



POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

216810
(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
B 01 J 19/00

(22) Přihlášeno 06 09 78

(21) (PV 5778-78)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 28 10 77
(846441) Spojené státy americké

(40) Zveřejněno 29 01 82

(45) Vydáno 15 01 85

[72]

Autor vynálezu

WHITE WILLIAM I., ELKHART, INDIANA (Sp. st. a.)

[73]

Majitel patentu

MILES LABORATORIES, INC., ELKHART, INDIANA (Sp. st. a.)

(54) **Způsob stanovení látky ve vzorku v několika reakčních systémech, z nichž se každý uplatňuje za odlišných reakčních parametrů**

1

Vynález se obecně vztahuje k oboru zkoušení složení různých prostředí za použití zkušebních prostředků, zejména se týká způsobu stanovení látky v několika reakčních systémech, z nichž se každý uplatňuje za odlišných reakčních parametrů.

Až dosud byl vyvinut velký počet zkušebních prostředků pro stanovení specifických složek v kapalinách, jako je moč a krev. Tyto zkušební prostředky měly různé formy. Jednou z nejoblíbenějších forem byly zkušební papírky indikující po navlhčení vzorkem požadovanou složku. Některé z těchto prostředků jsou vhodné pro stanovení takových složek, jako je glukóza, bílkovina, skrytá krev a podobné látky v tělesných tekutinách, zatímco jiné se hodí pro stanovení různých složek v jiných kapalinách, jako ve vodě v plaveckých bazénech, v řezných tekutinách apod.

Tyto známé zkušební systémy byly obvykle systémy jednofázového typu a obsahovaly jednu nebo více reakčních složek pro udržení reakčních parametrů při zkušební reakci ve specifickém rozmezí, aby reakce mohla probíhat, například pufr pro udržování specifického rozmezí hodnoty pH.

Některé z těchto systémů zahrnovaly více než jednu reakci a pokud tyto reakce bylo možno provádět za stejných reakčních

2

podmínek, byly takové systémy uspokojivé. Existuje však řada situací, kdy je třeba, aby probíhala více než jedna reakce, přičemž jednotlivé reakce buď probíhají pouze, nebo optimálně za různých reakčních podmínek nebo v různém prostředí například při různých úrovních pH. Když se v takovém systému použije prostředků, u kterých se udržují reakční parametry pro jednu z těchto reakcí, například když se udržuje pH v určitém specificky vymezeném rozmezí, má to za následek, že jedna nebo více reakcí probíhá v systému za podmínek, které nejsou optimální.

Systémy, u kterých se provádí více reakcí za jednoho souboru reakčních parametrů mají další nevýhodu v tom, že v nich nelze použít určitých reakčních složek vykazujících nejlepší informační hodnotu, poněvadž tyto složky nejsou akceschopné za reakčních podmínek vyžadovaných jinou reakcí probíhající v systému.

I když tyto známé jednofázové systémy uspokojovaly velkou potřebu, chemické metodologie, kde byly aplikovatelné, byly ve svém rozsahu omezeny. Značné oblasti analýzy nebylo až dosud možno provádět pomocí běžných zkušebních systémů vzhledem k omezením vyplývajícím z udržování reakčních podmínek v jednom poměrně úz-

kém rozmezí. Z oblastí analýzy, ve kterých nebylo možno uplatnit známé zkušební systémy, lze uvést široký rozsah analytických metod zahrnujících několikastupňové reakce, které probíhají buď pouze, nebo optimálně za různých reakčních parametrů, například různém pH, iontové síle, v přítomnosti jiných reakčních činidel apod. Z jiných vlivů znemožňujících použití běžných zkušebních systémů lze uvést přítomnost interferujících látek, které je nutno inaktivovat, aby se dosáhlo spolehlivého stanovení analyzovaných látek a dále opožděné přidání některé ze složek, která je buď nestálá nebo má za určitých podmínek škodlivý účinek.

Uvedený vynález se týká způsobu stanovení látky ve vzorku v několika reakčních systémech, z nichž se každý uplatňuje za odlišných reakčních parametrů. Podstatou vynálezu je, že se vzorek uvede do styku s několikasytémovým zkušebním prostředkem, který obsahuje několik složek spojených s alespoň dvěma reakčními systémy fungujícími za odlišných reakčních parametrů, přičemž alespoň jedna z uvedených složek způsobuje odezvu v přítomnosti stanovované látky a alespoň jedna další z uvedených složek způsobuje při styku se vzorkem za reakčních parametrů, při kterých se uplatňuje první z uvedených reakčních parametrů na parametry, při kterých se uplatňuje alespoň jeden z jiných uvedených reakčních systémů, přičemž uvedený několikasytémový zkušební prostředek je popřípadě kombinován s nosičem, a pak se sleduje detegovatelná reakce.

