav techniky

Význam vynálezu dokládá skutečnost, že při diagnostice zápalu slepého střeva musí lékař často odlišovat toto onemocnění od jiných onemocnění břišní a pánevní oblasti, jako je abdominální aortické aneurysma, pánevní zánětlivé onemocnění, mimoděložní těhotenství, protržený nebo perforovaný viscus. gastrointestinální krvácení, hemorrhagická pancreatitis, perforované diverticulum, vaječníkový absces, Crohnova nemoc, mesenterická adenitická intestinální obstrukce, gastroenteritis, diverticulitis, vaječníková cysta a vaječníko vejcovodová patologie.

Takováto onemocnění často simulují zápal slepého střeva a lékař nemá často plně vyvinutý obraz, aby mohl spolehlivě zápal slepého střeva určit; potvrzení periumbilikální bolesti po dobu alespoň 72 hodin, migrace takové bolesti do pravého spodního kvadrantu nemocného při teplotě 37,5 až 38,5 °C, břišní citlivost, břišní tvrdost, soustředění bolesti do pravého spodního břišního kvadrantu, zjišťování tvrdosti při rektálním vyšetření. Zjištění shora uvedených diagnostických indikací naznačuje podezření, že u nemocného jde o zápal slepého střeva. Z mnoha hledisek jsou často užitečnější negativní zjištění napomáhající vyloučení onemocnění zápallem slepého střeva. Z nejběžnějších negativních indikací se uvádí symptomy přetrvávající déle než 72 hodin, lokalizace bolesti v jiné oblasti, než shora uvedeno, teplota pod 37,5 ° nebo nad 38,5

^oC a nepřítomnost nechutenství k jídlu.

Na neštěstí ani počet leukocytů ani rentgenické snímky nejsou citlivé nebo specifické pro zápal slepého střeva. Kromě toho dosud nebyly vyvinuty spolehlivé chemické zkoušky pro zjištění zápalu slepého střeva. Proto se diagnostika zápalu slepého střeva provádějí většinou jedině na základě shora uvedených klinických vyšetření. Proto velký počet nemocných se dostává na operační sál pro explorativní operace, přičemž střední počet mylných pozitivních vyšetření je 20 %. Tento poměrně vysoký počet chybných diagnos je přijatelný, jelikož je třeba okamžitých zásahů, aby se předešlo akutnímu onemocnění, řešenému odnětím slepého střeva pro předcházení jeho protržení, zánětu pobřišnice, dlouhodobému onemocnění a dokonce úmrtí.

Podstatou vynálezu je umožnit lékaři porovnat skutečnost určitých prahových koncentrací kyseliny σ -hydroxyhippurové s určitým chorobným stavem, zvláště se zápallem slepého střeva. Tento poznatek je důležitý, jelikož kyselina σ -hydroxyhippurová se v těle normálně vytváří v nižší koncentraci. K takovému vytváření dochází pravděpodobně hlavně konjugací orto-hydroxybenzoové kyseliny /kyseliny salicylové/ a glycinu. Enzymem, který tuto reakci katalyzáje, je glycin N-acylasa a z tohoto označení vyplývá, že jeho působení vede k vytváření četných různých glycinových konjugátů. Proto je kyselina σ -hydroxyhippurová normální složkou moče lidí, ale i různých živočichů, jako například koní a psů. Zjistila se také ve krevském mléku. Na základě těchto poznatků je pracovníkům v oboru jasné, že tato pozorování sama o sobě, neumožňují závěry o zdroji této sloučeniny v moči, například zda jde zcela o dietní záležitost nebo zda je kyselina σ -hydroxyhippurová zčásti nebo zcela endogenního původu. Například některé základní biochemické studie prokázaly, že se orto-hydroxybenzoová kyselina může vytvářet acetátmalonátovou cestou shikimové kyseliny. Je také doměnka, že sloučenina může být odvozena od tryptofanu.

Ve velké míře se studovalo vylučování kyseliny σ -hydroxyhippurové močí podáváním salicylátů a/nebo podáváním samotné

σ -hydroxyhippurové kyseliny. Je však mnohem omezenější soubor znalostí se zřetelem na fyziologické a patologické závěry nadměrného vytváření kyseliny σ -hydroxyhippurové ve srovnání s manifestací onemocnění nebo rozrušených metabolických procesů. Například je známo, že se kyselina σ -hydroxyhippurová jak odfiltrává tak vylučuje ledvinami, přičemž k sekreci dochází, alespoň v případě psů, za vysoké koncentrace krve. Zdá se také, že se akumuluje v kortexu řezů králičích ledvin. Zdá se, že tuto akumulaci snižuje hypoxia. Kyselina σ -hydroxyhippurová se mění, alespoň částečně, zpět na salicylát; v případě psů snižuje exkreci para-aminohippuratu.

Přítomnost nebo nepřítomnost kyseliny σ -hydroxyhippurové v lidské moči se začíná spojovat s určitými specifickými chorobnými stavy. Toto spojování je dobře shrnuto v literatuře /například obecně Clinical Pharmacology and Therapeutics 15, 2, str. 111 až 117, 1974/. Například se v takové literatuře uvádí, že horečnaté stavy obecně mají sklon snižovat vytváření kyseliny σ -hydroxyhippurové. Onemocnění jater však obecně nevyvolává žádné změny v exkreci kyseliny σ -hydroxyhippurové. Na druhé straně muskuloskeletální trauma a břišní operace vedou ke zvýšenému vylučování kyseliny σ -hydroxyhippurové. Zvyšování exkrece kyseliny σ -hydroxyhippurové se také zjišťuje u pacientů s anemií a s chronickým traumatickým muskuloskeletálním trauma. Zjistilo se také, že levodopa a methyl dopa zvyšují exkreci kyseliny σ -hydroxyhippurové. Uremičtí nemocní vykazují zvýšenou koncentraci v seru a v dialytické kapalině. Některá podrobnější a doložená pozorování v literatuře, zaměřené na poměr σ -hydroxyhippurová/onemocnění, jsou uvedena v následující literatuře:

Horečka: Zjistilo se, že vytváření kyseliny σ -hydroxyhippurové ze salicylové kyseliny je značně sníženo u osob s horečkou /Kapp. E.M., a Coburn, A.F.: Urinary metabolites of sodium salicylate, J. Biol. Chem., 145, str. 549 až 565, 1942/.

Trauma: Břišní operace vedou ke zvýšení vylučování kyseliny σ -hydroxyhippurové s močí a ke zvýšenému vylučování hippurové kyseliny /Szumiel I., Chmielewska, I. a Minicki, J:

N-substituted peptides in urine in the postoperative period, N-substituované peptidy v moči v pooperačním období, Bull. Acad. Pol. Sci. /Biol/ 13, str. 565 až 567, A965/. Zjistilo se také, že moč nemocných se závažným muskuloskeletálním trauma obsahuje zvýšená množství tohoto materiálu z endogenních zdrojů. Tento vzrůst je zvláště nápadný u jedinců se špatným hojením ran. V této souvislosti je zajímavé poznamenat, že se salicyláty obecně uvádějí do vztahu se zpomalováním hojení ran. Nejsou však žádné odpovídající údaje jakéhokoliv možného vlivu kyseliny hydroxyhippurové. Avšak existence velkého množství kyseliny σ -hydroxyhippurové naznačuje přítomnost jejího prekursoru, kyseliny salicylové. Také se zjistilo, že kyselina salicylurová v případě podání se částečně hydrolyzuje na salicylát.

Zjištění zvýšené endogenní produkce kyseliny σ -hydroxyhippurové u nemocných po trauma také naznačuje, že zvýšená aktivita tyrosin-dopa-katecholaminu se může měřit studováním exkrece močí této sloučeniny. Ve skutečnosti se zvýšená exkrece může vysvětlovat záhadným selháním pacienta se závažným chronickým trauma vylučovat zvýšené množství katecholaminů a derivátů VMA močí. Ve skutečnosti tato sloučenina může indikovat druhou alternativní cestu katecholaminového metabolismu /jiného než je indolová cesta/.

Anemia v důsledku trauma. Pacienti s chronickým traumatickým muskuloskeletálním zraněním mají agenerativní hemolytickou anemii, která dosud nebyla plně charakterizována. Kromě jiného je známo, že takoví nemocní ztrácejí nadměrné množství železa a mědi prostřednictvím moče, což je zajímavá skutečnost se zřetelem na jejich zvýšené vylučování kyseliny σ -hydroxyhippurové, což je látka známá k vytváření kovových chelátů. Je však známo, že takoví nemocní vylučují jiné chelátotvorné sloučeniny za vytváření kovových chelátů ve své moči.

