



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **302387**

(13) B1

(51) Int Cl⁶ G 01 N 33/62, C 12 Q 1/58

Patentstyret

(21) Søknadsnr	914711	(86) Int. inng. dag og	
(22) Inng. dag	29.11.91	søknadsnummer	
(24) Løpedag	29.11.91	(85) Videreføringsdag	
(41) Alm. tilgj.	04.06.92	(30) Prioritet	03.12.90, FI, 905949
(45) Meddelt dato	23.02.98		
(73) Patenthaver	Valio Meijerien Keskusosuusliike, Kalevankatu 56, SF-00180 Helsingfors, FI		
(72) Oppfinner	Sinikka Rajamäki, Helsingfors, FI		
	Anne-Maria Riihimäki, Esbo, FI		
(74) Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, 0306 Oslo		

(54) Benevnelse **Fremgangsmåte og prøveanordning for bestemmelse av urea**

(56) Anførte publikasjoner DE 2711634, EP 339331, US 3873269

(57) Sammendrag

Fremgangsmåte for bestemmelse av ureainnhold i en prøve, spesielt i melk, ved hjelp av urease, base og en indikator. I det minste utføres omsetningen med basen i et lukket rom hvor et indikatorsystem plasseres slik at det ikke kommer i kontakt med de øvrige reagenser. Det beskrives også en prøveanordning for bestemmelse av urea ved anvendelse av fremgangsmåten.

Oppfinnelsen angår en fremgangsmåte og en prøveanordning for bestemmelse av urea i en prøve ved hjelp av urease, base og en indikator. Fremgangsmåten egner seg spesielt godt
5 for hurtig bestemmelse av ureainnholdet i melk.

Hos drøvtyggere, som kuer, påvirkes stoffskiftet i vesentlig grad av vommens og de fremste magenes funksjoner. Hvor bra fôret blir utnyttet påvirkes av vommikrobenes tilgang på energi og eggehvitestoffer. Dersom tilgangen på energi og
10 eggehvitestoffer ikke er balansert, blir utnyttelsen av fôrproteinene dårligere. Dette kommer til syne blant annet ved en økning i blodets ureanivå etter fôringen.

Ifølge flere undersøkelser er det konstatert at mengden urea i melk følger variasjonene i blodets ureainnhold
15 (f.eks. Oltner & Wiktorsson 1983, Livestock Prod.Sci. 10:457, Refsdal 1983, Acta Vet.Scand. 24:518). Variasjoner i ureamengden i blodet, og også i melken, kom for en stor del av forandringer i fôringen (f.eks. Refsdal og Oltner & Wiktorsson, ovenfor). På grunn av dette har man ved oppfølging
20 av fôringen anvendt melkens ureainnhold som en indikator på riktig fôring. Som ureaområde for normgivende fôring er det fastsatt 20-30 mg urea pr. 100 ml melk (Setälä et al. 1987, Karjatalous 10:52 og 11:54).

Urea kan bestemmes ved en fremgangsmåte hvorved det
25 spaltes til ammoniumkarbonat ved hjelp av urease og hvor ammoniumionene omsettes med fenol og hypokloritt for å oppnå en blå forbindelse som kan bestemmes spektrofotometrisk (Fawcett & Scott 1960, J. Clin. Path. 13:156). Fremgangsmåten er også tillempet for melk (f.eks. Rajamäki & Rauramaa 1984,
30 Finnish Chemical Letters 2:47-48).

Vil man ha størst mulig nytte av bestemmelsen bør den utføres hos kuene i fjøset som en såkalt "på stedet"-hurtigtest. Ovennevnte fremgangsmåte egner seg ikke for dette, ettersom den bør utføres i et laboratorium.

35 Urea kan også bestemmes ved at en prøve som inneholder urea omsettes med urease, og den forandring i pH som hydrolyseproduktet får observeres ved hjelp av en passende indikator. Fremgangsmåten anvendes for bestemmelse av ureainnholdet i f.eks. blod, plasma og urin (GB-patentskrift nr.

922 665). Indikatorpinner for melk basert på dette omtales i publikasjonen Tierärztl. Prax. 1985, 13:559.

Indikatorpinnene har generelt den ulempe at de bare tillater analyse av en svært liten prøvemengde, hvorved det
5 oppnådde resultat ofte blir upålitelig. Resultatet varierer på grunn av den lille prøvemengden. Resultatet påvirkes også av utførelsen ved pipettering av prøve på pinnen, eller ved dyp-
ping av pinnen i løsningen som skal undersøkes. Dette problem forverres når indikatorpinnen dyppes i melk fordi melken i seg
10 selv vil ødelegge en nøyaktig tolkning av fargeforandringen på pinnen. For å eliminere melkens ødeleggende innvirkning har man utviklet pinner hvor en reaksjonssone som kommer i kontakt med melken er plassert inntil en indikatorsonen (FI patent-
søknad nr. 891920). Reaksjonssonen inneholder urease, base,
15 glukose og tensid. Pinnen holdes i et rør, som er lukket bare i den ene ende, inntil ammoniakk frigjøres fra reaksjonssonen og diffunderer inn i indikatorsonen, hvilket tar lang tid. Pinnene avleses fortrinnsvis først etter to timer.

Man har nå funnet en fremgangsmåte for bestemmelse av
20 urea som er mer pålitelig enn pinner som dyppes ned i melk og som er hurtigere enn pinner med en indikatorsonen plassert inntil den nedsenkbare reaksjonssone og som under reaksjonstiden holdes i et rør som er lukket i den ene ende.