Použitý, několikasytémový zkušební prostředek obsahuje alespoň jednu složku reagující s analyzovanou složkou a alespoň jednu další složku, která mění reakční parametry.

Způsobu podle vynálezu lze použít při analytických metodách, které vyžadují intermedieární změnu reakčních parametrů pomocí jedné operace.

Výhodou způsobu podle vynálezu je, že ho lze použít i v těch případech, kdy běžné zkušební systémy selhávají v důsledku přítomnosti látek, které ruší detekci hledané složky nebo v důsledku nestálosti používaných reakčních činidel v prostředí, ve kterém se stanovení provádí.

Zkušební prostředek použitý podle vynálezu může obsahovat více než jednu složku způsobující odezvu na stanovovanou látku. Složkou způsobující odezvu na stanovovanou látku může být s výhodou barevný indikátor, antigen, protilátka, enzym nebo jiná specifická vazebná složka apod. Ze změn parametrů, které se za použití způsobu podle vynálezu provádějí, se dává obzvláštní přednost modifikaci pH, modifikaci iontové síly, upravování, obsahu některých látek, například odstraňování interferujících látek a modifikaci reakční rychlosti.

Ve výhodném provedení obsahuje několi-

kasystémový zkušební prostředek více složek spojených s alespoň dvěma reakčními systémy fungujícími za odlišných prvních a druhých reakčních parametrů, přičemž alespoň jedna z uvedených složek způsobuje odezvu v přítomnosti stanovové látky v prvním reakčním systému za uvedených prvních reakčních parametrů a alespoň jedna z jiných uvedených složek způsobuje po styku se vzorkem změnu reakčních parametrů na druhé reakční parametry, za kterých se uplatňuje druhý reakční systém.

Podle dalšího výhodného způsobu provedení je v několikasytémovém zkušebním prostředku použitém podle vynálezu alespoň jedna z uvedených složek způsobujících změnu reakčních parametrů enkapsulována (zapouzdřena) tak, aby byla při styku se vzorkem uvolnitelná a způsobila po svém uvolnění vytvoření uvedených druhých reakčních parametrů, za kterých se uplatňuje uvedený druhý reakční systém. Pro zapouzdřování se přednostně používá mikrokapslí, které se vyrábějí běžnou zpouzdřovací technikou, Mikrokapsle obsahují složku způsobující změnu reakčních parametrů. Mikrokapsle jsou přednostně osmosensitivní a tím se umožňuje uvolnění jejich obsahu. Mohou být rovněž vytvořeny z látky, která je rozpustná v roztoku vzorku. Kromě složky měnící reakční parametry, mohou být rovněž zapouzdřeny jiné složky, jako složky, které optimálně reagují za reakčních parametrů druhého reakčního systému.

Podle dalšího výhodného provedení způsobu podle vynálezu se používá několikasytémového zkušebního prostředku, ve kterém alespoň jedna složka způsobující změnu uvedených reakčních parametrů sestává alespoň ze dvou komponent, které spolu po styku se vzorkem vzájemně reagují za vzniku uvedených druhých reakčních parametrů, za kterých se uplatňuje druhý systém. Vzájemně reagujícími složkami jsou přednostně katalyzátor, jako enzym a jeho substrát. Jedna nebo obě ze vzájemně reagujících komponent mohou být popřípadě zapouzdřeny v mikrokapslích.

Podle ještě dalšího výhodného provedení vynálezu obsahuje několikasytémový zkušební prostředek více složek spojených s alespoň dvěma reakčními systémy, které fungují za odlišných reakčních parametrů, přičemž alespoň jedna z uvedených složek způsobuje odezvu v přítomnosti stanovované látky ve druhém nebo dalším reakčním systému a alespoň jedna další z uvedených složek deaktivuje v prvním reakčním systému látku obsaženou ve vzorku, která interferuje se složkou způsobující odezvu na stanovovanou látku. Složka způsobující odezvu na stanovovanou látku je přednostně zapouzdřena nebo jinak odloučena, aby došlo k jejímu uvolnění po reakci složky deaktivující interferující látku. Může se po-

užit ochranného navázání této látky na určená místa nebo jiných dobře známých technik.

Několikasystémový zkušební prostředek používaný při způsobu podle vynálezu lze upravit pokud se týče jeho složek tak, aby se hodil pro kterékoli ze shora uvedených provedení. Může být rovněž zapracován do nosiče, jako je nasákavá nebo nenasákavá matrice nebo smíšen s pojivý za vzniku aplikačních forem, jako jsou zkušební papírky indikující po navlhčení vzorkem zkoušenou složkou nebo tablety.