Jaterní onemocnění. Snížené vytváření kyseliny hippurové a její snížená exkrece se pozoruje u nemocných s extenzivním parenchamatickým jaterním onemocněním, což přirozeně vede

ke studiu vytváření σ -hydroxyhippurové kyseliny a ke studiu její exkrece u těchto nemocných. Množství vylučování sloučeniny po podání aspirinu takovým nemocným je normální nebo nízké. V případě psů s portocaválními zásahy se vylučuje močí snížené množství salixylurové kyseliny.

Hypertense. Exkrece kyseliny σ -hydroxyhippurové je zpravidla normální u jedinců s hypertensí, u některých jedinců může však být mírně zvýšena nebo snížena.

L-dopa a methyl dopa. Dodání methyl dopa samičkám albinů krys způsobuje zvýšené vylučování kyseliny σ -hydroxyhippurové močí; však podání drogy v terapeutických dávkách ženám a mužům nemá tento vliv. Připomíná se také, že podle jiných studijních prací vzorků moče nemocných jedinců, kterým bylo podáno L-dopa pro parkinsonismus, se ve většině případů zjistil obsah většího množství sloučenin s chromatografickými a fluorescenčními vlastnostmi kyseliny σ -hydroxyhippurové a příbuzných sloučenin /Alrschule, M.D., a Hegedus, Z.L. - hydroxyhippurová /alicylurová/kyselina, její klinický a fyziologický význam, Clinical Pharmacology and Therapeutics, 15, 2, str. 111 až 117, 1974/.

Downův syndrom. Děti s Downovým syndromem mají abnormálně salicylátový metabolismus. Po podání aspirinu se ho váže nadměrné množství v buňkách červených krvinek a mnohem nižší koncentrace v plasmě. Po podání aspirinu je vylučování σ -hydroxyhippurové kyseliny abnormálně nízké močí.

Uremie. U nemocných ledvinovou nedostatečností se zjistilo zvýšené množství kyseliny hippurové v tělesných kapalinách. Zvýšené množství se také našlo v jejich seru a také v jejich dialyzované kapalině. Je domněnka, že tato zvýšené koncentrace je zodpovědná za některé projevy uremie. Jak je tento závěr oprávněný, zůstává k prozkoumání. Avšak odstranění závažného množství sloučeniny dialyzou vede k vysvětlení záhadných ztrát železa při dialyze, jelikož sloučenina železo váže.

Pheochromocytoma. Je známo, že nemocní pheochromocytoma, vylučují velká množství katecholaminů avšak jen normální množství kyseliny σ -hydroxyhippurové.

Je nutno poznamenat, že se v literatuře ještě neobjevilo, ani se nenavrhovalo využít přítomnosti kyseliny σ -hydroxyhippurové pro diagnostiku zápalu slepého střeva. Jak již bylo uvedeno zjišťování zápalu slepého střeva se provádí toliko na základě klinického vyšetření, přičemž je z literatury známa, že dochází k častým klamným pozitivním výsledkům. Samotné klinické zkoušky nejsou tedy spolehlivé. Byla by tedy velmi žádoucí chemická zkouška, která by byla jak vysoce citlivá tak vysoce selektivní a tak mimořádně vhodná pro diagnostikování zápalu slepého střeva.

Podstata vynálezu

Podstata způsobu zjišťování zápalu slepého střeva spočívá podle vynálezu v tom, že se od jedince s podezřením na zápal slepého střeva odebere vzorek moči a zjišťuje se v něm koncentrace kyseliny σ -hydroxyhippurové, přičemž obsah alespoň přibližně 10 mg/l indikuje zápal slepého střeva u vyšetřované osoby.

Způsob podle vynálezu je tedy založen na kvalitativním a kvantitativním stanovení určitého prahového množství kyseliny σ -hydroxyhippurové v moči a/nebo v krvi jedinců s podezřením na zápal slepého střeva. Například prahová koncentrace kyseliny σ -hydroxyhippurové /označované běžně také jako kyseliny orto-hydroxyhippurová kyselina/ v moči jedinců trpících zápallem slepého střeva je alespoň přibližně 10 mg/l. Taková koncentrace se může zjišťovat různými kvantitativními, polokvantitativními nebo kvalitativními chemickými způsoby. Obzvláště výhodnými způsoby pro provádění takového zjišťování podle vynálezu jsou chromatografie v tenké vrstvě /"TLC"/ a vysokotlaká kapalinová chromatografie /"HPLC"/. Podle zvlášť výhodného provedení vynálezu se za prahovou koncentraci může považovat koncentrace, která poskytuje ur-

čité, dále popsané, empirické indikace tekových koncentrací, když se moč podrobuje určitým procedurám chromatografie v tenké vrstvě. Nejužitečnější z těchto indikací empirických je objevení modré fluorescenční skvrny /při vizuálním pozorování/ pod zdrojem ultrafialového světla při 250 až 360 nm a/nebo produkce vizuálně pozorovatelné zbarvené skvrny, když kyselina σ -hydroxyhippurová reaguje s různými ionty vytvářejícími barevnou reakci, jako jsou ionty Fe^{+++} a Cu^{++} . Tato koncentrace kyseliny σ -hydroxyhippurové 10 mg/l je klinicky pro zápal slepého střeva přezkoušena a osvědčila se.

Pro zjišťování kyseliny σ -hydroxyhippurové v lidské moči byly vyvinuty ještě další empirické chemické zkoušky pro zjištění její přítomnosti i její koncentrace, přičemž se takové zkoušky mohou provádět také pro zjištění její přítomnosti v lidské krvi, přičemž tyto zkoušky bude dále ještě podrobně popsány. Nejvýhodnější a nejspecifičtější z těchto empirických zmožek moče pacientů je především extrakce kyseliny σ -hydroxyhippurové a pak její chromatografie v tenké vrstvě /"TLC"/. Nakonec se může použít vizuálního hodnocení. Vizuální hodnocení se s výhodou provádí za použití ultrafialového světla nebo se provádí barevná reakce ke zjištění, zdali je barevná skvrna se svým retenčním faktorem /rf/ srovnatelná nebo je nesrovnatelná se známou čistou standardní

σ -hydroxyhippurovou kyselinou. Přítomnost takové skvrny je zvláště užitečným indikátorem přítomnosti kyseliny σ -hydroxyhippurové v koncentraci alespoň 10 g/l, což je indikativní na zápal slepého střeva u jedince s podezřením na toto onemocnění.

Výsledky rychlejší avšak méně specifické indikační barevné reakční zkoušky, která bude dále popsána, se mohou použít k doložení vztahu k zápalu slepého střeva. Při výhodném provedení způsobu má tato barevná reakční zkouška povahu předběžné zkoušky, načež se provádí exatnější forma zkoušky /připomíná se, že nepřítomnost barevné reakce je rovněž jako taková, velmi užitečným negativním indikátorem zápalu slepého střeva/.

Na základě přítomnosti kyseliny σ -hydroxyhippurové ve shora uvedeném množství nebo ve vyšším množství než 10 mg/l /které je považováno na prahovou koncentraci/ jakožto indikaci zápalu slepého střeva jsou založeny jak kvalitativní tak kvantitativní identifikační způsoby. Jakožto další takové indikační postupy se uvádějí:

vysokotlaká kapalinová chromatografie	/"HPLC"/
hmotová spektrometrie	/"MS"/
vysoce rozlišovací hmotová spektrometrie	/"HRMS"/
plynová chromatografická hmotová spektrometrie	/"GCMS"/
nukleární magnetická rezonanční spektrometrie	/"NMR"/
ultrafialová absorpční světelná spektroskopie	/"UV"/
fluorecenční spektroskopie	
infračervená spektroskopie	/"IR"/
spektrofotometrická kolorimetrie	
porovnání s barevným standardem	
monoclonální zkoušky protilátek	
radioimuno zkoušky	
enzymatické zkoušky	
elektroforeza.	

Vynález blíže objasňuje následující podrobný popis s připojenými obrázky: na obr. 1 jsou stupně a zařízení pro provádění procedury A, sestávající ze dvou stupňů; na obr. 2 jsou stupně a zařízení pro provádění procedury A, sestávající ze dvou stupňů /A a B/.

Způsob podle vynálezu se může provádět různými výhodnými postupy. Některá výhodná provedení zahrnují chemické zkoušky, jiná jsou spíše aparaturní /například zkušební zařízení/ dobře vhodná pro provádění určitých výhodných chemických postupů.

