



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

243453

(11) (B2)

(22) Přihlášeno 11 03 80  
(21) PV 1656-80  
(32) (31)(33) Právo přednosti od 15 03 79  
(P 29 10 134.6) Německá spolková republika

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>  
G 01 N 33/53

(40) Zveřejněno 31 08 85

(45) Vydáno 15 07 87

(72) Autor vynálezu

VOGEL PETER dr., WEINHEIM, BRAUN HANS-PETER dr., HEMSBACH,  
BERGER DIETER dr., VIERNHEIM,  
WERNER WOLFGANG dr., MANNHEIM (NSR)

(73) Majitel patentu

BOEHRINGER MANNHEIM GmbH, MANNHEIM (NSR)

(54) Diagnostický prostředek pro důkaz látek obsažených v kapalinách  
a způsob jeho výroby

Diagnostický prostředek pro důkaz látek obsažených v kapalinách, například cholesterolu v séru, sestávající z filmu stálého v kapalinách, který je vyroben z vodné disperze filmotvorných organických plastických hmot, jako například z polyvinylpropionátu, a obsahuje rozvolnovací film, například celulózu, v podobě nerozpustných anorganických nebo organických částic o průměru 0,5 až 50 µm, například oxid titaničitý nebo celulózu, a reakční činidla potřebná pro důkaz hledaných látek, například cholesterol-oxidázu, peroxidázu a tetramethylbenzidin, v množství 0,1 až 15 % filmotvorné látky, přičemž poměr rozvolnovacího filmu k filmotvorné látce činí 20:1 až 0,5:1.

Důkaz obsahových látek v kapalinách pomocí testovacích proužků má stále větší význam. Poskytuje v mnoha případech jednoduchý, levný a rychlý detekční způsob. Široké uplatnění testovacích proužků nacházejí také v diagnostice moči, a to jako kvalitativní tak polokvantitativní detekční postup. Speciální testovací proužky se mohou také používat při lékařských diagnozách pro detekci obsahových látek v krvi a seru. Kromě toho testovací proužky mohou také najít mnohé uplatnění pro zkoušky nápojů, pitné vody, odpadních vod a jiných v průmyslu odpadávajících kapalin.

Obtíže při kvantitativním vyhodnocování detekčních metod spočívají v tom, že vysokomolekulární a korpuskulární podíly kapalin se rychle usazují na podkladě pro testovací proužky, které sestávají výlučně z papíru jakožto nasávajícího nosiče. Jako příklad je možno uvést metodu stanovení hemoglobinu v krvi podle Tallqvista. Homogenita vztahující se na tloušťku vrstvy, struktury a složení, která je pro kvantitativní testy nutná, se u papíru pouze obtížně dosahuje. Při použití pro kvantitativní testy se projevuje další nevýhoda, spočívající v tom, že je nutné přesné dávkování testovacího materiálu.

Velkým pokrokem pro kvantitativní stanovení nízkomolekulárních látek je používání filmů podle německého patentu č. 1 598 153. Vlastnosti těchto filmů se mohou upravit pro každý analytický postup. Nevyžadují přesné dávkování testovaných roztoků a reagují stejnoměrně s močí, plazmou, sérem nebo krví. Po krátké reakční době se nadbytečný testovací materiál jednoduše smyje. Na základě malé velikosti pórů tohoto filmu je možné oddělení dispergovaných nebo suspendovaných podílů testovaného roztoku případně erythrocytů krve od nízkomolekulárních rozpustných obsahových látek.

Tyto filmy mohou pro zlepšení vlastností obsahovat také malá množství pomocných látek resp. pigmentů, jako je křída nebo kysličník titaničitý a zvýší si tak jejich světlost.

Tyto filmy se ale nemohou používat, jestliže se mají stanovovat buněčné podíly nebo velké molekuly, například enzymy. Tyto sloučeniny se nevsakují nebo nedostatečně vsakují do filmu a nedosáhne se měřitelné reakce. Proto se tímto principem filmu nemohou vypracovat použitelné testy pro stanovení hemoglobinu, cholesterolu v lipoproteinech nebo enzymech.