Podle jedné alternativy se může aplikační forma připravit tak, že se do nosné matrice současnou nebo postupnou impregnací zavede alespoň jedna složka způsobující odezvu na zkoušenou látku ve vzorku v alespoň jednom reakčním systému spolu se složkami způsobujícími změnu reakčních parametrů. Když se nosná matrice impregnuje kapalným roztokem, po této operaci se vysuší. Když se pro zapouzdření složek použije mikrokapslí, provádí se zapouzdřování obvykle předem a nezávisle na jejich zavedení do nosné matrice. Ať již mikrokapsle obsahují složky způsobující odezvu na zkoušenou látku nebo složky účinné pro změnu reakčních parametrů, přednostně se zavádějí do matrice po zavedení ostatních složek. Mikrokapsle lze impregnací zavést dovnitř nosné matrice, navrstvit na matrici nebo soustředit ve středu aplikační formy. Aplikační forma může být spojena s podložkou, jako například s částí umožňující uchopení, z organické plastické hmoty.

Podle jiného provedení může mít aplikační forma podobu tablety. Může se použít jakékoli běžného způsobu výroby tablet, jako například lisování. Pro dosažení tvarové stálosti a celistvosti před použitím se může použít pojiv, zejména takových pojiv, která se rozpadnou nebo rozpustí při styku s rozpouštědlem kapalného zkušebního vzorku.

Pro zkoušení kapalných vzorků, při kterém se vzorek uvádí do styku se zkušebním prostředkem lze použít několikasystémových zkušebních prostředků, které neobsahují matrice, tabletovací činidla ani jiné nosiče. Odezva na určovanou látku obsaženou ve vzorku je zprostředkována tvorbou chromoforického (barevného komplexu, oxidačně redukční reakcí, tvorbou komplexu antigen-protilátka nebo enzym-substrát nebo jinou detegovatelnou změnou.

Několikasystémového zkušebního prostředku se s ohledem na účelnost a spolehlivost stanovení přednostně používá ve formě pevného přípravku, jako aplikační formy. Aplikační forma se ponoří do vzorku nebo jinak uvede do styku se skoušeným kapalným vzorkem. Alespoň jedna ze složek zavedená do nosné matrice nebo impregnovaná v nosné matrici reaguje se stanovenou látkou nebo v její přítomnosti způsobuje jinak odezvu. Alespoň jedna další z uvedených složek

způsobuje při styku se vzorkem ze reakčních parametrů, za kterých funguje první reakční systém, změnu těchto reakčních parametrů na parametry, za kterých funguje alespoň jeden další reakční systém. K odezvě na stanovovanou látku může dojít za reakčních podmínek nebo parametrů existujících v době styku aplikační formy a zkoušeného vzorku nebo až v pozdějším reakčním systému po předchozí změně reakčních parametrů.

Aktivace složky způsobující změnu reakčních parametrů může zahrnovat například uvolnění zapouzdřených složek nebo interakci katalyzátoru, jako enzymu s jeho substrátem. Katalyzátor a substrát mohou spolu tedy reagovat před odezvou způsobenou složkou způsobující odezvu na zkoušenou látku, během této odezvy nebo po ní. Interakce mezi enzymem a substrátem může začít i před detekcí stanovované látky tak, aby došlo ke změně parametrů po detekci, v tomto případě však musí být vzájemný poměr enzymu a substrátu takový, aby nedošlo ke změně reakčních parametrů před uplynutím předem určené zpoždovací periody.

Zapouzdření zajišťuje odložené uvolnění složky způsobující změnu reakčních podmínek nebo složky způsobující odezvu na stanovovanou látku. Po předem určené zpoždovací periodě vstoupí rozpouštědlo obsažené ve vzorku v důsledku osmotické hnačící síly stěnou kapsle dovnitř. Dojde k osmotickému gradientu, který postačuje pro uvolnění obsahu kapsle.

Rychlost a stupeň uvolnění obsahu kapsle je závislá na počátečním osmotickém gradientu a na vlastnostech shtěny kapsle.

Vzorek se prohlédne poté, co se uplatní reakční systémy uložené v aplikační formě. Kromě vizuálního porovnání lze použít pro vyhodnocení odezvy různých instrumentálních metod. Tím se zvýší přesnost zkoušky, poněvadž se odstraní subjektivní určení zbarvení lidským okem.

V následujícím popisu se pro větší jasnost používá specifických termínů, tyto termíny se však vztahují pouze ke zvláštním provedením vynálezu zvoleným pro ilustrativní účely a nedefinuje se nebo neomezuje se jimi rozsah vynálezu.