Příklady provedení vynálezu

Výhodný způsob stanovení kyseliny σ -hydroxyhippurové přímo v moči za použití oxidu křemičitého s ionicky vázaným trojmocným železem

Byl vyvinut obzvláště účinný způsob zlepšení reakce

barevné s trojmocným železitým iontem za využití kyselé povahy povrchu silikagelu. Citlivost a selektivita a intenzita této barevné reakce se může do určité míry řídit hodnotou pH, rozpouštědlovým prostředím a koncentrací železitého iontu v roztoku. Nakonec se využívá fixace železitého iontu na povrch oxidu křemičitého a oxidu křemičitého k dodání kyselosti vzorku moče. Výsledného materiálu se může použít jakožto volně tekoucího prášku nebo jakožto povlaku na pevné podložce a může se ho používat ve formě zkušebních pásků nebo papírků. Jakožto jiné nosičové materiály se uvádějí vedle oxidu křemičitého Celit^R, hlinka, oxid hlinitý a/nebo žáruvzdorná cihla.

Výhodný způsob pro přípravu oxidu křemičitého vázajícího železité ionty

Rozpustí se 40 g hexahydrátu dusičnanu železitého ve 40 ml 25% chlorovodíkové kyseliny a prozvučuje se po dobu 15 minut. Pak se do roztoku dusičnanu železitého pomalu vmíchá 100 g oxidu křemičitého až do získání volně tekoucího prášku. Zpracování povrchu oxidu křemičitého chlorovodíkovou kyselinou před přidáním do roztoku dusičnanu železitého aktivuje povrch hydrosolu k ionickému vázání železitých skupin.

Výhodný způsob detekce kyseliny σ -hydroxyhippurové přímo v moči

Pro účely této zkoušky se moč pacienta s podezřením na zápal slepého střeva používá přímo, to znamená, že se kyselina σ -hydroxyhippurová před zkouškou z moče neextrahuje.

Reakční činidlo - 100 mg oxidu křemičitého s vázanými železitými ionty v 1 ml fiole

způsob detekce - pozorování barvy

Postup

Vnese se přibližně 200 mikrolitrů moče do 1 ml množství oxidu křemičitého s vázanými železitými ionty ve fiole. Fiole se protřepe a nechá se usadit po dobu dvou minut.

Výsledky

Barevná změna horní vrstvy kapaliny z normální moče ze světle žluté na růžovou, červenou nebo fialovou indikuje vysokou koncentraci fenolů a zvláště kyseliny σ -hydroxy-

hippurové, což je jako takové indikativní pro zápal slepého střeva. Mnohem důležitější v případě této nespecifické zkoušky je, když nedojde k žádné barevné změně, což vylučuje zápal slepého střeva. Této barevné změny se nejlépe využívá při porovnání výsledku buď s barevnou srovnávací destičkou nebo s pozitivními nebo negativními značkovači.

Pracovníku v oboru je jasné, že je možno použít mnoha dalších způsobů k detekci minimální přítomnosti a popřípadě ke mnoho přesnějšimu stanovení koncentrace kyseliny σ -hydroxyhippurové v moči. Tak se může použít vysokotlaké kapalinové chromatografie /"HPLC"/, chromatografie v tenké vrstvě /"TLC"/, plynové chromatografie /"GC"/ a jiných chromatografických technik, jakož také ultrafialové /"UV"/, infračervené /"IR"/ a viditelné spektroskopie, nukleární magnetické resonance /"NMR"/, hmototvé spektrometrie /GC/hmotové spektrometrie, specifických impregnovaných zkušebních papírků, reakcí barevných změn, monoclonálních protilátek, radioimunoassayů, enzymů, elektroforesy a/nebo kombinace těchto postupů pro detekci minimální koncentrace kyseliny σ -hydroxyhippurové /například 10 mg/l nebo více mg/l/, která je ve vztahu k zápalu slepého střeva. Ze shora uvedených způsobů jsou kapalinové chromatografické způsoby /například HPLC a TLC/ nejvhodnějšími pro přesné stanovení a selektivní měření koncentrací kyseliny σ -hydroxyhippurové, což je důležité pro posouzení stavu nemocného; je však také nutno připomenout, že světelná spektrofotometrie a způsoby, založené na barevné změně, dávají rychlejší avšak méně selektivní výsledky.

Jemnější podrobnosti těchto a dalších výhodných specifických způsobů, kterými se může kyselina σ -hydroxyhippurová, jakožto složka vzorku moče, identifikovat a kvantitativně stanovit, spolu s některými reprezentativními příklady provedení těchto technik se zřetelem na některé z těchto analytických používaných způsobů, vynález ještě blíže objasní.

Extrakce pevné fáze

Jelikož je kyselina σ -hydroxyhippurová jakožto složka

vzorku moče v roztoku s komplexní matricí bílkovin, solí a jiných sloučenin normálně obsažených v moči, je žádoucí chemicky tuto sloučeninu extrahovat za minimálního množství znečišťujících látek. Jakkoliv dávají vynikající výsledky běžné způsoby rozpouštědlové extrakce za použití chemických systémů, jako je diethyl ether a butanol za nastavení hodnoty pH, je použití zjednodušené extrakce do pevné fáze rychlejší a čistší. Jakožto dva příklady takových chemických extrakcí se uvádějí použití C18 oxidu křemičitého, přičemž podle příkladu /A/ se používá kyseliny σ -hydroxyhippurové ve vodném prostředí a podle příkladu /B/ se používá nosičů kyseliny σ -hydroxyhippurové v methanolovém prostředí. Určitého extrakčního způsobu se může používat v závislosti na žádaném nosičovém prostředí potřebném pro další analytický stupeň. Zkoušejí se i jiné vázající fáze, jako jsou kratší alkylové postranní řetězce jakožto fáze využívající ionexové schopnosti jako NH_2 , CN a jiných skupin s obecně stejným úspěchem za použití mírně odlišných elučních rozpouštědel, známých ze stavu techniky.

Příklad A

Extrakce moči do vodného rozpouštědla

Jakožto slabé kyseliny vytvářejí fenoly soli se sodíkem a s jinými alkalickými kovy velmi snadno při hodnotě pH 2 nebo 3 jednotek nad jejich pKa. Tyto soli jsou ve vodě velmi dobře rozpustné, takže se ve skutečnosti nezadržují ve sloupci vyplněném C18 oxidem křemičítým. Proto se ionizace potlačuje pufováním moči na alespoň 2 až 3 pH jednotky pod jejich pKa. Sloučenina se pak zachycuje ve sloupci.

Pro objasnění tohoto jevu se provádějí následující extrakce:

- 1/ Použije se C18 oxidu křemičitého v extrakční trubce obsahující 100 mg materiálu.
- 2/ Slouec se promyje 1 ml methanolu a pak 1 ml vody.
- 3/ Okyselí se 1 ml vzorek moče buď 100 μl koncentrované

kyseliny chlorovodíkové nebo 100 mg kyseliny citronové nebo přidáním ionexové pryskyřice a nechá se stát po dobu přibližně dvou minut. Okyselená moč se pak vede předem kondicionovanou extrakční trubicí obsahující 1 ml C18.

4/ Trubka se pak promyje 1 ml vody a promývací kapalina se vyhodí.

5/ Materiál se pak eluuje 1 ml octanu sodného jakožto pufru o koncentraci 0,05M, hodnota pH 6,0 /může se použít jakéhokoliv jiného pufru o hodnotě pH nad 5,5/.

Eluční kapalina je pro oči bezbarvá a žlutý a hnědý pigment moči zůstal ve sloupci, takže neznečistil eluant.

Při zkoušce na získání a koncentraci jsou dostatečné a typické příkladné hodnoty, jak dole uvedeno. Salicylová kyselina vykazuje také velmi podobné hodnoty, což lze jen očekávat pro podobnou strukturu.

Získání kyseliny σ -hydroxyhippurové je následující:

Eluční objem	% získání	Celkové získané procento
1 ml	47,0 %	47,0 %
2 ml	24,6 %	71,6 %
3 ml	10,7 %	82,3 %
4 ml	6,5 %	88,8 %

Poznámka: Použití různých pufrů pH nebo koncentrace se zdá, že má malý vliv na získání. Studium kyseliny salicylové poskytuje podobné výsledky.

Příklad B

Extrakce moči do methanolu

Za použití nepolární extrakce a při úvaze, že jsou fenoly slabými kyselinami se ionizace potlačuje pufováním moči na alespoň 2 až 3 jednotky pod její hodnotou pK_a . Sloučenina se pak získá kolonou plněnou oxidem křemičitým C18.

Provede se následující extrakce:

1/ Použije se extrakční trubky s oxidem křemičitým C18 obsahující 100 mg tohoto materiálu.

- 2/ Sloupec se promyje 1 ml methanolu a pak 1 ml vody.
- 3/ Okyselí se 1 ml vzorku moče buď koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou v množství 100 μ l nebo 100 mg kyseliny citronové nebo přidáním ionexové pryskyřice, načež se nechá stát po dobu dvou minut. Okyselená moč se pak vede předem kondicionovanou extrakční trubicou s 1 ml C18.
- 4/ Trubka se pak promyje 1 ml vody a promývací kapalina se vyhodí.
- 5/ Materiál se eluuje 1 ml methanolu.

