



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

219888  
(11) (B2)

[51] Int. Cl.<sup>3</sup>  
G 01 N 33/50

(22) Přihlášeno 30 01 78  
(21) [PV 622-78]

(32) [31] [33] Právo přednosti od 14 03 77  
[777001, 777002 a 777005]  
Spojené státy americké

(40) Zveřejněno 30 07 82

(45) Vydáno 15 09 85

[72]

Autor vynálezu

TAK WAI LAM CHARLES, ELKHART (Sp. st. a.)

[73]

Majitel patentu

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

(54) Zkušební prostředek pro stanovení přítomnosti peroxidačně účinných látek

1

Vynález se týká zkušebního prostředku pro stanovení přítomnosti peroxidačně působících látek ve zkoušeném vzorku. Vynález se týká zejména zkušebních prostředků pro kvalitativní a semikvantitativní analýzu vzorku se složkami s peroxidačním působením, jako je hemoglobin, utajená krev a peroxidázy.

V současné době jsou dostupné četné analytické metody k detegování přítomnosti peroxidačně účinných látek, například ve vzorcích moče, fekálních suspenzí a gastrointestinálních obsahů. Hemoglobin a jeho deriváty představují takové typické „peroxidačně účinné“ látky, protože jejich chování je blízké chování enzymu peroxidázy. Takové látky bývají rovněž označovány jako pseudoperoxidázy. Peroxidačně účinné látky jsou podobné enzymům tím, že katalyzují redox reakci mezi peroxidy a benzidinem, o-tolidinem, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinem, 2,7-diaminofluorenem nebo podobnými indikátory, čímž vytvářejí detegovatelnou reakci, například změnu zbarvení. Většina metod stanovení přítomnosti okultní krve ve zkoumaných vzorcích se tudíž týká této pseudoperoxidázové aktivity.

Během času byly vyvinuty různé metody, který se týkají katalýzy peroxidační oxidace, jež je podobná enzymové katalýze indi-

2

kátorů vytvářejících zbarvení. Tyto metody zahrnují především mokré chemické postupy a proužky, které nesou reagenční činidlo typu „ponoření a hodnocení“. Typický příklad dřívějšího stavu techniky je uveden Richardem M. Henrym se spol. v práci *Clinical Chemistry Principles and Techniques* (Hagerstown, Maryland: Harper and Row, 1974), str. 1124 až 1125. Tento způsob zahrnuje použití koncentrované kyseliny octové (pufr), difenylaminu (indikátor) a peroxidu vodíku. I když tyto mokré metody vykazaly analytickou použitelnost, jsou nicméně zatíženy zřejmými nedostatky, z nichž ne nejmenší je špatná stálost reagenčního činidla a nedostatečná citlivost. Takovým reagenčním roztokům je vlastní tak rychlý pokles stálosti (tedy citlivosti), že po několika dnech skladování musí být připravována čerstvá reagenční činidla, což je nutnost, jejímž výsledkem je zbytečná ztráta času u analytického personálu a nízká ekonomičnost, protože se plýtvá drahými reagenčními činidly.

Druhá metoda stanovení peroxidačně účinných látek, a která je jednou z metod v současné době preferovaných klinickými chemiky a analytiky, spočívá v používání reagenčních papírků typu „ponoření a hodnocení“. Takovou typickou pomůckou je

reagenční papírek vyráběný firmou Ames Company Division of Miles Laboratories, Inc. a je prodáván pod názvem HEMASTIX<sup>(R)</sup>. Tento reagenční papírek obsahuje v podstatě porézní papírový materiál upevněný na proužku nebo na držátku z plastické hmoty. Papír je impregnován pufrovanou směsí organického peroxidu a o-tolidinu. Po ponoření do tekutiny, obsahující hemoglobin, myoglobin, erythrocyty nebo jiné pseudoperoxidázy, vzniká na papíru modré zbarvení, jehož intenzita je úměrná koncentraci peroxidačně účinné látky ve vzorku. Porovnáním zbarvení vzniklého na reagenčním proužku se standardním barevným papírem, může zkoušející pracovník stanovit (na semikvantitativní bázi) množství neznámé látky přítomné ve vzorku.

Výhody reagenčních papírků před mokřými chemickými metodami jsou tudíž převážně dvojího druhu: papírky se snadněji používá, protože není nutná ani příprava reagenčních činidel ani obsluha zařízení a dosahuje se větší stability reagenčních činidel, z čehož vyplývá větší přesnost, citlivost a hospodárnost.

Přes výhody, které mají papírky před mokřými chemickými metodami, vyžadují vlastnosti stability a citlivosti nicméně dalšího zlepšení. I když tyto vlastnosti v současném stavu techniky papírků pro stanovení pseudoperoxidáz značně převyšují vlastnosti mokřých chemických metod. V oboru by nicméně došlo k velkému pokroku, kdyby takové papírky mohl být vyrobeny ještě stálejší při skladování a citlivější k peroxidačně účinným látkám. Výzkumná činnost, jejímž výsledkem je tento vynález, byla zaměřena k dosažení tohoto zdokonalení.