Termínem nosná matrice se rozumí nasákavá nebo nenasákavá matrice, která je nerozpustná ve vzorku a která si udržuje tvarovou stálost a soudržnost po vystavení fyziologickým a jiným kapalinám. Vhodnými nasákavými matricemi, kterých lze použít, jsou papír, celulóza, dřevo, rouna ze syntetických pryskyřic, skleněná vlákna, netkané a tkané látky apod.

Jako příklad nenasákavých matric lze uvést organické plastické hmoty, jako polypropylen. Matrice může být účelně připojena k nerozpustné podložce, například z polystyrenu.

Alternativně může být inertní nosič zpracován do formy ražené nebo lisované tablety obsahující běžné látky jako disintegrační činidla, jako karboxymethylcelulóza nebo škrob, plniva, jako laktózu nebo fosfáty a mazadla, jako mastek, kyselinu stearovou nebo parafin.

Mikrokapsle, kterých lze použít podle vynálezu, lze připravit řadou dobře známých způsobů, jako jsou způsoby popsané v Greyson, U. S. patent č. 4 015 462; Angew. Chem. Internat. Edit. 14:539 (1975) a Adams, U. S. patent č. 3 092 463. Tyto metody zahrnují chemické zpouzdřovací techniky, jako je polykondenzace nebo koacervace na fázovém rozhraní nebo fyzikálně mechanické způsoby, jako je odstředování nebo sprejové sušení. Přednostně se používá technik zahrnujících polykondenzaci na fázovém rozhraní, separaci fází a polymeraci, protože se jimi mikrokapsle snadno vyrobí. Pod termínem osmosensitivita se rozumí schopnost stěn kapslí reagovat na vnitřní hydrostatický tlak změnou fyzikálních vlastností umožňující uvolnění zapouzdřené fáze.

Aktivita enzymatických přípravků použitých v příkladech je vyjadřována v počtech jednotek aktivity na miligram sušiny. Mezinárodní jednotka (m. j.) aktivity enzymu byla definována komisí pro enzymy mezinárodního svazu pro biochemii (Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry), jako mikromol (μmol) substrátu využitého za minutu za specifických podmínek pH a regulace teploty. Pokud není uvedeno jinak používá se takto definované jednotky.

Následující příklady mají pouze ilustrativní charakter, ale rozsah vynálezu v žádném směru neomezují. Odborník může podle potřeby provést řadu změn, variací a modifikací jednotlivých složek a parametrů, aniž by vybočil z rozsahu vynálezu.

Příklady I a II

Při detekci dusitanů jednofázovou zkušební aplikační formou musí probíhat diazotizace aromatického aminu při nízkém pH a diazotovaný amin se pak musí kopulovat s další látkou při stejném nízkém pH. To omezuje kopulační složky, kterých lze použít, na poměrně malý počet aromatických aminů a jejich derivátů.

Když však zkouška začne při kyselém pH a pak se reakční prostředí zalkalizuje, rozšíří se tím značně počet použitelných kopulačních složek. V takovém případě lze například použít fenolů a naftolů. Takovou zkoušku lze však provést v jedné zkušební operaci jen za použití aplikační formy podle vynálezu. Následují srovnávací ilustrativní zkoušky.

I.a.) Připraví se impregnační roztok o pH asi 2 v 75 ml methanolu smícháním následujících složek:

1. 0,13 g p-arsanilové kyseliny (aromatický amin)
2. 3,0 g malonové kyseliny
3. 25 ml 2,0% roztoku hydrolyzovaného Gantrez AN 139 [poly(malein-hydridmethylvinylether)]
4. 0,75 g laurylsulfátu sodného
5. 0,3 g dvojsodné soli 1-naftol-3,6-disulfonové kyseliny (kopulační složka)

Uvedeným impregnačním roztokem se napustí listy filtračního papíru Whatman č. 17 o rozměrech 10×10 cm až do nasycení, a pak se listy 10 minut suší při 95 °C a rozřežou na kousky 1×1 cm.

b) Další jednofázová zkušební aplikační forma se připraví přesně tak, jako v případě a), s tím rozdílem, že pH impregnačního roztoku se nastaví na asi 6 přidáním 15 ml 2 M citrátového pufru k roztoku vypuštěním kyseliny malonové.

c) Několikasystémová zkušební forma podle vynálezu se připraví takto. Listy papíru Whatman 10×10 cm se shora uvedeným způsobem nasatí impregnačním roztokem Ia) a vysuší. Pak se povlečou monovrstvou polyamidových mikrokapslí 70–80 mesh, vyrobených zapouzdřením vodného roztoku obsahujícího 13,2 g hydroxidu sodného ve 100 ml vody, a vysuší.