Barva eluované kapaliny je od bezbarvé po žlutou až hnědou. V průběhu procesu se něco močového pigmentu ze sloupce odstraní. Při zkoušce na kyselinu σ -hydroxyhippurovou je celkové získané procento 95 až 100 %. I v tomto případě kyselina salicyklová vykazuje velmi podobné hodnoty, což bylo lze očekávat na základě podobné struktury.

Chromatografie v tenké vrstvě

Chromatografie v tenké vrstvě je pravděpodobně nejnadhším kvalitativním způsobem identifikace prahových koncentrací kyseliny σ -hydroxyhippurové v moči pacientů s podezřením na zápal slepého střeva. Tenká vrstva oxidu křemičitého buď na skle, kovu nebo plastické hmotě, s výhodou bez jakéhokoliv indikátoru fluorescence se normálně používá ačkoliv papír a papír napuštěný oxidem křemičitým dávají podobné výsledky. Připomíná se, že se používá čerstvých vzorků moče a s výhodou před zmrazením. Místo vzorků moče nebo vedle nich se také může používat vzorků krve.

Způsob

Na povrch desky se nanese skvrna 1 až 5 mikrolitrů methanolového extraktu vzorků moče, získaného použitím extrakčního způsobu /E/, shora popsaného. Deska se pak vyvíjí za použití vzestupné techniky s elučním rozpouštědlem jakožto mobilní fází obsahujícím jeden díl ledové kyseliny octové a 99 dílů ethylacetátu.

Detekce se provádí jedním ze dvou způsobů:

- a/ použije se ultrafialového světla 250 až 350 nm, čímž se vytvoří modrá fluorescenční skvrna nebo
- b/ deska se postříká nebo ponoří do roztoku dusičnanu železitého v methanolu k vývoji červené skvrny.

Výsledky

Výsledky chromatografie v tenké vrstvě za těchto podmínek odhalují skvrnu s retenčním faktorem R_f přibližně 0,4 pro kyselinu σ -hydroxyhippurovou a 0,6 pro kyselinu salicylovou. Vždy se provádí zkouška s destičkou se standardem čisté kyseliny σ -hydroxyhippurové pro posouzení jakékoliv menší změny v mobilní fázi nebo ve složení oxidu křemičitého. Tento zvláštní rozpouštědlový systém odděluje kyselinu hippurovou, kyselinu σ -hydroxyhippurovou s kyselinu salicylovou. Jiných systémů se používá pro oddělení jiných možných nečistot.

Analyza vysokotlakou kapalinovou chromatografií

Vysokotlaká kapalinová chromatografická analýza je vysoce výhodná kvantitativní chromatografická metoda pro stanovení prahové a vyšší koncentrace kyseliny σ -hydroxyhippurové v moči nemocných s podezřením na zápal slepého střeva.

Vzorky moči, s výhodou čerstvé a nezmražené jsou zpravidla vhodné pro toto stanovení i když se také podobně může používat vzorků krve. Jelikož je tento způsob kvantitativní a někteří nemocní vykazují koncentraci nad 2 g/l, může teplota skladování moče pod 4 °C způsobit u vzorků s tak vysokou koncentrací kyseliny σ -hydroxyhippurové, že dojde k vysrážení z roztoku a tak k nižším hodnotám při stanovení.

Pracovník v oboru rovněž posoudí vhodnost použití různých způsobů stanovení, aby se v daném případě vždy dosáhlo co největší citlivosti a selektivity. Pro další vyšetření nemocného je možné monitorování se zřetelem na specifickou délku vln, fluorescenci, elektrochemické a hmotové stanovení.

Způsob

Používá se 5 až 25 mikrolitrů extraktů vzorků moče,

získaných shora popsanými způsoby, a tyto vzorky se zavádějí do systému vysokotlaké kapalinové chromatografie HPLC za následujících podmínek:

rozpouštědlo 50 % methanolu a 50 % fosfátového pufru
0,01M o pH 2,3
rychlost toku 1 ml/min
sloupec C18 Apex oktadecyl
rozměr 5, μ m 15 cm x 4,5 mm, vnitřní průměr
teplota 20 °C
detektor UV při 236 a/nebo 300 nm

Výsledky analýzy HPLC se kvantifikují za použití mnoha-bodové kalibrace a získá se dobrý lineární souhlas v oboru koncentrací 1 až 2000 mg/l. Za těchto podmínek se objeví pík s dobou retence 3,0 minut s absorbančním spektrem odpovídajícím kyseliny σ -hydroxyhippurové. Podobné separace se dosáhne mezi všemi interferujícími sloučeninami, jako je například kyselina hippurová, kyselina salicylová a různé jiné fenolic-ké sloučeniny. Toho je zapotřebí ke snížení mylných hodnot v důsledku podání salicylátu. Všechny identifikace sloučenin a retenční doby se hodnotí za použití čistých známých standardů. Dále je uveden příklad získaných hodnot z HPLC stanovení pro typický vzorek pacientů:

Ref	Kyselina σ -hydroxyhippurová mg/l	Kyselina salicylová mg/l	Výsledek chirurgie
138	743	16	+
151	1393	0	+
143	1609	43	+
152	159	0	+
187	524	45	+
196	255	52	+
136	92	0	+
139	642	460	+
197	56	<10	+
148	331	0	+
145	0	0	-
140	0	0	-

Ref	Kyselina σ -hydroxyhippurová mg/l	Kyselina salicylová mg/l	Výsledek chirurgie
194	645	0	+
142	0	0	-
199	0	0	-
147	0	0	-
136/2	20	43	+
149	0	0	-

Tyto výsledky jasně dokládají vztah prahové koncentrace kyseliny σ -hydroxyhippurové k zápalu slepého střeva, který je doložen chirurgicky.

Reakce k získání barevného derivátu

Se zřetelem na fenolické charakteristiky kyseliny σ -hydroxyhippurové byl vyvinut způsob k vyvolání reakce s barevnou změnou ke zviditelnění extrahované kyseliny σ -hydroxyhippurové. Úvahy jsou založeny na skutečnosti, že Fe^{3+++} a Cu^{++} a jiné kovové soli se již dlouho používají pro detekci biologických sloučenin, zvláště fenolů a enolů /a také několika aminů/ na základě vytváření komplexních železitých fenoxidů. Komplex se vytvoří pomocí elektronů, které jsou schopny delokalizace na aromatických jádrech. Produkovaná barevná změna od zelené k purpurové závisí na typu fenolu. Tento typ reakce, jakkoliv je citlivá, není specifický pro určitou fenolovou skupinu, takže se stanoví všechny potenciálně reaktivní materiály /nikoliv tedy jeden určitý specifický materiál/. Příkladně se uvádí:

Metabolit	Zjištěný stav
fenylpyruvát	fenylketonuria
p-hydroxyfenylpyruvát	tyrosinemia
imidazolpyruvát	histidinemia
rozvětvené ketokyseliny	javorový sirup v chorobné moči
5-hydroxyindolactová kyselina	karcinoid
salicyláty	toxicita
fenothiaziny	toxicita

Pro pochopení tohoto mechanismu se uvádějí následující spektrofotometrické a barevné srovnávací způsoby:

Barevná reakce přímo s močí

Pro účely této zkoušky se používá přímo močí jedince s podezřením na zápal slepého střeva, přičemž se tato moč před zkouškou nepodrobuje extrakci.

Reakční činidlo: 3M roztok hydratovaného dusičnanu železitého v 3M chlorovodíkové kyselině a vodě

detekce: UV-VIS spektrofotometr Hitachi U2000 a pozorování barvy

Způsob

Do 1 ml moče se vnese 0,1 ml reakčního činidla a vizuálně se pozoruje barevná změna. Pro hodnocení měření absorbance se volí 400 až 900 nm a vypočte se následující polokvantitativní hodnocení po posouzení normální moče. Pokud je odečtená absorbance větší než 2,0, pak se vzorek moče zředí 1 díl moče na 10 dílů vody a pro výpočet se použije odpovídajícího faktoru. Konstruuje se kalibrační křivka přidáním známého množství kyseliny σ -hydroxyhippurové do normální moče, která je lineární až do 300 mg/l. Do téhož standardu se přidá množství reakčního činidla pro vytvoření standardní řady pro barevné porovnávání. Výsledky takových zkoušek se fotografují a používá se jich pro barevné srovnávání zkoušených vzorků pro stanovení prahové koncentrace kyseliny σ -hydroxyhippurové.