Z dosavadního stavu techniky jsou známy nejméně tři pokusy o dosažení výše uvedených cílů. Odkaz v Chemical Abstracts, sv. 85, str. 186 [1976] popisuje metodu s dvojitým ponořováním pro přípravu reagenčních papírků obsahujících o-tolidin a fenylisopropylperoxid. Při této metodě se připravuje roztok indikátoru (dihydrochloridu a toolidinu) a polyvinylpyrrolidonu v ethanolu. K tomuto roztoku se přidává malé množství povrchově aktivní látky a dostatečné množství citrátového pufru, aby se dosáhlo hodnoty pH 3,7. Filtrační papíry impregnované ethylcelulózou byly ponořeny do tohoto roztoku a usušeny. Takto impregnovaný filtrační papír byl potom ponořen do druhého roztoku, obsahujícího 1,4-diazabicyklo[2,2,2]oktan, fenylisopropylperoxid a polyvinylpyrrolidon, rozpuštěné ve směsi ethanol-toluenu. Smyslem tohoto pokusu bylo stabilizovat kombinaci peroxidu a indikátoru použitím bicyklového oktanového derivátu a polyvinylpyrrolidonu.

Další takový způsob je uveřejněn v americkém patentovém spise č. 3 853 471. Tento patentový spis popisuje použití amidů kyseliny fosforečné nebo kyseliny fosfonové, ve

kterých substituenty amidoskupin jsou především N-morfolinové radikály.

Kromě těchto pokusů existuje ještě odkaz na americký patentový spis č. 3 252 762, kde organický peroxid je fyzikálně zapouzdřen do koloidního materiálu, například želatiny. Když se používá takového zkušebního proužku, vodný roztok zkušebního vzorku rozpouští želatinové kapsle, čímž se uvolňuje peroxid pro další reakci s indikátorem v přítomnosti peroxidačně účinné látky.

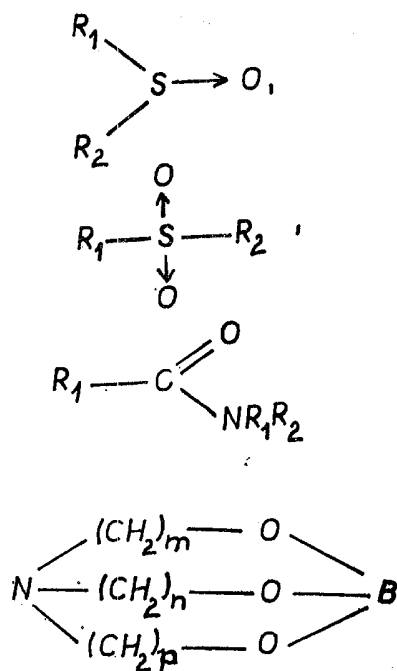
Každý z těchto dřívějších pokusů se snažil stabilizovat reagenční činidla tak, aby se potenciálně inkompatibilní reaktivní složky (peroxid a indikátor) nekombinovaly předčasně, čímž by se staly zkušební papírky méně citlivými. Lze tudíž říci, že metody dřívějšího stavu techniky nesměřovaly ke kombinacím, které by zvyšovaly současně stabilitu i citlivost, ale spíše zkoušely chránit existující citlivost tak, že by zabráňovaly rozkladu reagenčního činidla během skladování.

Jiným důležitým odkazem na dřívější stav techniky je americký patentový spis č. 3 326 850. Patentový spis se týká stabilizace organických peroxidů používaných jako katalyzátory a oxidační činidla. Autoři v tomto odkazu popisují použití solí primárních, sekundárních nebo terciárních aminů s organickými peroxidy. Tento odkaz se netýká v žádném směru reagenčních papírků.

Po zhodnocení, že žádnou z výše uvedených metod by se nedosáhlo takové stability a citlivosti, jaká je požadována u zkušebního papírku pro detekci peroxidačně účinných látek, se autor tohoto vynálezu rozhodl pro zcela odlišný směr. Tento odlišný přístup byl nalezen během výzkumu, který vedl k vynálezu a jeho výsledkem byla směs a zařízení, které dokonale splňovaly požadavky na zvýšenou stabilitu a citlivost.

Avšak, a to je ještě překvapivější, výsledkem této práce byla ještě další výhoda — zlepšený způsob výroby zařízení, než byl dosud znám, přičemž je výroba dramaticky jednodušší než způsoby jmenované v odkazech dřívějšího stavu techniky — metoda jediného ponoření.

Zkušební prostředek pro stanovení přítomnosti peroxidačně působících látek, jako hemoglobinu, utajené krve a peroxidázy, ve zkoušeném vzorku, obsahující organický hydroperoxid, například t-butylhydroperoxid, kumenhydroperoxid, diisopropylbenzenhydroperoxid, 2,5-dimethylhexan-2,5-dihydroperoxid, paramonhanhydroperoxid nebo jejich směsi, jakož i indikátor schopný poskytovat detegovatelnou odezvu v přítomnosti uvedeného hydroperoxidu a peroxidačně účinné látky, jako například benzinid, o-tolidin, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin, 2,7-diaminofluoren nebo jejich směsi, spočívá podle vynálezu v tom, že také obsahuje některou sloučeninu následujících obecných vzorců



nebo jejich směsi; ve výše uvedených obecných vzorcích

$R_1$  a  $R_2$ , které jsou stejné nebo rozdílné, znamenají vodík, aryl, alkyl nebo alkoxykupinu, vždy o 1 až 6 uhlíkových atomech v každém z uvedených zbytků, a

$m$ ,  $n$  a  $p$ , které jsou stejné nebo rozdílné, znamenají celá čísla 1 až 4.