Zkušební formy (aplikační formy zkušebního prostředku) vyrobené podle postupů a), b) a c) se pak zkouší tak, že se aplikují 3 kapky vzorku na plochu 1×1 cm zkušební formy. Vzorek obsahuje 10 mg dusitanu sodného ve 100 ml destilované vody. Výsledky se zajišťují po 3 minutách. Zkušební formy vyrobené podle a) a b) nedetegují dusitan v koncentraci 10 mg/100 ml, zatímco forma c) ihned ukáže pozitivní reakci tím, že se její barva změní na jasně oranžovou.

Kompozice podle vynálezu se vyrobí smícháním 0,13 g p-arsanilové kyseliny, 3,0 g malonové kyseliny a 0,3 g dvojsodné soli 1-naftol-3,6-disulfonové kyseliny přímo s polyamidovými kapslemi popsány v Ia. Poměr zapouzdřených a nezapouzdřených složek se může měnit podle požadované rychlosti a rozsahu změny pH. Přednostně se používá asi 10,0 g mikrokapslí.

Takto vyrobená kompozice se zkouší tím, že se uvede do styku se 3 kapkami shora popsaného vzorku ve 2 ml vzorkovnici pro kapkové zkoušky. Kompozice podle vynálezu ihned deteguje dusitan, což je zřejmé z barevné změny.

II. Při tomto pokuse se vyrobí jednofázová zkušební forma a) a b) přesně podle postupů popsanych v příkladech Ia a Ib.

c) Několikafázová zkušební forma podle vynálezu se připraví takto: List papíru Whatman o velikosti 10×10 cm se napustí až do nasycení roztokem připraveným podle Ia s tím rozdílem, že se vypustí dvojsodná sůl kyseliny 1-naftol-3,6-disulfonové a pak se,

jak bylo dříve popsáno, vysuší. Vzniklé listy se pak povlečou monovrstvou polyamidových kapslí 70—80 mesh vyrobených zapouzdřením vodného roztoku obsahujícího 3,3 % dvojsodné soli kyseliny 1-naftol-3,6-disulfonové a 13,2 g/100 ml vodného hydroxidu sodného, a vysuší.

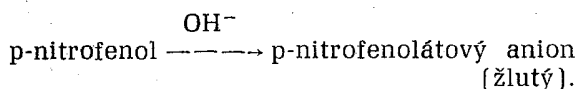
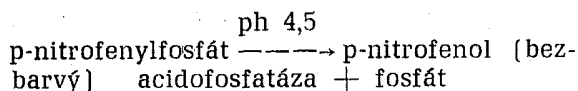
Zkušební formy vyrobené podle příkladů IIa, b a c se zkouší aplikací 3 kapek vzorku na plochu 1×1 cm. Vzorek obsahuje 10 mg/100 ml NaNO₂ v destilované vodě. Výsledky se zjišťují po 3 minutách. Zkušební formy vyrobené podle a) a b) nedetegují dusitan v množství 10 mg/100 ml, zatímco forma c) ihned vykazuje pozitivní reakci tím, že se zbarví jasně oranžově.

V obou těchto příkladech může při stálém nízkém pH probíhat diazotace, ale ne kopulace. Při stálém vysokém pH může probíhat kopulace, ale ne diazotace. Pouze v tom případě, že je na počátku pH nízké, pro diazotaci, a pak vysoké, pro kopulaci, deteguje zkušební forma dusitany.

Příklady III až V

Při analýzách acidofosfatázy prováděných při patologických stavech, jako při metastatickém karcinomu prostaty se musí hydrolytický účinek enzymu studovat při pH 4,5, zatímco nejvhodnější substráty nelze sledovat při jiném, než při alkalickém pH. To velmi omezuje počet substrátů, které lze takto detegovat.

III. Uvedený fakt je ilustrován na jednom zkušebním systému:



V jedné zkušební operaci lze tuto zkoušku provést jen za použití zkušební formy podle vynálezu, což ukazují srovnávací zkoušky se třemi zkušebními papírkami.

a) Jednofázová zkušební forma se připraví takto: List filtračního papíru Eaton-Dikeman 204 (E&D) 10×10 cm se nejprve napustí do nasycení ve 25 ml 0,02 M pufru z citranu sodného (pH 5,0) a pak vysuší při 60 °C. Pak se napustí ve 20 ml methanolickeho roztoku obsahujícího 0,3 g sodné soli p-nitrofenylfosfátu a vysuší při 60 °C. Napuštěné listy se nařežou na zkušební formy-papírky o rozměrech 1×1 cm.