Výsledky

Jelikož nejde o specifický způsob, zaznamenávají se velké rozdíly v případě HPLC stanovení a rozdíly výpočtu vyšetřované moče. Hodnoty při tomto způsobu jsou mnohem vyšší, jelikož se na celkovém výsledku podílejí všechny reaktivní materiály. Zjišťuje se dobrý vztah mezi hodnocenou močí /větší než 500 mg/l/ a odpovídajícím vzrůstem absorpce.

Ref	Poměr ředění	Abs. 620 nm	Konc. mg/l	barevná změna	Výsledek chirurgie
OHHA	1:1	0,620	316	ano	
NORM	1:1	9,238	0	ne	
138	10:1	0,295	1371	ano	+
151	10:1	0,750	3671	ano	+
143	10:1	0,667	3303	ano	+
152	1:1	0,553	159	eno	+
187	10:1	0,272	1255	ano	+
196	1:1	1,281	527	ano	+
136	1:1	0,456	110	ano	+
139	10:1	0,597	2898	ano	+
197	1:1	0,815	292	ano	+
148	1:1	0,714	241	ano	+
145	1:1	0,162	0	ne	-
140	1:1	1,047	409	ano	-
194	1:1	0,648	207	ano	+
142	1:1	0,346	32	ne	-
199	1:1	0,756	262	ano	-
147	1:1	0,211	0	ne	-
136/2	1:1	0,474	119	ano	+

Jakkoliv je měření absorpce při specifické vlnové délce přesným měřením, komplexní povaha vytváření barvy v případě mnoha různých složek, obsažených v moči, vede k nepřesnostem. Pozorování barevné změny a následné porovnání se standardy nebo s barevnou tabulkou poskytuje lepší vztah k přítomnosti vysokých koncentrací kyseliny σ -hydroxyhippurové. Například barevná změna od normální světle žluté moče k různě, červené nebo fialové barvě indikuje vysokou koncentraci fenolických sloučenin, což může být indikativní pro zápal slepého střeva. Mnohem důležitější při této nespecifické metodě je skutečnost, že žádná barevná změna vylučuje zápal slepého střeva.

Barevná reakce v případě extrahované moče

Pro účely této zkoušky se moč jedinců s podezřením na zápal slepého střeva extrahuje způsobem podle odstavce /B/. Pro

tuto zkoušku se používá 1 ml vzorku methanolového extraktu.

Reakční činidlo 2% roztok hydratovaného dusičnanu železitého v methanolu

Detekce UV-VIS spektrofotometr Hitachi U2000 a fotometr k pozorování barvy

Způsob

Do 1 ml methanolového extraktu moče se vnese 0,1 ml reakčního činidla a vizuálně se pozoruje barevná změna. Pro hodnocení měření absorbance se volí 400 až 900 nm a vypočte se následující polokvantitativní posouzení po posouzení normální moče. Pokud je odečtení absorbance větší než 2,0, pak se vzorek moče zředí na 1 díl moče na 10 dílů methanolu a pro výpočet se použije odpovídajícího faktoru. Konstruuje se kalibrační křivka zředěním známého standardu kyseliny σ -hydroxyhippurové, která je lineární až do 600 mg/l. Do téhož standardu se přidá množství reakčního činidla pro vytvoření standardní řady pro barevné porovnávání. Výsledky takových zkoušek se fotografují, a používá se jich jakožto příslušné části barevné tabulky.

Výsledky

Podobně jako v případě předchozího způsobu jde o nespecifický způsob a zaznamenává se řada rozdílů od stanovení způsobem HPLC a od přímých výpočtů moče. Hodnoty jsou obecně větší než při způsobu HPLC avšak menší než za použití přímo moče. Je to proto, že na výsledku stanovení se podílejí všechny složky moče. Ve srovnání se stanovením za přímého použití moče jsou výsledky mnohem nižší v důsledku semiselektivní extrakce. Je dobrý vztah s vysoce koncentrovanou močí /větší než 150 mg/l/ a odpovídajícím vzrůstem absorbance.

Ref	Abs. 600 nm	Konc. mg/l	Výsledek chirurgie
STD	0,354	272	n/a
138	0,875	672	+
151	1,712	1315	+
143	1,799	1383	+
152	0,212	163	+
187	0,655	503	+

Ref	Abs. 600 nm	Konc. mg/l	Výsledek chirurgie
196	0,429	330	+
136	0,153	117	+
139	1,208	926	+
197	0,203	156	+
148	0,112	86	+
145	0,066	51	-
140	0,141	108	-
194	0,325	150	+
142	0,054	42	-
199	0,163	125	-
147	0,032	15	-
136/2	0,193	148	+

Odkoliv je měření absorpce při specifické vlnové délce přesným měřením, komplexní povaha vytváření barvy v případě mnoha různých složek, obsažených v moči, vede k nepřesnostem. Pozorování barevné změny a následující porovnání se standardy nebo s barevnou tabulkou poskytuje lepší vztah v případě vysokých koncentrací kyseliny σ -hydroxyhippurové. Například barevná změna od normální světla žluté moče k růžové, červené nebo fialové barvě indikuje vysokou koncentraci fenolových sloučenin, což může být indikativní pro zápal slepého střeva. Mnohem důležitější při této nespecifické metodě je skutečnost, že žádná barevná změna vylučuje zápal slepého střeva.

Stanovení struktury a izolace kyseliny σ -hydroxyhippurové z moče

Pozorování modré fluorescenční skvrny při posuzování vzorků moče jedinců s podezřením na zápal slepého střeva je uvedeno u chromatografie v tenké vrstvě. Izolace a identifikace sloučeniny je možná následujícím způsobem; provádí se takto:

Způsob

Vzorky moče, používané pro izolaci různých složek, se kombinují od jedinců, u kterých byl potvrzen zápal slepého střeva a pak se zpracovávají následujícím způsobem:

- 1/ Použije se extrakční trubky s oxidem křemičitým C18 obsahující 5 g tohoto materiálu.
- 2/ Sloupec se promyje 5 ml methanolu a pak 5 ml vody.
- 3/ Moč se vede trubicou s C18.
- 4/ Trubka se pak promyje 5 ml vody a promývací kapalina se vyhodí.
- 5/ Materiál se eluuje 5 ml methanolu.

Barva eluované kapaliny je žlutá až hnědá. V průběhu procesu se některé pigmenty z moče odstraní. Methanol, jakožto rozpouštědlo, se odstraní za sníženého tlaku a surový zbytek se rozpustí v malém množství methanolu a následně se analyzuje způsobem TLC a HPLC. Další izolace modrého fluorescenčního pásu se provádí nejprve chromatografií /"flash chromatography"/ a pak preparativní chromatografií v tenké vrstvě.

Chromatografie /"flash chromatography/"

Do skleněné trubky se vnese oxid křemičitý /"flash silica"/ 20 - 40u a kondicionuje se chloroformem a veškerý surový extrakt se vnese na vrstvu. Sloupcem se vede systém chloroform/methanol /9 : 1/ za použití 200 ml rozpouštědla k extrakci veškerého modře fluoreskujícího materiálu. Extrakční proces se monitoruje chromatografií v tenké vrstvě a UV.

Preparativní chromatografie v tenké vrstvě

Jak TLC tak HPLC analýza dokládá že frakce chromatografie /"flash chromatography"/ nejsou čisté, což však bylo možno předpovídat. Z těchto extraktů je však odstraněna většina polárních složek. Dalšího čištění se dosáhne spojením frakcí, obsahujících modře fluoreskující sloučeniny a jejich nanesení na preparativní destičky s oxidem křemičitým pro chromatografii v tenké vrstvě / v počtu 6/. Pro vyvíjení destiček se používá rozpouštědlového systému, který obsahuje 80 % ethylacetátu, 20 % methanolu a 3 % kyseliny octové.

Z destičky se seškrábnou modré složky a materiál se re-extrahuje do methanolu. Filtrací a následným odstraněním roz-

pouštědla se získá surový zbytek, ze kterého se mohou vysrážet bílé krystaly přidáním několika kapek methanolu.

Identifikace fenolické sloučeniny hmotovou spektrometrií

Předpokládá se přítomnost sloučeniny fenolického typu a provede se počáteční vyšetření GC hmotovým spektrometrem. Toto vyšetření dokládá možnou přítomnost alespoň tří sloučenin hlavně kyseliny hippurové, kyseliny σ -hydroxyhippurové a kyseliny salicylové. Další vzorek spektra po elektronovém bombardování /EI/ při teplotě 200 °C naznačuje, že 1/ je obsaženo více než jedna složka a 2/ jedna ze složek má molekulovou hmotnost 195. Hlavní fragmentační vzorek ve velké míře koresponduje s hydroxybenzoylglycinem /kyselina σ -hydroxyhippurová/. Následující fragmentační vzorek vykazuje fragmenty 195 - 177 - 149 - 135 - 121 - 93a nebo 96b.