Zkušební prostředek podle vynálezu výhodně jako některou z uvedených sloučenin obsahuje dimethylsulfoxid, dimethylsulfon, N,N-dimethylformamid, benzylsulfoxid, 4-chlorfenylsulfon, 4-fluor-3-nitrofenylsulfon nebo jejich směsi, a to zejména například směs dimethylsulfonu a N,N-dimethylformamidu.

Zkušební prostředek podle vynálezu může také jako některou z uvedených sloučenin obsahovat boritan trimethanolaminu, triethanolaminu, tri(n-propanol)aminu nebo jejich směsi.

Zkušební prostředek podle vynálezu může jako uvedenou sloučeninu obsahovat boritan triethanolaminu, dále dimethylsulfon, N,N-dimethylformamid nebo jejich směsi, a boritan trimethanolaminu, triethanolaminu, tri(n-propanol)aminu nebo jejich směsi, nebo směs dimethylsulfonu, N,N-dimethylformamidu a boritanu triethanolaminu.

Zkušební prostředek podle vynálezu ve výhodném provedení může obsahovat takovéto směsi vpravené do nosičové matrice.

Organický peroxid uvažovaný pro použití ve zkušební směsi lze volit z mnoha dobře známých organických peroxidů. Musí však být schopen reakce s peroxidačně aktivní látkou v přítomnosti indikátoru citlivého na peroxidy za vzniku detegovatelné reakce, například barevné změny nebo změny v množství absorbovaného nebo odraženého

světla zkušební směsi. Mezi nalezené použitelné peroxidy patří terc.butylperoxid, kumenperoxid, diisopropylbenzenperoxid, 2,5-dimethylhexan-2,5-diperoxid, paramethanperoxid nebo jejich směsi. Kumenperoxid byl nalezen jako nejvýhodnější.

Existují četné indikátory, které jsou schopné tvorby detegovatelné reakce v přítomnosti peroxidu a pseudoperoxidázy, a které jsou tudíž vhodné pro využití v tomto vynálezu. Zahrnují sloučeniny tzv. „benzidínového typu“, z nichž typické jsou benzidín, o-tolidin, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidín, 2,7-diaminofluoren nebo jejich směsi v různých poměrech.

Borátové estery, o nichž se v současné době má za to, že přispívají ke zvýšené stabilitě a citlivosti, mají výše uvedenou strukturu. Mezi sloučeninami zahrnutými do této obecné struktury bylo nalezeno, že borát trimethanolaminu, borát triethanolaminu a borát tri-(n-propanol)aminu jsou obzvláště vhodné. Tyto sloučeniny odpovídají výše uvedenému obecnému vzorci, kde  $m$ ,  $n$  a  $p$  jsou stejné nebo různé a jsou celá čísla 1, 2 a 3.

Množství borátového esteru potřebného v této směsi a zařízení lze široce měnit. To se odráží v níže uvedených příkladech provedení. Tak například v příkladu 1 molární poměr ekvivalentů borátu triethanolaminu k ekvivalentům kumenperoxidu je 4,71. Naproti tomu příklad 3 dokládá 2,83 molární poměr borátu k peroxidu (1,42 poměru normality, jestliže se uvažuje difunkčnost peroxidu).

Avšak jak je ukázáno v příkladech provedení, poměr ekvivalentů řádu 1,4 až asi 5, neomezuje v žádném případě množství borátu použitelného v tomto vynálezu. Lze používat jakéhokoli množství postačujícího k dosažení žádaného stupně stability a citlivosti zkušební směsi a toto množství lze snadno určit experimentálně.

Při výhodném způsobu provedení vynálezu obsahuje směs kumenperoxid, o-tolidin a směs dimethylsulfonu a dimethylsulfoxidu a borát triethanolaminu.

Zkušební směs se připravuje typicky rozpouštěním nebo suspendováním po částech každé použité složky ve vodě nebo v jiném vhodném suspenzním médiu nebo rozpouštědle. Takové rozpouštědlo zahrnuje chloroform, methanol, ethanol, methylchlorid, cyklohexan atd.

Zkušební zařízení lze vyrábět způsobem jednoho ponoření. Podle tohoto způsobu se část materiálu nosiče ponořuje do roztoku nebo suspenze a potom suší. Zařízení takto připravená vykazují malou ztrátu reaktivity i po skladování za stresových podmínek, například při teplotě asi 60 °C až asi 70 °C po dobu tří dnů a déle. Pro grovnání se podobně připravují zkušební zařízení, avšak bez přítomnosti borátového esteru a/nebo ředidla. Když se tyto proužky skladují za v podstatě identických stresových podmí-

nek, lze pozorovat dramatickou ztrátu reaktivitu a citlivosti.

Materiál nosiče používaný při výrobě zkušebního zařízení může mít četné formy. Americký patentový spis č. 3 846 247 popisuje použití plstě, porézních keramických proužků a tkaných nebo zplstěných skleněných vláken. Kromě toho americký patentový spis č. 3 552 938 popisuje použití dřevěných tyčinek, tkaniva, pěnového materiálu a jílovitých látek. Použití příze ze syntetických pryskyřic a plstě ze skleněných vláken jako materiálu nosiče je navrženo v britském patentovém spise č. 1 369 139. Jiný britský patentový spis č. 1 349 623 navrhuje použití průsvitné síťoviny z tenkých vláken jako potahu podložního papírového materiálu. Polyamidová vlákna jsou uvedena ve francouzském patentovém spise č. 2 170 397. Přes tyto návrhy však materiálem, který je převážně používán v oboru jako materiál nosiče, a který je zejména vhodný pro tento vynález, je savý papír, například filtrační papír. Lze tedy vidět, že je velké množství při výběru vhodného materiálu k použití jako materiálu nosiče a materiál může mít různé fyzikální formy. O všech těchto typech se předpokládá, že patří do rozsahu tohoto vynálezu.