Nyní bylo s překvapením nalezeno, že nasáklivé "rozvolněné" filmy se mohou připravit, jestliže se do vodných disperzí nebo organického roztoku látek vytvářejících film, ze kterých vznikne ve vodě nerozpustný film, přidají pevné látky ve formě jemných nerozpustných organických nebo anorganických částíček. Protože pevná látka sama "nereaguje", není její složení rozhodující a mohou se používat například celulóza, křemelina, silikagel, přesrážená sádra, uhlíkatý vápenatý, kaolin, polyamid, sklo a jiné. Poměr těchto látek, níže nazývaných "rozvolňovačů filmů" k filmovému pojídlu může být 20 : 1 až 0,5 : 1, s výhodou 5 : 1 až 1 : 1. Tento poměr závisí na použitém rozvolňovači filmu a pojídlu filmu, jakož i na předpokládaném účelu použití. Se stoupajícím množstvím rozvolňovače filmu a se stoupajícím specifickým povrchem použitého materiálu se film stává nasáklivější.

Přestoupí-li podíl rozvolňovače filmu určitou hranici, stává se film mechanicky nestabilním. Jestliže se přidá příliš málo rozvolňovače do filmu, pak je pro vysokomolekulární nebo buněčné podíly neprůchodný. Například jestliže se jako rozvolňovač filmu používá polyamid nebo přesrážená sádra a jako pojídlo filmu se používá vodná disperze polyvinylpropionátu, pak poměr rozvolňovače filmu má s výhodou být 5 : 1 až 2 : 1. Jestliže se použije křemelina, pak poměr je s výhodou 2 : 1 až 1 : 1.

Vhodnými pojídly pro film jsou s výhodou organické plastické hmoty, jako je polyvinylester, polyvinylacetát, polyakrylester, polymethakrylová kyselina, polyakrylamidy, polyamidy, polystyren, směsné polymery, například butadienu a styrenu nebo esteru maleinové kyseliny a vinylacetátů, mohou se však použít také jiné film tvořící, přírodní a syntetické organické polymery, jakož i jejich směsi, s výhodou ve formě vodných disperzí. Filmová pojídla se mohou také rozpouštět v organických rozpouštědlech, například kopolymer vinylchloridu a vinylpropionátu v esteru kyseliny octové.

Disperze nebo roztoky se mohou nanést v stejnoměrné vrstvě na podložku a po vysušení se získá film odolný vůči vodě.

Výhodou vůči nasáklivému papíru je ta okolnost, že takovéto filmy se mohou připravit jednoduchým způsobem ve stejnoměrné a reprodukovatelné formě. Film se může použít spolu s podložkou používanou jako nosič, nebo se může při detekční reakci z podložky sejmut, případně se může nanést na jiné nosiče. Jako nosiče pro filmy se s výhodou používají plastické folie. Rovněž tak se mohou jako nosiče použít jiné folie, papír, plastické tabulky, sklo, kov a pod., a to v závislosti na způsobu použití.

Reakční činidla potřebná pro detekční reakci se běžně přidávají přímo do disperze. Zejména výhodné je, jestliže se vzniklý film reakčním činidlem impregnuje. Rovněž tak je možné, jestliže se reakčním činidlem předem impregnují částičky používané jako rozvolňovače. Postup se může rovněž tak kombinovat, že například určité podíly se přidávají do disperze a jinými se pak impregnuje film. Tím se docílí určité prostorové oddělení podílů, což může vést ke stabilním nebo reaktivním testům. Další možnost, při které se podíly vzájemně oddělují, spočívá v tom, že se tyto rozdělí do různých částí hmoty používané pro povlákání a tyto se v optimálním pořadí postupně nanášejí a získá se vícevrstvý systém.

Pokud je to nutné, mohou se přidávat různá zahušťovadla, emulgátory, disperzní činidla, pigmenty, jako je například kysličník titaničitý, změkčovadla, smáčedla a pod.

Disperzní činidla, emulgátory a zahušťovadla slouží k přípravě a stabilizaci disperzí. Pigmenty, jako je například kysličník titaničitý, které mohou být indentické s rozvolňovači filmu, zlepšují remisní vlastnosti filmu tím, že připraví pokud možno nízkou transparentci a zvýšenou světlost. To je zejména pak výhodné, jestliže se takto získaný diagnostický prostředek hodnotí remisní fotometrií. Změkčovadlem se mohou optimalizovat vlastnosti filmu. Například se zlepší trvanlivost, viskozita a adheze na různých podložkách. Zlepšení smáčitelnosti filmů testovacím roztokem se dosáhne použitím smáčedla. Rovněž tak mohou současně katalyzovat reakci nebo stabilizovat složení nebo zesílit jasnost a kontrast reakční barvy.