Podíly /a/ a /b/ ochotně ztrácejí NHCH_2 /za vzniku methylaminu/ nebo NH_3 avšak většina fragmentace mateřské molekuly se láme ve slabé vazbě CO-NH.

Zkoušky EI také potvrzují přítomnosti intenzivního 105 molekulárního iontu, který koresponduje s benzoylovým podílem.

Identifikace sloučeniny ultrafialovou spektrometrií

Čištěný materiál vykazuje UV absorpční maxima při 302 a 236 nm. To souhlasí s čistým standardem kyseliny σ -hydroxyhippurové.

Identifikace fenolické složky N-M.R. spektrometrií

360 MHz NMR spektra čištěné frakce zpočátku vykazují směs hippurové kyseliny a kyseliny σ -hydroxyhippurové v poměru 3 : 6. Po dalším čištění je možné izolovat čistou frakci, která má identické spektrum jako čistá kyselina σ -hydroxyhippurová.

Další identifikace HPLC

K potvrzení správnosti izolované sloučeniny se provede další esterifikace produktu. Malý podíl kyseliny hippurové,

kyseliny σ -hydroxyhippurové a kyseliny p-hydroxyfenyloctové se převede vždy na jejich estery zahříváním pod zpětným chladičem v methanolovém roztoku, obsahujícím bortrifluorid. Pak se estery izolují. Identifikuje se HPLC stopa těchto esterů, která je stejná jako je podobná stopa čistých obchodních standardů tří shora uvedených sloučenin.

Klinické posouzení

Provede se 100 a 51 postupných stanovení kyseliny σ -hydroxyhippurové ve vzorcích moče pacientů /většinou jde o pacienty Swedish Medical Center, Englewood, Colorado nebo Lutheran Medical Center, Arvada, Colorado/, kde se analýza moče provádí jako součást klinického vyšetření osob s bolestmi břicha /s podezřením na zápal slepého střeva/. Výsledky zkoušky se posuzují se zřetelem na specifickou a citlivost. Jakkoliv je dobře znám velký počet chybných pozitivních a chybných negativních výsledků v případě tohoto onemocnění, přičemž v tomto případě vždy šlo o jedince s podezřením na zápal slepého střeva, jsou výsledky zkoušky analýzy moči vysocí směrodatné. Výsledky takové zkoušky se musí hodnotit také z takového hlediska, že dosud neexistují jiné spolehlivé chemické zkoušky pro zjišťování onemocnění zápallem slepého střeva. Popsané zkoušky se použilo jen v případě jedinců s podezřením na zápal slepého střeva po standardním klinickém hodnocení. Zkouška je považována za pozitivní, pokud se pozoruje modrá fluorescenční skvrna v oblasti souhlasící s kyselinou σ -hydroxyhippurovou. Tato přítomnost se pak potvrdí HPLC. Výsledky těchto zkoušek jsou následující.

- 35/151 skutečně kladné /zkouška i chirurgie pozitivní/
- 3/151 klamně negativní /zkouška negativní, chirurgie pozitivní/
- 1/151 klamně pozitivní /zkouška pozitivní, chirurgie negativní/
- 104/151 skutečně negativní /zkouška negativní, chirurgie negativní nebo zbytečná/
- 8/151 pozitivní zkouška avšak dále nesledováni.

citlivost =

$$\frac{\text{skutečně pozitivní}}{\text{skutečně pozitivní} + \text{klamně negativní}} = \frac{35}{35 + 3} = 92,3 \%$$

specifičnost =

$$\frac{\text{skutečně negativní}}{\text{skutečně negativní} + \text{klamně pozitivní}} = \frac{104}{104 + 1} = 99,0 \%$$

Tyto výsledky jasně potvrzují objev vztahu prahové /minimální/ koncentrace /10 mg/l/ kyseliny σ -hydroxyhippurové v moči jedinců se zápallem slepého střeva, na kterém je způsob podle vynálezu založen.

Výhodné zařízení pro provádění výhodného způsobu stanovení kyseliny σ -hydroxyhippurové v moči

Za využití shora uvedeného vztahu mezi obsahem kyseliny σ -hydroxyhippurové v moči a zápallem slepého střeva byla vyvinuta různá diagnostická zařízení pro zjišťování zápalu slepého střeva. Většiny těchto diagnostických zařízení se používá pro dvoudílnou diagnostickou zkoušku pro zjišťování akutního zápalu slepého střeva. Vakkoliv je výhodné takové zkušební zařízení ze dvou částí, jsou možná také dvě oddělená zařízení pro provádění na sobě nezávislých oddělených dvou zkoušek zjištění zápalu slepého střeva. Společné použití obou částí však dává spolehlivější výsledky, na jejichž základě je možno provádět rozhodnutí o operaci. Úkolem diagnostického zařízení je možnost dobrého provádění zkoušky identifikace chemické sloučeniny /kyseliny σ -hydroxyhippurové/ v dostatečných koncentracích k potvrzení zápalu slepého střeva. Tato sloučenina, označovaná nadále jakožto "marker" při pojednávání o způsobu a zařízení, není zpravidla v moči v koncentraci 10 mg/l nebo větší nebo v krvi zdravých osob a přítomnost tohoto "markeru" v uvedených koncentracích indikuje zápal slepého střeva. Podle nejvýhodnějšího provedení zkoušky se může obou částí zařízení používat odděleně, přičemž obě

části poskytují použitelné výsledky.

Část A zkoušky s výhodou poskytuje rychlé vytrídění vzorků s obsahem markeru v moči za využití reakce oxidu křemičitého s železitými ionty k vyvolání barevné změny v přítomnosti markeru u jedinců se zápallem slepého střeva.

Část B zkoušky potvrzuje výsledky za použití extrakce a chromatografie v tenké vrstvě, při které se marker oddělí a zviditelní se jakožto barevná skvrna. Tento druhý postup slouží k potvrzení, že pozitivní výsledek části A zkoušky není způsobem nějakou interferující nečistotou.

Chemická podstata postupu

Část A výhodného provedení zkoušky je založena na reakci vázaných železitých inotů na oxidu křemičitém jakožto matrici, které reagují s markerem /s kyselinou σ -hydroxyhippurovou/ v moči za vzniku růžového až tmavo hnědého nebo purpurového zabarvení. Část B této zkoušky se s výhodou rozpadá do tří procedur: 1/ extrakce vzorku pevné fáze k izolaci správného markeru, jak bylo shora popsáno, 2/ chromatografie v tenké vrstvě a 3/ vyvolání markeru k vytvoření okem pozorovatelné barevné skvrny, která se porovnává s kontrolou za účelem pozitivní identifikace.

Materiály pro provádění zkoušky

Složek pro toto výhodné provádění zkoušky se může používat jakožto jednotky. Avšak součásti pro část zkoušky A a součásti pro část zkoušky B mohou tvořit také samostatná zařízení. V každém případě výhodné provedení zahrnuje tyto díly:

- Část A barevná reakční fiola
- polyethylenové kapátko
- barevná porovnávací destička

- Část B 3 ml stříkačka s citrátovým pufrům
- C18 extrakční trubka
- fiola promývací vody
- fiola extrakčního rozpouštědla

fiola pro shromažďování vzorku
tenkovrstvá destička v držáku
aplikátor pro 5 μ l skvrnu
skleněná vyvíjecí nádoba
fiola s vyvíjecím roztokem
kontrolní porovnávací destička

Shromažďování vzorku

Pro zkoušku se používá vzorku čerstvé moče; moče stačí i 1 ml, zkouška se však má provést co nejrychleji po získání moče. Výsledky zkoušky mohou ovlivnit konzervační přísady, určité potraviny a určitá léčiva.

Provádění části A zkoušky

- 1/ Vnese se 10 až 15 kapek vzorku moče na 1 ml oxidu křemičitého s železitými ionty.
- 2/ Za účelem promíšení se fiola několikrát obrátí.
- 3/ V několika sekundách vytvořené zabarvení zůstává stále po několik hodin. Výsledky zkoušky se mohou odečíst za 20 sekund, s výhodou na dobrém světle proti bílému základu.

Výsledky části A

Zabarvení moči na růžovou až tmavo hnědou nebo purpurovou barvu indikuje možnost zápalu slepého střeva. Barva se může snadno odečíst za použití kontrolní porovnávací destičky. Kontrolní porovnávací destička s výhodou zahrnuje řadu pozitivních barevných reakcí spolu s negativním oborem výsledků. Není zapotřebí žádných výpočtů. Jestliže je část A zkoušky pozitivní, pak se většinou provádí ještě část B zkoušky k potvrzení výsledku zjištěných částí A zkoušky. Močí, použitou při části B zkoušky není tatáž moč, které se použilo při části A zkoušky ale druhá část vzorku odebraného pacientovi. Část B zkoušky také napomáhá určit možný chybný výsledek zkoušky vlivem jiných znečišťujících látek.