Mechanismus, kterým tento postup dospívá ke zvýšené stabilitě a citlivosti, není bezpečně znám. Avšak výjimečné chemické vlastnosti borátového esteru popsaného a chráněného esteru popsaného a chráněného v tomto vynálezu poskytují dostatek podkladů k úvahám. Je známo, že peroxidy jsou obecně nestálé látky nebo přinejmenším méně stálé než většina látek vyskytujících se v přírodě. Některé jsou výbušné. Jiné, například organické peroxidy (jako kumenperoxid), jsou poměrně stálé, předpokládá se však snadná disociace v přítomnosti kyseliny, jaké jsou běžně používány ve zkušebním zařízení citlivém na okulní krev. Dochází-li k takovému rozkladu v přítomnosti oxidovatelného indikátoru (takového, jaké jsou zde popisovány), dochází k redox reakci. Předpokládá se, že tato předčasná reakce je příčinou snížené citlivosti peroxidálně citlivých reagenčních papírků.

Na druhé straně borátové estery, jaké jsou zde popisovány, jsou jedinečné, pokud se týká geometrie atomů dusíku a boru v bicyklické struktuře, přičemž každá obsahuje oddělený můstkový atom. Atom dusíku na jednom můstku je bohatý na elektrony, přičemž obsahuje nesdílený elektronový pár vyčnívající ven z molekulární osy. Druhý můstkový atom, atom boru, situovaný na druhém konci osy, je chudý na elektrony a má tendenci ke koordinační vazbě a anionty bohatými elektrony.

V důsledku bohatství elektronů by dusíkový konec molekuly, jak je dobře myslitelné, mohl vázat proton, zatímco elektrony chudý můstkový atom boru by mohl koordinačně vázat aniontový zbytek peroxidu.

Předpokládá se, že jedinečná elektronová distribuce těchto diskutovaných bicyklických molekul stabilizuje organický peroxid v přítomnosti zkušební směsi tak, že se chemicky vsune mezi peroxidový proton a atom kyslíku, přičemž vytvoří koordinačně vázaný iontový pár.

Předpokládá se, že překvapivě zvýšená stabilita v této zkušební směsi je výsledkem toho, že organický peroxid je vyloučen z iontové interakce s indikátorem, dokud solvatační aktivita zkušební směsi nerozruší peroxid-borátový komplex a neuvolní peroxid, aby oxidoval indikátor v přítomnosti peroxidálně aktivní látky.

Přes značný vzrůst stability a citlivosti, které jsou výsledkem použití borátových esterů, bylo s překvapením zjištěno, že lze dospět k dokonce ještě větší stabilitě a citlivosti, jestliže borátové estery a výše uvedené ředidlo jsou společně obsaženy ve zkušební směsi.

Ředidla, o nichž se v současné době předpokládá, že přispívají ke zvýšené stabilitě a citlivosti tohoto vynálezu, mají výše uvedené struktury. Mezi sloučeninami zahrnutými do těchto obecných vzorců bylo nalezeno, že obzvláště vhodné jsou N,N-dimethylformamid, dimethylsulfoxid, dimethylsulfon nebo jejich směsi. Dalšími ředidly, kterých lze použít, jsou benzylsulfoxid, 4-chlorfenylsulfon, 4-fluor-3-nitrofenylsulfon a další. Tyto sloučeniny odpovídají výše uvedeným strukturním vzorcům, kde každé R<sub>1</sub> a R<sub>2</sub> značí methylovou skupinu.

Rozsah R<sub>1</sub> a R<sub>2</sub> obsažený v tomto vynálezu je široký. Jako R<sub>1</sub> a R<sub>2</sub> se rozumí substituovaná nebo nesubstituovaná alkylová skupina s 1 až 6 atomy uhlíku. Ilustrativními příklady alkylových skupin jsou methylová, ethylová, propylová, isopropylová, n-butylová, isobutylová, sek.butylová, n-pentylová, isopentylová, neopentylová, terc-pentylová skupina a jiné isomerní skupiny, včetně skupin odvozených od hexanu. Tyto alkylové skupiny jsou rovněž ilustrativní pro alkoxylové skupiny uvažované jako uspokojující předchozí definici pro R<sub>1</sub> a R<sub>2</sub>.

Jestliže R<sub>1</sub> a R<sub>2</sub> značí arylovou skupinu, je rozsah obdobně široký a termín arylová skupina, jak je zde používán, zahrnuje substituované a nesubstituované arylové skupiny, například fenylové, benzylové, tolylové, anilínové, naftylové atd.

Typickými skupinami, kterými R<sub>1</sub> a R<sub>2</sub> mohou být substituovány, jsou aminoskupina, nitroskupina, amidová skupina, nitrilová, hydroxylová, alkoxylová skupina, halogen, fenylová skupina, sulfonová kyselina, karboxylová kyselina atd.