Ažkoliv se popsané filmy s výhodou používají pro důkaz vysokomolekulárních a částéčkových podílů, mohou se samozřejmě používat také pro důkaz a stanovení nízkomolekulárních sloučenin. Oproti filmům podle západoněmeckého patentu č. 16 98 153 mají tu výhodu, že testovaný roztok silněji a rychleji nasávají, což vede k intenzivnější reakci. Při vhodné volbě poměru rozvolňovače k pojídlu filmu, který ještě navíc závisí na typu těchto látek, například při poměru 0,5 : 1 až 2 : 1, je v mnoha případech možné potlačit vniknutí vysokomolekulárních látek do filmu, které může být příčinou poruch, a dokazovat a popřípadě stanovovat pouze nízkomolekulární látky. Zde popsané filmy se mohou s výhodou použít pro důkaz obsahových látek tělesných kapalin, jako je moč, krev, serum a sliny, ale i ve vhodné modifikaci pro důkazy ve vodných kapalinách, jako je pitná voda, odpadní voda apod. a případně také v organických rozpouštědlech, ve kterých jsou nerozpustné.

Předmětem vynálezu je diagnostický prostředek pro důkaz korpuskulárních, vysokomolekulárních a nízkomolekulárních látek obsažených v kapalinách, například cholesterolu v séru, který je vyroben z vodné disperze filmotvorných organických plastických hmot, jako například z polyvinylpropionátu. Jeho podstata spočívá v tom, že obsahuje rozvolňovač filmu, například celulózu, v podobě nerozpustných anorganických nebo organických částic o průměru 0,5 až 50  $\mu\text{m}$ , například oxid titaničitý nebo celulózu a reakční činidla pro jejich důkaz, například cholesterol-oxidázu, peroxidázu a tetraethylbenzidin, v množství 0,1 až 15 % filmotvorné látky, přičemž poměr rozvolňovače filmu k filmotvorné látce činí 20 : 1 až 0,5 : 1.

Diagnostický prostředek podle vynálezu může být výhodně upraven tak, že film pro důkaz vysokomolekulárních a korpuskulárních látek vykazuje poměr rozvolňovače filmu k filmotvorné látce 1 : 1 až 20 : 1 nebo 2 : 1 až 5 : 1.

Film pro důkaz látek o molekulové hmotnosti do 100 000, zejména látek o molekulové hmotnosti v rozsahu 50 až 100 000, má s výhodou poměr rozvolňovače filmu k filmotvorné látce 0,5 : 1 až 2 : 1.

Diagnostický prostředek podle vynálezu ve výhodném provedení může obsahovat film stálý ve vodě, který je fixován na nosiči, například na polykarbonátové fólii.

Způsob výroby diagnostického prostředku podle vynálezu se provádí tak, že vodná disperze filmotvorné látky s rozvolňovačem filmu, jakož i popřípadě reakční činidla, například cholesteroloxidáza, peroxidáza, a tetramethylbenzidin a pomocné látky, například dioktylsukcinát, fosfatový pufr a oxid titaničitý, se smíchají, směs se pak vytveruje na podložce do tvaru filmu o tloušťce 50 až 500  $\mu\text{m}$  a vodná kapalina se odpaří, načež se vzniklý film popřípadě impregnuje reakčními činidly, například tetramethylenbenzidinem, fenantridinem nebo kyselinou citronovou. Je výhodné, jestliže se film uvolní od podložky a upevní se na nosič, například na polykarbonátovou fólii.

Velká výhoda spočívá v tom, že film, který nutné množství reakčních činidel pojme, se může upravit pro předpokládaný účel použití tak, že se vyberou nejlepší vlastnosti pojidla filmu, rozvolňovače filmu a pod. Další velkou výhodou je to, že se docílí dávávkování vzorku, neboť film si testovaný materiál sám dávákuje. Přebytek se jednoduše po určité době působení spláchne.

Prostředek podle vynálezu je blíže objasněn v následujících příkladech.

#### P ř í k l a d 1

Pro přípravu reagenčních filmů pro důkaz cholesterolu v seru se připraví disperze následujícího složení:

|                                                                                                                 |                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| celulóza                                                                                                        | 5 g             |
| disperze polyvinylpropionátu<br>(50 % ve vodě)                                                                  | 3 g             |
| methyldihydroxypropyl-celulóza                                                                                  | 0,042 g         |
| kysličník titaničitý práškováný                                                                                 | 2 g             |
| cholesterolesterasa                                                                                             | 1 200 jednotek  |
| cholesteroloxidáza                                                                                              | 800 jednotek    |
| peroxidáza                                                                                                      | 26 000 jednotek |
| galová kyselina                                                                                                 | 0,0032 g        |
| Roztok 0,2 g 3,3', 5,5'-<br>tetramethylbenzidinu a 0,17 g<br>dioktylsulfosukcinátu sodného<br>v 0,74 ml acetonu | 1 ml            |
| kaliumpyridoxalpyridinofosfát                                                                                   | 0,049 g         |
| dihydrát dinatriumpyridoxalpyridinofosfátu                                                                      | 0,167 g         |
| destilovaná voda                                                                                                | 19,5 ml         |