Provádění části B

Tato zkouška se rozpadá většinou do tří stupňů.

Stupeň 1 Extrakce vzorku z pevné fáze k izolaci markeru

- 1/ Vnese se 1 ml vzorku moče do 100 mg kyseliny citronové a mírně se promísí k rozpuštění bílých krystalů.
- 2/ Roztok se zavede do předem kondicionované C18 extrakční trubky a proteklá moč se zahodí.
- 3/ Extrakční trubkou se nechá protéci 1 ml vody k odstranění solí a proteklá kapalina se vyhodí.
- 4/ Extrakční trubkou se nechá protéci 1 ml methanolu k vyjmutí kyseliny σ -hydroxyhippurové a eluant se uschová ve fiole pro další stupeň.

Stupeň 2 - Separace chromatografií v tenké vrstvě

- 1/ Za použití nádoby skleněné pro chromatografii v tenké vrstvě se vnese 2 ml roztoku 1% kyseliny octové v methanolu na dno nádoby a nádoba se přikryje ke snížení odpařování.
- 2/ Za použití destičky v držáku /například v lepenkovém držáku/ se položí systém destička/držák na plochý povrch. V tomto stupni se destičky nedotýkáme. Za použití 5 ml kapiláry se kapka vzorku nanese do středu souboru /označeného jako "pacientův vzorek"/, na kterém je destička. V případě potřebné koncentrace kyseliny σ -hydroxyhippurové má být skvrna rozpouštědla přibližně 1 až 2 mm.
- 3/ Skvrna se nechá několik minut zaschnout /může se využít mírného foukání/. Destička se vyjme z držáku a umístí se svisle do skleněné nádoby. Rozpouštědlo se nechá vzlínat na destičku až například po výšku 5 mm od horního konce destičky. Tento proces trvá zpravidla přibližně dvě minuty. Pak se destička z nádoby vyjme, nechá se asi minutu zaschnout a vrátí se do lepenkového držáku.

Stupeň 3 - Vývoj markeru k vytvoření vizuální barevné skvrny

- 1/ Za použití roztoku dusičnanu železitého v methanolu se vnese 4 nebo 5 kapek tohoto roztoku na absorpční konec měkké cupaniny. Mokrout cupaninou se potírá okénko lepenkového držáku hladkým pohybem. V okénku se bezprostředně objeví barevné skvrny a výsledek se může porovnat s kon-

trolním standardem.

Výsledky části B zkoušky

Výsledků části B zkoušky se může použít k povrzení výsledků zkoušky části A. Porevná skvrna ve stejné vertikální poloze v okénku destičky jako na kontrolním vzorku, povrzuje pozitivní výsledek, jak je ukázáno na obr. 1 a 2.

Pokud je skvrna v interferenční kontrolní oblasti, nemusí to nutně znamenat, že je zkouška negativní. Může to však znamenat, že nemocný bral nějaké léky, které mohou poskytovat klamně pozitivní výsledky. V takovém případě se zkouška má po možnosti opakovat za 12 hodin a v opakování zkoušky po 12 hodinách se pokračuje tak dlouho, až skvrna v interferenční kontrolní oblasti zmizí. Při tomto zvláštním provedení je zkouška kvalitativní a toliko semikvantitativní a intenzita skvrny není směrodatná. Pozorování jakékoliv jasně definované skvrny naznačuje možnost zápalu slepého střeva.

Pracovníkům v oboru je jasné, že při interpretaci zkoušky je třeba také klinických úvah a profesionálního posouzení stavu vyšetřované osoby. V mnoha případech se klinická diagnóza neprovádí na základě jediné zkoušky ale spíše se z dostupných klinických a laboratorních výsledků skládá celkový obraz o nemocném. Nicméně výsledky zkoušky podle vynálezu poskytují velmi hodnotnou informaci pro předběžné diagnostikování zápalu slepého střeva. Negativní výsledky těchto zkoušek podle vynálezu nevylučují totálně možnost zápalu slepého střeva, jelikož koncentrace urinárního markeru může být tak nízká, že je pro zkoušku nedostatečná. Naopak pozitivní výsledek nemůže rovněž znamenat konečnou diagnózu bez potvrzení dalších projevů onemocnění a bez posouzení dalších faktorů.

Pracovníkům v oboru je rovněž jasné, že obsah a množství kyseliny σ -hydroxyhippurové v moči lze posoudit i jinými způsoby, než bylo příkladně popsáno a že tedy shora uvedené příklady neznamenaají žádné omezení vynálezu. Rovněž úkolem připojených obrázků je způsob blíže objasnit a nikoliv omezit.

vnáší

Na obr. 1 je znázorněno kapátko, kterým se/10 až 15 kapek

moče do trubky s oxidem křemičitým s nanesenými železitými ionty, nákreš hodin, ukazujících, že se mírné promíchávání provádí 20 až 30 sekund a barevná porovnávací destička s barevným vzorkem růžovým až hnědým nebo purpurově červeným. Tento obrázek se týká příkladného provádění části A zkoušky.

Na obr. 2 jsou postupně zobrazeny jednotlivé fáze části B. Vnáší se 1 ml moče ze stříkačky 1 s citrátovým pufrům, nechá se protéci extrakční trubkou 2, z fioly 3 s promývací vodou se vnese 1 ml promývací vody, z fioly 4 se nechá přitéci 1 ml methanolu; do skleněné nádoby 5 se vnese vyvolávací rozpouštědlo, skvrna zkoušené moče se nanese na destičku 6 v držáku 7, destička 6 se vloží do skleněné nádoby 5, na absorpční konec měkké cupaniny 8 se nanese 4 nebo 5 kapek dusičnanu železitého a tímto koncem měkké cupaniny 8 se potírá destička 6 v držáku 7, přičemž se v několika sekundách na ní zviditelný barevné skvrny.

Průmyslová využitelnost

Rychlý způsob ke spolehlivému doplnění diagnostických způsobů zápalu slepého střeva. Je založen na skutečnosti, že v moči nemocných zápalem slepého střeva je zjistitelná prahová koncentrace kyseliny σ -hydroxyhippurové.

DV 16 64-90

- 30 -

P A T E N T O V É

PRIL	URAD PRO VYNALEZY A OBJEMY	08. V. 91	023375	31
N A	O K Y			

1. Způsob zjišťování zápalu slepého střeva, vyznačený tím, že se odebere vzorek moči jedince, u něhož je podezření na zápal slepého střeva a stanoví se v něm koncentrace kyseliny σ -hydroxyhippurové, přičemž onemocnění indikuje alespoň přibližně 10 mg/l moči.
2. Způsob zjišťování zápalu slepého střeva, vyznačený tím, že se odebere vzorek moči jedince, u něhož je podezření na zápal slepého střeva a který trpí nevolností, zvracením a bolestí břicha, a stanoví se v něm koncentrace kyseliny σ -hydroxyhippurové, přičemž onemocnění indikuje obsah σ -hydroxyhippurové kyseliny přibližně 10 mg/l moče.
3. Způsob zjišťování zápalu slepého střeva, vyznačený tím, že se odebere vzorek moči jedinci, u něhož je podezření na zápal slepého střeva a který trpí nevolností, zvracením a bolestí břicha, a stanoví se v něm koncentrace kyseliny σ -hydroxyhippurové v množství alespoň 10 mg/l chemickým identifikačním způsobem ze souboru zahrnujícího chromatografii v tenké vrstvě, vysokotlakou kapalinovou chromatografii, spektrofotometrickou kolorimetrii, chemickou reakci probíhající za vyvolání barevné změny, použití destičky s barevnými standardy, monoclonální testy protilátek, radioimnologické zkoušky, enzymatické zkoušky, nukleární magnetickou resonanci, ultrafialové světlo, hmotovou spektrometrii a elektroforesu.
4. Způsob zjišťování zápalu splepého střev^a, vyznačený tím, že se odebere vzorek moči jedinci, u něhož je podezření na zápal slepého střeva a který trpí nevolností, zvracením a bolestí břicha a stanoví se v něm koncentrace kyseliny σ -hydroxyhippurové v množství alespoň 10 mg/l za využití chromatografie v tenké vrstvě.
5. Způsob zjišťování zápalu slepého střeva, vyznačený tím, že se odebere vzorek moči jedinci, u něhož je podezře-

ní na zápal slepého střeva a který trpí nevolností, zvracením a bolestí břicha, kyselina σ -hydroxyhippurová se ze vzorku moči chemicky extrahuje a vysokotlakou kapalinovou chromatografií se stanovuje koncentrace kyseliny σ -hydroxyhippurové, přičemž její množství alespoň 10 mg/l moče je indikativní pro zápal slepého střeva.