Množství ředidla užívaného ve směsi, prostředku a způsobu podle tohoto vynálezu, lze měnit v širokých mezích a lze je snadno stanovit experimentálně. Představuje-li ředidlo tekutinu jako například dimethylsulfoxid (viz tabulku II, níže), množství se může pohybovat asi od 10 % až asi do 100 %,

vztaženo na objem ředidla přidaného ke směsi, ve srovnání s objemem rozpouštědla nebo suspenzního činidla (v případě příkladu 12, voda). Výhodné rozmezí je asi 25 % až asi 100 %.

Podobně, jestliže ředidlo představuje směs více než jednoho ředidla podle vynálezu, lze poměr množství různých používaných látek měnit v širokých mezích, a to lze rovněž snadno stanovit experimentálně.

Aby se jasněji vysvětlilo, jak se má provádět a využívat tento vynález, a pro ilustraci jeho výhodných provedení jsou připojeny následující příklady provedení.

#### Příklady provedení

##### A. Výroba zkušební směsi a prostředku

###### Příklad 1

###### Zkušební směs

Zkušební směs byla připravena rozpouštěním následujících složek ve 150 ml (mililitrech) deionizované vody. Složky byly přidány do vody v sestupném pořádku, jak je uvedeno:

|                                                    |         |
|----------------------------------------------------|---------|
| trojsodná sůl kyseliny citrónové                   | 3,2 g   |
| kyselina citrónová                                 | 2,2 g   |
| tetrasodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové  | 0,1 g   |
| dimethylsulfon                                     | 10,0 g  |
| laurylsíran sodný                                  | 1,0 g   |
| 6-methoxychinolin                                  | 0,5 g   |
| dimethylsulfoxid                                   | 25,0 ml |
| aceton                                             | 25,0 ml |
| kumenperoxid                                       | 2,0 g   |
| borát triethanolaminu (Aldrich Chemical Co., Inc.) | 10,0 g  |
| o-tolidin                                          | 0,4 g   |

TABULKA I

| Vzorek č. | Aditivum                     | Výsledky                                                                  |
|-----------|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 1         | hexamethylenteramin          | Velmi tmavý, skoro černý roztok.<br>Nízká citlivost.                      |
| 2         | 1,4-diazabicyklo[2,2,2]oktan | Tmavě zelené/hnědé zbarvení.<br>Minimálně citlivý na okultní krev v moči. |
| 3         | borát triethanolaminu        | Slabě nahnědlý. Vysoká citlivost na okultní krev v moči.                  |
| 4         | kontrolní pokus (bez aditiv) | Během dvou hodin ztmavne.<br>Nevhodný pro analýzy okultní krve.           |

###### Příklad 4

###### Vliv ředidla

Do 500 ml kádinky byly přidány následující složky:

|            |        |
|------------|--------|
| chloroform | 100 ml |
|------------|--------|

###### Příklad 2

###### Zkušební zařízení

Proužky Whatmannova filtračního papíru 3MM byly ponořeny do zkušební směsi z příkladu 1. Ponořené proužky byly sušeny při teplotě 70 °C po dobu asi 15 minut, aby se vytvořil materiál nosiče impregnovaný zkušební směsí. Vysušený materiál nosiče byl potom připojen k proužkům nebo držadlům z plastické hmoty (polystyrenu) pomocí dvoustranné lepicí pásky, vyráběné 3M Company. Získaného zkušebního zařízení lze používat k detegování peroxidačně účinných látek ponořením do zkoušeného vzorku, například do moče, podezřelého z obsahu takových látek a pozoruje se, zda se v materiálu nosiče vytvoří nějaké zbarvení.

##### B. Hodnocení stability různých zkušebních směsí

###### Příklad 3

###### Vliv borátového esteru

Účelem tohoto pokusu bylo ukázat vliv borátu triethanolaminu na směsi k hodnocení okultní krve ve srovnání s jinými známými aditivy. Byl připraven následující roztok

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| chloroform                      | 100 ml |
| o-tolidin                       | 0,5 g  |
| 2,5-dimethylhexan-2,5-diperoxid | 2,0 g  |
| poly-(N-vinylpyrrolidon)        | 10,0 g |

K alikvótním dílům tohoto roztoku (po 20 ml) byl přidán 1 g aditiva z následující tabulky. Tyto roztoky zkušebních směsí byly ponechány stát při teplotě místnosti asi po dobu 5 hodin a pozorované výsledky jsou shrnuty níže v tabulce I.

|                  |         |
|------------------|---------|
| kumenperoxid     | 4,0 g   |
| o-tolidin        | 0,4 g   |
| dimethylsulfoxid | 25,0 ml |

Získaná zkušební směs, která byla slabě žlutá po smíchání výše uvedených složek, byla přenesena do Erlenmeyerovy baňky, která byla zazátkována a ponechána na la-

boratorním stole za normální teploty (asi při 18,3 °C) přes noc. Po uplynutí doby jednoho dne zkušební směs ztmavla jenom o málo víc, než když byla připravena.

#### Příklad 5

##### Srovnání s příkladem 4

Zkušební směs pro kontrolní účely, tj. pro srovnání s vynálezem, byla připravena postupem podle příkladu 4, s tím rozdílem, že dimethylsulfoxid byl nahrazen 25 ml chloroformu. Tato zkušební směs, bez dimethylsulfoxidu, byla uzavřena v Erlenmeyerově baňce a ponechána na laboratorním stole jako v příkladu 4 (tj. při teplotě 18,3 °C po dobu 1 dne). Na rozdíl od směsi z pokusu 4, kontrolní směs ztmavla až skoro zčernala, což svědčí o zlepšené stabilitě, kterou ředidlo dodává zkušební směsi.