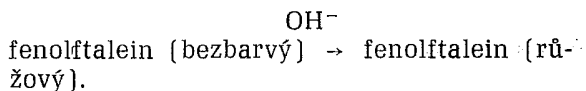
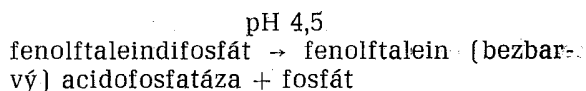
b) Při přípravě několikafázové zkušební formy podle vynálezu se nejprve provedou dvě stejné impregnace, jako v příkladě IIa. Pak se list povleče monovrstvou polyamidových mikrokapslí 70—80 mesh, připravených zapouzdřením vodného roztoku obsahujícího 13,2 g hydroxidu sodného ve 100 ml vo-

dy a vysuší. Listy se pak nařežou na zkušební papírky.

c) Ve třetím případě se stejný filtrační papír nejprve napustí do nasycení 0,1 M tris(hydroxymethyl)aminomethanovým pufrům [TRIS-pufr] o pH 8 a pak vysuší při 60 °C. Druhá impregnace je stejná jako v příkladě IIIa. Napuštěné listy se pak rozřežou na zkušební formy — papírky.

Připravené zkušební papírky se pak zkouší tím, že se na ně aplikují 2 kapky roztoku 10 mg/ml (20 jednotek/mg) acidofosfatázy z pšeničných klíčků ve 0,02 M citrátovém pufru. Uvedená jednotka enzymu je definována jako množství enzymu katalyzující uvolnění 1 μmolu nitrofenolu za hodinu při pH 4,8 a 37 °C. Hodnocení vzorků se provádí po 5 minutách. Papírky a) a b) se nezbarví, zatímco papírek b) zežloutne. To ukazuje, že při pH dojde k hydrolyze, ale p-nitrofenol zůstává bezbarvý (papírek a). Při pH 8,0 nedojde k hydrolyze (papírek c). Pouze v tom případě, že je na počátku pH nízké, aby se umožnila hydrolyza a pak vysoké, aby se vyvinulo zbarvení, dojde ke zbarvení papírku, což indikuje přítomnost acidofosfatázy.

IV. Jiný systém pro detekci acidofosfatázy pracuje podle následujícího reakčního schématu:



Při tomto pokusu se připraví stejným způsobem, jako podle příkladů III a, b a c jednofázová a vícefázová zkušební forma pouze s tím rozdílem, že se p-nitrofenylfosfát nahradí fenolftaleindifosfátem.

Zkušební formy vyrobené podle IVa, IVb a IVc se zkouší jako v příkladě III. Zkušební formy připravené podle a a c nedetegují acidofosfatázu, zatímco vícesystémová zkušební forma ihned vykazuje pozitivní reakci, což je zřejmé ze zružování papírku.

V. Analýza na acidofosfatázu se může též provést v jedné zkušební operaci za použití zkušební formy připravené podle jiné alternativy vynálezu, při které se nevyužívá mikroenkapsulace. Postup je osvětlen na srovnávacím zkoušení následujících tří zkušebních forem.

a) Jednofázová zkušební forma se připraví takto:

List E&D filtračního papíru o rozměrech 10,16 × 10,16 cm se nejprve napustí do nasycení ve 25 ml 0,02 M citrátového pufru (pH 5) a pak se vysuší při 60 °C. Pak se nasýtlí ve 20 ml roztoku methanolu obsahujícího 0,3 g sodné soli p-nitrofenylfosfátu,

vysuší při 60 °C a nastříká na zkušební papírky 1 × 1 cm.

b) Několikafázová zkušební forma podle vynálezu se připraví takto: List E&D papírku 10,16 × 10,16 cm se nasytí ve 20 ml 0,02 M citrátovém pufru o pH 5,0, obsahujícím ureázu [2000 mezinárodních jednotek (m. j.)/ml] a vysuší při 60 °C. Mezinárodní jednotka je definována jako počet μ molů amoniaku vytvořeného za minutu. Pak se list napustí ve 20 ml methanolu obsahujícího 0,3 g sodné soli p-nitrofenylfosfátu a 3,0 g močoviny, vysuší při 60 °C a stejně jako ve shora uvedeném případě nastříká na zkušební papírky.

c) Ve třetím případě se nejprve E&D papír napustí do nasycení 0,01 M TRIS-pufrem o pH 8,0 a pak vysuší při 60 °C. Druhá lázeň je stejná jako v případě a).

Zkušební formy, které se takto získají, se zkouší jako v příkladech III a IV. Zkušební formy a) a c) nedávají žádné zbarvení, zatímco zkušební forma b) zežloutne.