Směs se nanese na polykarbonátové folie v tloušťce 300  $\mu$  a pak se vysuší v horkém vzduchu. Takto získaná reagenční vrstva poskytne v séru obsahujícím cholesterol v závislosti na jeho koncentraci dobře odstupňované modré zbarvení. Po upravení remisního fotometru (Reflomat <sup>®</sup>) opatřeného lineární škálou na hodnotu 0 pro testované proužky a na hodnotu 100 pro černou folii, získají se různé koncentrace cholesterolu následující hodnoty:

|                       |                  |
|-----------------------|------------------|
| 0 mg                  | 0 dílků stupnice |
| 100 mg                | 6 " "            |
| 200 mg                | 44 " "           |
| 300 mg                | 66 " "           |
| 400 mg                | 76 " "           |
| 500 mg                | 83 " "           |
| 600 mg                | 88 " "           |
| černá kontrolní folie | 100 " "          |

## Příklad 2

Pro test důkazů erythorocytů v moči se nejprve připraví z následující směsi:

|                                                |        |
|------------------------------------------------|--------|
| disperze polyvinylpropionátu<br>(50 % ve vodě) | 50 g   |
| kaolin                                         | 60 g   |
| dioktysulfosukcinát sodný                      | 2 g    |
| destilovaná voda                               | 140 ml |

Směs se nanese na polykarbonátové folie a připraví se vrstva 400  $\mu$ , která se usuší v proudu teplého vzduchu. Takto získaný film se impregnuje níže uvedenými roztoky I a II a po každé impregnaci se vysuší v proudu horkého vzduchu.

### Roztok I

|                                                 |         |
|-------------------------------------------------|---------|
| sodná sůl ethylendiaminotetraoctové<br>kyseliny | 1 g     |
| trinatriumcitrát . 2H <sub>2</sub> O            | 15,7 g  |
| kyselina citronová . H <sub>2</sub> O           | 3,48 g  |
| trimorfolid kyseliny fosforečné                 | 30,5 g  |
| benzo-světlá žluť                               | 0,048 g |
| dest. voda                                      | 190 ml  |

K tomuto se přidá 3,2 g 2,5-dimethyl-2,5-dihydroperoxyhexanu rozpuštěného v 60 ml methanolu.

### Roztok II

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidin | 0,56 g |
| dioktysulfosukcinát sodný      | 1,0 g  |
| fenanthridin                   | 1,4 g  |
| fenylsemikarbazid              | 0,06 g |

|                |        |
|----------------|--------|
| toluen         | 100 ml |
| methoxyethanol | 10 ml  |
| petrolether    | 90 ml  |

Takto připravený film poskytna s močí obsahující erythrocyty zelené zbarvení.

#### Příklad 3

Film pro důkaz dusitanů v moči se připraví následujícím způsobem:

Do níže uvedeného roztoku a) se přidá 10 g celulózy, roztok se odfiltruje a vysuší v proudu vzduchu.

##### Roztok a)

|                                         |         |
|-----------------------------------------|---------|
| 3-hydroxy-1,2,3,4-tetra-hydrobenzo-(h)- |         |
| chinolin                                | 0,392 g |
| sulfenilamid                            | 0,344 g |
| L-vinná kyselina                        | 5,00 g  |
| methanol p. a.                          | 200 ml  |

S takto impregnovanou celulózou se připraví následující hmota pro film:

|                                                       |        |
|-------------------------------------------------------|--------|
| impregnovaná celulóza                                 | 10,00g |
| methylhydroxypropylcelulóza                           | 0,09 g |
| disperze polyvinylpropionátu<br>(50 % ve vodě)        | 5 g    |
| 10 % roztok dioktysulfosukcinátu<br>sodného v acetonu | 3 ml   |
| destilovaná voda                                      | 35 ml  |

Na polyesterovou folii se nanese vrstva silná 400  $\mu$  a vysuší se v proudu horkého vzduchu. Ve vodě nerozpustný film poskytuje s kapalinou obsahující dusitany, například močí nebo průmyslovými odpadními kapalinami, červené zbarvení.

#### Příklad 4

Pro důkaz hemoglobinu v krvi se připraví reagenční film z následující směsi:

|                                                |       |
|------------------------------------------------|-------|
| celulóza                                       | 20 g  |
| disperze polyvinylpropionátu<br>(50 % ve vodě) | 15 g  |
| dioktysulfosukcinát sodný                      | 0,3 g |
| 0,5 mol $\text{PO}_4$ -pufr. pH = 7            | 75 ml |

Směs se nanese na polyesterovou folii v tloušťce 200  $\mu$  a vysuší horkým vzduchem.