#### C. Stabilizace zkušebních zařízení borátovým esterem

#### Příklad 6

##### Kontrola

Pro přípravu reagenčního proužku citlivého na pseudoperoxidázy byl připraven roztok následující zkušební směsi. Tento vzorek neobsahuje jako složku borátový ester podle vynálezu.

|                                  |         |
|----------------------------------|---------|
| voda                             | 150 ml  |
| trojsodná sůl kyseliny citrónové | 3,2 g   |
| kyselina citrónová               | 2,2 g   |
| čtyřsodná sůl kyseliny ethylen-  |         |
| diaminotetraoctové               | 0,1 g   |
| dimethylsulfon                   | 10,0 g  |
| laurylsíran sodný                | 1,0 g   |
| 6-methoxychinolin                | 0,5 g   |
| dimethylsulfoxid                 | 25,0 ml |
| aceton                           | 25,0 ml |
| kumenperoxid                     | 2,0 g   |
| o-tolidin                        | 0,4 g   |

Ústřížek Whatmannova filtračního papíru 3MM byl ponořen do roztoku výše uvedené zkušební směsi a vysušen při teplotě 70 °C. Vysušený papír byl nařezán na čtverce asi 5 mm, a ty byly připevněny k držadlům z plastické hmoty pomocí oboustranné lepicí pásky (dostupné od 3M Company), čímž se vyrobí zkušební zařízení.

#### Příklad 7

##### Vynález

Roztok byl připraven stejně jako ve výše uvedeném příkladu 6, s tím rozdílem, že před přidáním kumenperoxidu bylo přidáno 10 g borátu triethanolaminu. Zkušební zařízení bylo připraveno z tohoto roztoku stejně jako v příkladu 6.

#### Příklad 8

##### 1,4-diazabicyklo[2,2,2]oktan

Roztok byl připraven stejně jako ve výše uvedeném příkladu 6, s tím rozdílem, že před přidáním kumenperoxidu bylo přidáno 10 g 1,4-diazabicyklo[2,2,2]oktanu. Tento roztok byl použit k přípravě zkušebního zařízení stejným způsobem jako v příkladu 6.

#### Příklad 9

##### Hexamethylentetramin

Roztok byl připraven jako ve výše uvedeném příkladu 6, s tím rozdílem, že před přidáním kumenperoxidu bylo přidáno 10 g hexamethylentetraminu. Stejným způsobem jako ve výše uvedeném příkladu bylo z tohoto roztoku připraveno zkušební zařízení.

#### Příklad 10

##### Srovnání stability a citlivosti

Zkušební zařízení z příkladů 6 až 9 byla uchovávána za stresových podmínek, aby se stanovila jejich relativní stabilita a citlivost. Zařízení z příkladů 6 až 8 byla skladována po dobu tří dní při teplotě asi 60 °C a zařízení z příkladu 9 po jeden den při teplotě asi 70 °C. Tato zkušební zařízení vystavená ztíženým podmínkám byla potom hodnocena na citlivost ponořením do moče, obsahující 1 milióntinu krve. Změnu barvy při této koncentraci okultní krve (totiž 0,015 mg/l dl), vyvolávalo jenom zařízení obsahující borát triethanolaminu (příklad 8). Ostatní zařízení byla na tuto hladinu okultní krve necitlivá.

#### D. Stabilizace zkušebních prostředků ředidlem

#### Příklad 11

Ze šesti zkušebních roztoků směsí obsahujících různá množství dimethylsulfoxidu podle níže uvedené tabulky II bylo připraveno šest zkušebních prostředků.

Všech šest roztoků zkušebních směsí bylo připraveno v tomto složení:

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| voda                             | 75 ml  |
| trojsodná sůl kyseliny citrónové | 3,2 g  |
| kyselina citrónová               | 4,5 g  |
| borát triethanolaminu            | 10,0 g |
| čtyřsodná sůl kyseliny ethylen-  |        |
| diaminotetraoctové               | 0,1 g  |
| dimethylsulfon                   | 5,0 g  |
| laurylsíran sodný                | 1,0 g  |
| 6-methoxychinolin                | 0,5 g  |
| kumenperoxid                     | 2,0 g  |
| o-tolidin                        | 0,4 g  |

Ke každému roztoku šesti zkušebních směsí byla přidána následující množství dimethylsulfoxidu a methanolu:

TABULKA II

| Zkušební směs č. | Dimethylsulfoxid (ml) | Methanol (ml) |
|------------------|-----------------------|---------------|
| 1                | 0                     | 75            |
| 2                | 5                     | 70            |
| 3                | 10                    | 65            |
| 4                | 25                    | 50            |
| 5                | 40                    | 35            |
| 6                | 60                    | 15            |

Ponořením kousku Whatmannova filtračního papíru 3MM do každého roztoku byla z každého výše uvedeného roztoku zkušební směsi připravena zkušební zařízení. Ponořené proužky filtračního papíru byly vyňaty z příslušných roztoků a sušeny a zatíženy v sušárně po dobu 18 hodin při teplotě 70 °C.

Po zatížení byl každý proužek hodnocen ve zkušebním roztoku obsahujícím ve zředění 1 : 1 000 000 čerstvou celou krev v moči. Intenzita vyvinutého zbarvení na každém proužku umožňuje srovnání. Výsledky jsou shrnuty v tabulce III.