Roztok citrátového pufru obsahující ureázu a roztok močoviny se lyofilizují a směsí aniž se mísí s nosičem. Když se tato kompozice uvede do styku se zkušebním vzorkem dojde k barevné změně do žluta. Barevná změna je stejná jako v případě zkušební formy podle příkladu V.

V těchto příkladech dojde ke vzniku zbarvení indikujícího acidofosfatázu jen v tom případě, když je pH nejprve nízké, aby se umožnila hydrolýza a pak vysoké, aby se vyvinulo zbarvení.

Příklady VI a VII

Vyrobí se zkušební formy podle vynálezu pro analýzu β -glukuronidázy následujícím způsobem:

VI. Několikafázová zkušební forma podle vynálezu se připraví podle tohoto reakčního schématu:

pH 4,8

p-nitrofenyl- β -glukuronid \rightarrow p-nitrofenol- β -glukuronidáza + glukuronát

OH⁻

p-nitrofenol \rightarrow p-nitrofenolát (žlutý).

List papíru Whatman 10 × 10 cm se napustí do nasycení ve 20 ml roztoku 60 mg p-nitrofenyl- β -glukuronidu rozpuštěného ve 20 ml vody a vysuší během 10 minut při 60 °C. Pak se list povleče monovrstvou polyamidových mikrokapslí (70–80 mesh) připravených zapouzdřením vodného roztoku obsahujícího 13,2 g/100 ml NaOH a vysuší. Takto vyrobené listy se nastříkají na zkušební formy o rozměrech 1 × 1 cm.

Takto připravené zkušební formy se zkouší tak, že se ponoří do 1 ml 0,1 M acétátového pufru o pH 4,8 obsahujícího 4 mg/100 ml β -glukuronidázy (0,25 m. j./mg) o teplotě 40 °C a pak se 5 minut sledují. Bě-

hem této doby jsou umístěny na bloku vyhříváném na 37 °C. Mezinárodní jednotka β -glukuronidázy je definována reakcí s fenolftalein- β -glukuronidem. Zkušební formy detegují přítomnost β -glukuronidázy, což je zřejmé ze žlutého zbarvení.

VII. Připraví se další vícefázová zkušební forma podle vynálezu stejným způsobem jako podle příkladu VI s tím rozdílem, že se papír napustí 20 ml roztoku 100 mg fenolftalein- β -glukuronidu ve 20 ml destilované vody. Systém pracuje podle tohoto reakčního schématu.

pH 4,8

fenolftalein- β -glukuronid \rightarrow fenolftalein (bezbarvý) p-glukuronidáza + glukuronát

OH⁻

bezbarvý fenolftalein \rightarrow fenolftalein (růžový).

Takto připravené formy vykazují při testování podle příkladu VI přítomnost β -glukuronidázy, což je zřejmé z růžového zbarvení.

Příklad VIII

Určité detekční systémy, jako například systémy pro detekci hemoglobinu v moči jsou citlivé na přítomnost interferujících látek, jako jsou askorbáty. Silná činidla odstraňující interferující látky, jako je askorbát oxidáza jsou však inaktivovány reakčními činidly detegujícími hemoglobin.

Nyní za použití vynálezu může askorbát oxidáza odstranit interferující askorbáty v prvním reakčním systému, poněvadž reakční činidla detegující hemoglobin jsou oddělena od askorbát oxidázy zapouzdřením. Dojde pak k opožděnému uvolnění činidel detegujících hemoglobin, což umožňuje neinhibovanou detekci hemoglobinu ve druhém reakčním systému. Následující příklad slouží k ilustraci tohoto provedení vynálezu.

List E&D papíru 10 × 10 cm se ponoří do 20 ml 0,1 M fosfátového pufru o pH 7 obsahujícího 2 mg askorbát oxidázy (500 m. j./mg) a usuší v sušárně při 60 °C. Pak se list povleče ve 20 ml suspenze mikrokapslí (37 až 200 μ m) vyrobených z acetobutyraťu celulózy, která obsahuje 0,35 g kumenhydroperoxidu, 1,35 g triethanolaminborátu, 0,08 g tolidinhydrochloridu a 0,08 g 6-methoxychinolinu. Papír se pak laminuje na proužky polystyrenu pomocí dvoustranné lepicí pásky.

Získané zkušební formy po ponoření do moči obsahující 0,03 mg/100 ml hemoglobinu a 50 mg/100 ml askorbátů zmodrají, což indikuje přítomnost hemoglobinu. Stejně formy obsahující stejné složky, které však byly napuštěny z jednoho homogenního roztoku obsahujícího všechny složky, nedetegují hemoglobin. V tomto případě je totiž

askorbát oxidáza desaktivována detekčními složkami a detekce hemoglobinu je zne-možněna přítomností 50 mg/100 ml askorbá-tu.