6. Způsob zjišťování zápalu slepého střeva, vyznačený tím, že se odebere vzorek moči jedinci, u něhož je podezření na zápal slepého střeva a který trpí nevolností, zvracením a bolestí břicha, kyselina σ -hydroxyhippurová se ze vzorku moči chemicky extrahuje a chromatografií v tenké vrstvě se stanovuje koncentrace kyseliny σ -hydroxyhippurové, přičemž její množství alespoň 10 mg/l moče je indikativní pro zápal slepého střeva.

7. Způsob zjišťování zápalu slepého střeva, vyznačený tím, že se odebere vzorek moči jedinci, u něhož je podezření na zápal slepého střeva a který trpí nevolností, zvracením a bolestí břicha, kyselina σ -hydroxyhippurová se ze vzorku moči chemicky extrahuje a vysokotlakou kapalinovou chromatografií se stanovuje složka kyseliny σ -hydroxyhippurové, přičemž kyselina σ -hydroxyhippurová v množství alespoň 10 mg/l moči je indikativní pro zápal slepého střeva.

8. Způsob zjišťování zápalu slepého střeva, vyznačený tím, že se odebere vzorek moči jedinci, u něhož je podezření na zápal slepého střeva a který trpí nevolností, zvracením a bolestí břicha, složka kyseliny σ -hydroxyhippurové se z moči chemicky extrahuje za použití chemického extrakčního systému voleného ze souboru zahrnujícího diethylether, butanol, oxidu křemičitého C18 pro kyselinu hydroxyhippurovou ve vodném prostředí nebo se používá oxidu křemičitého C18 pro kyselinu σ -hydroxyhippurovou v methanolovém prostředí k vytvoření barevné reakce mezi kyselincem σ -hydroxyhippurovou a chemickým extrakčním systémem a zjištění koncentrace kyseliny σ -hydroxyhippurové ve vzorku moče alespoň 10 mg/l se považuje za indikativní pro zápal slepého střeva, přičemž

se toto zjištění provádí chromatografií v tenké vrstvě a pak pomocí ultrafialového světla o délce vln přibližně 250 až přibližně 360 nm, přičemž zviditelnění modré fluorescenční skvrny s retenčním faktorem shodným se standardem potvrzuje koncentraci kyseliny σ -hydroxyhippurové a tak zápal slepého střeva.

9. Způsob zjišťování zápalu slepého střeva, vyznačený tím, že se odebere vzorek moči jedinci, u něhož je podezření na zápal slepého střeva a který trpí nevolností, zvracením a bolestí břicha, přítomnost kyseliny σ -hydroxyhippurové se ověří nejprve v části vzorku moče trojmocným železitým iontem nebo s měďnatým iontem, které jsou schopny barevné reakce s kyselinou σ -hydroxyhippurovou a výsledek barevné reakce uvedených iontů s kyselinou σ -hydroxyhippurovou se porovná s předem připravenou barevnou standardní tabulkou, čímž se zjistí zápal slepého střeva.

10. Způsob zjišťování zápalu slepého střeva, vyznačený tím, že se odebere vzorek moči jedinci, u něhož je podezření na zápal slepého střeva a který trpí nevolností, zvracením a bolestí břicha, přítomnost kyseliny σ -hydroxyhippurové se ověří nejprve v první části moče reakcí s železitým iontem vázaným na silikagel, přičemž železitý iont je schopen barevné reakce s kyselinou σ -hydroxyhippurovou, složka kyseliny σ -hydroxyhippurové se ze vzorku moče extrahuje chemickým systémem ze souboru zahrnujícího diethylether, butanol, oxid křemičitý s vázaným železitým iontem nebo C18 oxid křemičitý pro vnesení složky kyseliny σ -hydroxyhippurové do vodného prostředí nebo C18 oxidu křemičitého pro vnesení složky kyseliny σ -hydroxyhippurové do methanolového prostředí, přičemž se zjišťuje koncentrace kyseliny σ -hydroxyhippurové ve druhém podílu vzorku moče alespoň 10 mg/l podrobováním tohoto druhého vzorku moče chromatografií v tenké vrstvě a pak pomocí ultrafialového světla o délce vln přibližně 250 nm až 360 nm, přičemž zviditelnění modré fluorescenční skvrny s retenčním faktorem přibližně 0,4 je indikací zápalu slepého střeva.

11. Způsob podle bodu 10, vyznačený tím, že se trojmocného železitého iontu používá ve formě vázané na oxid křemičitý.

12. Soubor pro stanovení přítomnosti kyseliny σ -hydroxyhippurové v lidské moči v koncentraci alespoň 10 mg/l vyznačený tím, že zahrnuje fiolu obsahující jako reagenční činidlo oxid křemičitý s vázaným železitým iontem, do které se vnáší zkoušená moč, prostředky pro přidávání odměřeného množství moči k reakčnímu činidlu na bázi oxidu křemičitého a trojmocného železitého iontu k vytvoření barevné reakce a tabulku barevných standardů pro porovnání barvy vzniklé reakcí.

13. Soubor podle bodu 12, vyznačený tím, že fiola obsahuje přibližně 1 ml činidla na bázi oxidu křemičitého a železitého iontu, přičemž prostředkem pro vnášení moče je kapátko a moče se odměřuje 10 až 15 kapek.

14. Soubor pro stanovení přítomnosti kyseliny σ -hydroxyhippurové v lidské moči v koncentraci alespoň 10 mg/l, vyznačený tím, že zahrnuje stříkačku s citrátovým pufrům pro příjem odměřeného množství moče, extrakční trubku obsahující C18 reakční činidlo a schopnou přijímat kapalinu ze stříkačky, fiolu s vodou pro zavádění vody do extrační trubky obsahující C18 reakční činidlo, přičemž se voda po průchodu trubkou vyhazuje, fiolu s rozpouštědlem schopným extrahovat kyselinu σ -hydroxyhippurovou z C18 extrakční trubky, fiolu pro shromažďování vzorku rozpouštědla a kyseliny σ -hydroxyhippurové z extrakční trubky, nádobu pro vzorek rozpouštědla a kyseliny σ -hydroxyhippurové, držák se vmontovanou destičkou pro chromatografii v tenké vrstvě pro přijímání vzorku rozpouštědla a kyseliny σ -hydroxyhippurové s okénkem, které se potírá cupaninou impregnovancu systémem rozpouštědlo - kyselina σ -hydroxyhippurová a cupaninu a kontrolní standard pro porovnání umístění skvrn na okénku s kontrolním standardem.

15. Soubor pro stanovení přítomnosti kyseliny σ -hydroxyhippurové v lidské moči v koncentraci alespoň 10 mg/l, vyznačený tím, že zahrnuje fiolu obsahující jakožto reakční činidlo oxid křemičitý s železitými ionty, do které se vnáší první zkoumané množství moče, prostředky k přidávání odměřeného množství moče k reakčnímu činidlu na bázi oxidu křemičitého a železitých iontů, barevnou porovnávací destičku, Stříkačku s citrátovým pufrům pro příjem odměřeného množství moče, extrakční trubku obsahující C18 reakční činidlo a schopnou přijímat kapalinu ze stříkačky, fiolu s vodou pro zavádění vody do extrakční trubky obsahující C18 reakční činidlo, přičemž se voda po průchodu trubkou vyhazuje, fiolu s rozpouštědlem, schopným extrahovat kyselinu σ -hydroxyhippurovou z C18 obseženým v extrakční trubce, fiolu, pro shromažďování vzorku rozpouštědla a kyseliny σ -hydroxyhippurové z extrakční trubky, nádobu pro vzorek rozpouštědla a kyseliny σ -hydroxyhippurové, držák se vmontovanou destičkou pro chromatografii v tenké vrstvě, mající první plochu destičky k příjmu vzorku rozpouštědla a kyseliny σ -hydroxyhippurové a plochu okénka pro příjem systému rozpouštědla a kyselina σ -hydroxyhippurová ze napuštěné cupaniny, přičemž se alespoň část vzorku rozpouštědla a kyseliny σ -hydroxyhippurové dostane na plochu okénka destičky, cupaninu a kontrolní standard pro porovnání polohy skvrn na ploše okénka destičky a na kontrolním standardu.

16. Soubor podle bodu 15, vyznačený tím, že fiola s obsahem reakčního činidla na bázi oxidu křemičitého a trojmocných iontů železa obsahuje 1 ml tohoto reakčního činidla na bázi oxidu křemičitého a trojmocných iontů železa.

17. Soubor podle bodu 15, vyznačený tím, že stříkačka s citrátovým pufrům obsahuje přibližně 100 mg kyseliny citronové jakožto citrátový pufr a rozpouštědlo pro extrakci kyseliny σ -hydroxyhippurové ze C18, kterým je přibližně 1 ml methanolu.