TABULKA III

| Zkušební zařízení č.* | Hodnocení zbarvení**                  |
|-----------------------|---------------------------------------|
| 1                     | 0 (bez zbarvení)                      |
| 2                     | 1 (stopy)                             |
| 3                     | 3                                     |
| 4                     | 5                                     |
| 5                     | 6                                     |
| 6                     | 7 (prakticky žádná ztráta reaktivity) |

\* Čísla zkušebního zařízení odpovídají číslům zkušebních směsí v tabulce II.

\*\* Hodnocení zbarvení bylo založeno na stupnici 0 až 8, přičemž 8 je zbarvení vyvolané čerstvě připraveným nestresovaným zkušebním zařízením, připraveným ze zkušební směsi č. 6 (tabulka II). Hodnocení 0 značí, že se nevytvořilo žádné zbarvení a hodnocení 1 naznačují pouze stopová množství zbarvení.

Z údajů v tabulce III je nápadně zřejmé, že se stoupajícím množstvím ředidla (zde dimethylsulfoxidu) použitého ve složení zkušební směsi vzrůstá její citlivost.

E. Vzrůst stability zkušební směsi (s borátovým esterem) způsobený různými ředidly.

#### Příklad 12

Jako v příkladu 11 bylo připraveno osm zkušebních směsí, z nichž sedm obsahova-

lo různá ředidla a jedna (kontrolní) byla bez ředidla. Účelem tohoto pokusu bylo stanovit účinnost různých ředidel při vzrůstání stability zkušebních směsí citlivých k peroxidačně účinným látkám, kde je udržováno konstantní množství borátového esteru.

Byl připraven roztok obsahující následující složky:

|                                  |         |
|----------------------------------|---------|
| voda                             | 50 ml   |
| trojsodná sůl kyseliny citrónové | 3,2 g   |
| kyselina citrónová               | 2,2 g   |
| laurylsíran sodný                | 1,0 g   |
| 6-methoxychinolin                | 1,0 g   |
| methanol                         | 50,0 ml |
| borát triethanolaminu            | 5,0 g   |
| kumenperoxid                     | 2,0 g   |
| o-tolidin                        | 0,4 g   |

Ke každé z osmi zkušebních směsí byl přidán malý podíl tohoto roztoku. Potom bylo přidáno do každé zkumavky malé množství ředidla uvedeného v tabulce IV, zkumavky byly uzavřeny a ponechány stát za normální teploty na laboratorním stole po dobu 1 týdne. Ke konci týdne byly zkumavky hodnoceny z hlediska ztmavnutí zbarvení, čím tmavší zbarvení, tím méně stálá zkušební směs. Výsledky jsou uvedeny v tabulce IV podle klesající stability (tj. zkušební směs 1 je nejstabilnější a zkušební směs 8 je nejméně stabilní).

TABULKA IV

| Zkušební směs č. | Ředidlo                    |
|------------------|----------------------------|
| 1                | dimethylsulfoxid           |
| 2                | N,N-dimethylformamid       |
| 3                | dimethylsulfon             |
| 4                | benzylsulfoxid             |
| 5                | 4-chlorfenylsulfon         |
| 6                | 4-fluor-3-nitrofenylsulfon |
| 7                | 2-imidazolidon             |
| 8 (kontrola)     | žádné                      |

Vzorky 1 a 2 v tabulce IV vykazují vynikající stabilitu; roztok 3 o něco méně, má nicméně dobrou stabilitu; roztoky 4 až 7 byly průměrně stálé; a roztok 8, kontrol-

ní, byl podstatně méně stálý než roztoky 1 až 7.

#### F. Výhodná provedení

##### Příklad 13

Ve 150 ml vody byly smíchány následující složky:

|                                  |         |
|----------------------------------|---------|
| trojsodná sůl kyseliny citrónové | 3,2 g   |
| kyselina citrónová               | 2,2 g   |
| čtyřsodná sůl kyseliny ethylen-  |         |
| diaminotetraoctové               | 0,1 g   |
| dimethylsulfon                   | 10,0 g  |
| laurylsíran sodný                | 1,0 g   |
| 6-methoxychinolin                | 0,5 g   |
| dimethylsulfoxid                 | 25,0 ml |
| aceton                           | 25,0 ml |
| borát triethanolaminu            | 10,0 g  |
| kumenperoxid                     | 2,0 g   |
| o-tolidin                        | 0,4 g   |

Proužky Whatmannova filtračního papíru 3MM byly ponořeny do výše uvedeného roztoku a usušeny při teplotě 70 °C. Po usušení byl filtrační papír nařezán na čtverce o délce strany 4 mm. Tyto čtverce byly potom upevněny na polystyrenová držátka měřící asi 8 × 15 mm pomocí dvoustranné lepicí pásky (3M Company).

Zkušební prostředky vyrobené podle výše uvedeného pokusu byly zatíženy po dobu tří dnů při teplotě 60 °C a bylo nalezeno, že jsou citlivá k okultní krvi v moči v koncentracích nižších než 0,015 miligramprocent.

##### Příklad 14

Tento příklad ilustruje druhé výhodné provedení uvedeného zkušebního zařízení.