Vynález byl sice objasněn na konkrétních

příkladech, je však zřejmé, že příklady mají pouze ilustrativní charakter a že lze pro-vést řadu změn v kombinacích a uspořá-dání prvků, přičemž všechny tyto modifika-ce spadají do rozsahu vynálezu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob stanovení látky ve vzorku v několika reakčních systémech, z nichž se každý uplatňuje za odlišných reakčních pa-rametrů, vyznačující se tím, že se vzorek uvede do styku s několikasystémovým zku-šebním prostředkem, který obsahuje něko-lik složek spojených s alespoň dvěma re-akčními systémy fungujícími za odlišných reakčních parametrů, přičemž alespoň jed- na z uvedených složek způsobuje odezvu v přítomnosti stanovované látky a alespoň jedna další z uvedených složek způsobuje při styku se vzorkem za reakčních para-metrů, při kterých se uplatňuje první z uve- dených reakčních systémů, změnu těchto reakčních parametrů na parametry, při kte- rých se uplatňuje alespoň jeden z jiných uvedených reakčních systémů, přičemž uve- dený několikasystémový zkušební prostře- dek je popřípadě kombinován s nosičem, a pak se sleduje detegovatelná reakce.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se použije několikasystémového zku-šebního prostředku, ve kterém složkou způ- sobující odezvu na stanovovanou látku je chromogenní indikátor.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se použije několikasystémového zku-šebního prostředku, ve kterém složkou způ- sobující odezvu na stanovovanou látku je specifická vazebná reakční složka pro sta- novovanou látku.

4. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se použije několikasystémového zku-šebního prostředku, ve kterém alespoň jed- na složka způsobující změnu reakčních pa-rametrů způsobuje změnu pH prvního re- akčního systému na parametry, za kterých funguje alespoň jeden jiný reakční systém.

5. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se použije několikasystémového zku-šebního prostředku, ve kterém alespoň jed- na složka způsobující změnu reakčních pa-rametrů způsobuje desaktivaci látky, která interferuje se složkou způsobující odezvu v přítomnosti stanovované látky.

6. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se použije několikasystémového zku-šebního prostředku, ve kterém alespoň jed- na z uvedených složek způsobuje odezvu v přítomnosti stanovované látky v prvním re- akčním systému za uvedených prvních re-

akčních parametrů a alespoň jedna z jiných uvedených složek způsobuje po styku se vzorkem změnu reakčních parametrů na druhé reakční parametry, za kterých se uplatňuje druhý reakční systém.

7. Způsob podle bodu 6, vyznačující se tím, že se použije několikasystémového zku-šebního prostředku, ve kterém alespoň jed- na z uvedených složek způsobujících změnu reakčních parametrů je zapouzdřena v kaps- li, takže je uvolnitelná při styku se vzorkem a po svém uvolnění způsobí vytvoření dru- hých reakčních parametrů.

8. Způsob podle bodu 7, vyznačující se tím, že kapsle je osmosenzitivní.

9. Způsob podle bodu 6, vyznačující se tím, že se použije několikasystémového zku-šebního prostředku, ve kterém alespoň jed- na složka způsobující změnu uvedených re- akčních parametrů sestává z alespoň dvou komponent, které spolu po styku se vzor- kem vzájemně reagují za vzniku uvedených druhých reakčních parametrů, za kterých se uplatňuje druhý reakční systém.

10. Způsob podle bodu 9, vyznačující se tím, že se použije několikasystémového zku-šebního prostředku, ve kterém vzájemně reagujícími složkami jsou specifické re- akční složky, které se navzájem vážou.

11. Způsob podle bodu 10, vyznačující se tím, že se použije několikasystémového zku-šebního prostředku, ve kterém specifický- mi vazebnými složkami jsou enzym a jeho substrát.

12. Způsob podle bodu 10, vyznačující se tím, že se použije několikasystémového zkušebního prostředku, ve kterém alespoň jedna z uvedených složek způsobujících odezvu způsobuje odezvu v přítomnosti sta- novované látky ve druhém nebo dalším re- akčním systému a alespoň jedna další z uvedených složek desaktivuje v prvním re- akčním systému látku obsaženou ve vzorku, která interferuje se složkou způsobující ode- zvu na stanovovanou látku.

13. Způsob podle bodu 12, vyznačující se tím, že se použije několikasystémového zku-šebního prostředku, ve kterém složka způ- sobující odezvu na stanovovanou látku je zapouzdřena v kapsli, aby se uvolnila po reakci složky desaktivující interferující lát- ka.