Nechá-li se z řady zředění krve s různým obsahem hemoglobinu působit vždy 1 kapkou 1 minutu na testující proužek, získají se po utření kapek vatou odstupňovaná zbarvení.

Změřili-li se vzniklé zbarvení testovaných proužků na remisním fotometru (PM Q3 Zeiss) při 540 nm, pak se získá v závislosti na koncentraci hemoglobinu následující hodnoty:

| g HB/l | % R  |
|--------|------|
| 53     | 46,1 |
| 100    | 38,8 |
| 150    | 31,7 |
| 201    | 25,5 |

#### Příklad 5

Pro stanovení hranic postupů byly ve směsi podle příkladu 4 obměňovány rozvolňovače filmů a pojidla filmů. Získaly se filmy s následujícími vlastnostmi:

| rozvolňovač/pojidlo filmu<br>filmu |   |   | vlastnosti při reakci s erythrocyty<br>v krvi                                                          |
|------------------------------------|---|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Křemelina: polyvinylpropionát      |   |   |                                                                                                        |
| 0,5                                | : | 1 | stabilní film, erythrocyty se vsakují pouze v některých místech                                        |
| 1                                  | : | 1 | stabilní film, stejnomořná reakce celého filmu                                                         |
| 4                                  | : | 1 | stejnomořná reakce celého filmu, filmový materiál po utření je již částečně rozpuštěn                  |
| sádra: polyvinylpropionát          |   |   |                                                                                                        |
| 3                                  | : | 1 | stabilní film, nedostatečně propojené vybarvení                                                        |
| 4 až 10                            | : | 1 | stabilní film, stejnomořná intenzivní zbarvení                                                         |
| 20                                 | : | 1 | film, který může být setřen nízkým tlakem, stejnomořné zbarvení, kapky se chromatografují na okrajích. |

#### PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Diagnostický prostředek pro důkaz látek obsažených v kapalinách, například cholesterolu v séru, sestávající z filmu stálého v kapalinách, který je vyroben z vodné disperze filmotvorných organických plastických hmot, jako například z polyvinylpropionátu, vyznačený tím, že obsahuje rozvolňovač filmu, například celulózu, v podobě nerozpustných anorganických nebo organických částic o průměru 0,5 až 50  $\mu\text{m}$ , například oxid titaničitý nebo celulózu, a reakční činidla pro jejich důkaz, například cholesterol-oxidázu, peroxidázu a tetramethylbenzidin, v množství 0,1 až 15 % filmotvorné látky, přičemž poměr rozvolňovače filmu k filmotvorné látce činí 20 : 1 až 0,5 : 1.

2. Diagnostický prostředek podle bodu 1, vyznačený tím, že film pro důkaz vysokomolekulárních a korpuskulárních látek vykazuje poměr rozvolňovače filmu k filmotvorné látce 1 : 1 až 20 : 1.

3. Diagnostický prostředek podle bodu 2, vyznačený tím, že poměr rozvolňovače filmu k filmotvorné látce je 2 : 1 až 5 : 1.

4. Diagnostický prostředek podle bodu 1 a 2, vyznačený tím, že film pro důkaz látek o molekulové hmotnosti do 100 000, zejména v rozsahu 50 až 100 000, vykazuje poměr rozvolňovače filmu k filmotvorné látce 0,5 : 1 až 2 : 1.

5. Diagnostický prostředek podle bodu 1, vyznačený tím, že film stálý ve vodě je fixován na nosiči, například na polykarbonátové fólii.

6. Způsob výroby diagnostického prostředku podle bodu 1 až 6, vyznačený tím, že vodná disperze filmotvorné látky s rozvolňovačem filmu, jakož i popřípadě reakční činidla, například cholesterol-oxidáza, peroxidáza a tetrametylbenzidin, a pomocné látky, například dioktylsukcinát, fosfátový pufr a oxid titaničitý, se smíchají, směs se vytvaruje na podložce do tvaru filmu o tloušťce 50 až 500  $\mu\text{m}$  a vodná kapalina se odpeří, načež se vzniklý film popřípadě impregnuje reakčními činidly, například tetrametylenbenzidinem, fenanthridinem nebo kyselinou citronovou.

7. Způsob podle bodu 6, vyznačený tím, že se film uvolní od podložky a upevní se na nosič, například na polykarbonátovou fólii.