Zkušební směs se připravuje smícháním následujících složek v následujícím sledu v kádince za míchání:

|                                    |        |
|------------------------------------|--------|
| voda                               | 75 ml  |
| trojnásobná sůl kyseliny citrónové | 3,2 g  |
| kyselina citrónová                 | 4,15 g |
| borát triethanolaminu              | 10,0 g |
| kyselina ethylendiaminotetraoctová | 0,1 g  |
| laurylsíran sodný                  | 1,15 g |
| dimethylsulfon                     | 10,0 g |
| 6-methoxychinolin                  | 0,6 g  |
| N,N-dimethylformamid               | 75 ml  |
| kumenperoxid                       | 3,0 g  |
| o-tolidin                          | 0,8 g  |

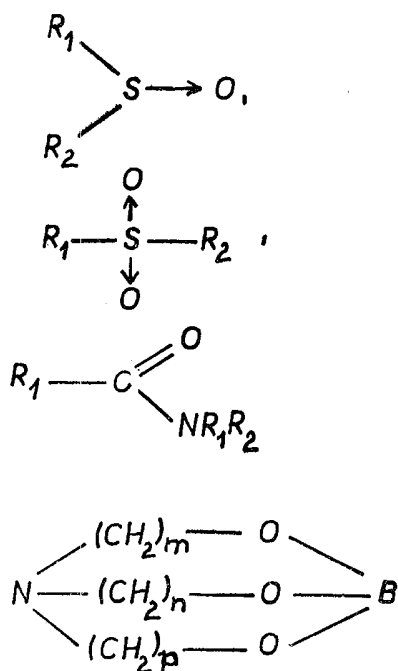
Proužky Whatmannova filtračního papíru 3MM byly ponořeny do výše uvedené směsi a sušeny po dobu asi 11 minut při teplotě asi 90 až 92 °C. Vysušené proužky byly potom upevněny na držátku z plastické hmoty za použití dvoustranné lepicí pásky.

Několik proužků bylo stresováno skladováním při teplotě 70 °C po dobu 1 dne; dalším skladováním při teplotě 40 °C po dobu 12 týdnů. Obě sady proužků vyvinuly modro/zelené zbarvení, když byly uvedeny do styku s čerstvou celou krví v moči ve zředění 1:1 × 10<sup>6</sup>.

Na závěr: předchozí příklady ukazují, jak se připravuje a používá směs a zkušebního zařízení podle vynálezu (příklady 1 a 2), udávají výsledky srovnání stability a citlivosti (příklady 3 až 12) a popisují současně výhodná provedení (příklady 13 a 14). Účinky borátového esteru a ředidla, jednotlivě i v kombinaci, na zkušební směs, jsou popsány v příkladech 3 až 5, zatímco účinky na zkušební zařízení jsou uvedeny v příkladech 6 až 11. Použití různých ředidel je zahrnuto v příkladu 12.

## PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Zkušební prostředek pro stanovení přítomnosti peroxidačně působících látek, jako hemoglobinu, utajené krve a peroxidázy, ve zkoušeném vzorku, obsahující organický hydroperoxid, například t-butylhydroperoxid, kumenhydroperoxid, diisopropylbenzenhydroperoxid, 2,5-dimethylhexan-2,5-dihydroperoxid, paramenthanhydroperoxid nebo jejich směsi, jakož i indikátor schopný poskytovat detegovatelnou odezvu v přítomnosti uvedeného hydroperoxidu a peroxidačně účinné látky, jako například benzidinu, o-tolidinu, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu, 2,7-diaminofluorenu nebo jejich směsi, vyznačující se tím, že také obsahuje některou sloučeninu obecného vzorce



nebo jejich směsi, ve kterýchžto obecných vzorcích

$R_1$  a  $R_2$ , které jsou stejné nebo rozdílné, znamenají vodík, aryl, alkyl nebo alkoxy skupinu, vždy o 1 až 6 uhlíkových atomech v každém z uvedených zbytků, a

$m$ ,  $n$  a  $p$ , které jsou stejné nebo rozdílné, znamenají celá čísla 1 až 4.

2. Zkušební prostředek podle bodu 1 vyznačující se tím, že jako uvedenou sloučeninu obsahuje dimethylsulfoxid, dimethylsulfon, N,N-dimethylformamid, benzylsulfon, 4-chlorfenylsulfon, 4-chlor-3-nitrofenylsulfon nebo jejich směsi.

3. Zkušební prostředek podle bodu 1 vyznačující se tím, že jako uvedenou sloučeninu obsahuje směs dimethylsulfonu a N,N-dimethylformamidu.

4. Zkušební prostředek podle bodu 1 vyznačující se tím, že jako uvedenou sloučeninu obsahuje boritan trimethanolaminu, triethanolaminu, tri(n-propanol)aminu nebo jejich směsi.

5. Zkušební prostředek podle bodu 1 vyznačující se tím, že jako uvedenou sloučeninu obsahuje boritan triethanolaminu.

6. Zkušební prostředek podle bodu 1 vyznačující se tím, že obsahuje dimethylsulfon, N,N-dimethylformamid nebo jejich směsi, a boritan trimethanolaminu, triethanolaminu, tri(n-propanol)aminu nebo jejich směsi.

7. Zkušební prostředek podle bodu 1 vyznačující se tím, že obsahuje směs dimethylsulfonu, N,N-dimethylformamidu a boritanu triethanolaminu.

8. Zkušební prostředek podle některého z bodů 1 až 7 vyznačující se tím, že obsahuje směs vpravenou do nosičové matrice.