Med oppfinnelsen tilveiebringes således en fremgangsmåte
25 for bestemmelse av ureainnhold i en prøve, spesielt i melk, ved hjelp av urease, base og en indikator. Fremgangsmåten er kjennetegnet ved at i det minste omsetningen med basen utføres i et lukket rom hvor et indikatorsystem er plassert slik at det ikke kommer i kontakt med de øvrige reagenser.

30 Med oppfinnelsen tilveiebringes også en prøveanordning for bestemmelse av urea ved hjelp av urease, base og en indikator, kjennetegnet ved at den omfatter et lukket rom hvor i det minste omsetningen med basen finner sted og hvor et indikatorsystem er plassert slik at det ikke kommer i kontakt med de øvrige rea-
35 genser.

Ved fremgangsmåten omsettes prøven med urease og base, og i det minste utføres omsetningen med basen i et lukket rom hvor indikatorsystemet er plassert slik at det ikke berører de

øvrige reagenser. Prøven kan først omsettes med urease og så først deretter med base, hvorved i det minste den siste omsetning utføres i det nevnte lukkede rom. Dersom prøven derimot omsettes samtidig med urease og base, utføres hele omsetningen i et lukket rom. Prøveanordningen omfatter et lukket
5 rom hvor i det minste omsetningen med basen utføres og hvor indikatorsystemet er plassert slik at det ikke kommer i kontakt med de øvrige reagenser.

Reaksjonsreagensene omfatter urease og base. Ureasen spalter prøven som skal undersøkes til ammoniumsalter, og
10 basen frigjør ammoniakk fra saltene. Ammoniakk absorberes i indikatorsystemet og frembringer en fargeforandring i pH-indikatoren i løpet av en gitt tid.

Indikatorsystemet omfatter en eller flere pH-indikatorer. Vanligvis løses indikatoren i en passende buffer.
15 Man kan også anvende flere slike buffer/indikatorblandinger som forandrer farge ved ulike pH-verdier. Bestemmelse av melkens ureainnhold utføres fortrinnsvis i form av en såkalt dobbelttest. Fortrinnsvis er den aktuelle dobbelttestens buffer/indikatorblandinger slik at ureainnhold < 20 mg/100 ml
20 ikke frembringer noen fargeforandring i noen av buffer/-indikatorblandingene, men ved et innhold av 20-30 mg/100 ml reagerer den ene buffer/indikatorblanding, og når urea finnes i en mengde på over 30 mg/100 ml reagerer begge buffer/-indikatorblandingene.

Fortrinnsvis inneholder hver buffer/indikatorblanding fosfatbuffer, men av forskjellig konsentrasjon. Fortrinnsvis inneholder fosfatbufferene natriumsalt av fenolrødt og natriumsalt av bromtymolblått, f.eks. med vektforhold 1:1. Den ene fosfatbuffer er fortrinnsvis en 0,00025M og den andre en
30 0,00230M natriumdihydrogenfosfatbuffer.

Indikatorsystemet kan være i fast eller flytende form. Et indikatorsystem i flytende form kan skilles fra de øvrige reagenser med en folie som slipper gjennom gass. Folien
35 kan f.eks. være teflonrørtape eller teflonfilterfolie med en porestørrelse på 0,5 μm . Indikatorsystemet kan fortrinnsvis bringes over i fast form ved hjelp av alginat og/eller ved at det absorberes i et i filtrerpapir som får tørke.

Indikatorsystemet plasseres fortrinnsvis i lokket på et lukket kar. Lokket kan være todelt slik at to ulike buffer/indikatorblandinger kan plasseres i dette. Urease, prøve og base plasseres på bunnen av karet og lokket lukkes tett til. Etter en gitt tid avleses indikatorsystemets farge. Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen egner seg spesielt godt for bestemmelse av ureainnholdet i melk, men også andre prøver, slik som urinprøver, kan være aktuelle.

Oppfinnelsen belyses ved hjelp av følgende eksempler.

10

Eksempel 1

Buffer/indikatorblanding I, som inneholder 25 mg natriumsalt av fenolrødt, 25 mg natriumsalt av bromtymolblått og 3 g alginat pr. 100 ml 0,0025M natriumdihydrogenfosfat, trekkes opp i et filterpapir. Buffer/indikatorblanding II, som er lik I med unntak av at natriumdihydrogenfosfatets konsentrasjon er 0,00230M, trekkes opp i et annet filterpapir. Papirene tørkes ved 90 °C i 60 min og plasseres deretter i et todelt lokk på et 10 ml kar med tettsluttende lokk, slik at papirene atskilles av en mellomvegg i lokket. Urease (ca. 60-250 U) i fast eller flytende form plasseres på bunnen av karet. I karet tilsettes 1 ml melk og etter 2,5 min. tilsettes 0,5-1 ml 0,1M NaOH, hvorefter lokket legges på. Etter 2,5 min. avleses i lokket på testkaret de fargene som er dannet av buffer/-indikatorblandingen I og II. Resultatene sammenlignes med et fargekart og tolkes i henhold til følgende:

30

Fargekombinasjonen i lokket på prøvekaret	Prøvens ureainnhold mg/100 ml
gul/gul	< 20
oransje-rød/gul	20-30
oransje-rød/oransje-rød	> 30

Eksempel 2

35

Ureainnholdet i 118 melkeprøver ble bestemt etter fremgangsmåten ifølge eksempel 1 og ved en spektrofotometrisk referanseutførelse (Fawcett & Scott 1960, J. Clin. Path. 13:156). Resultatene vises i tabell 1.

Tabell 1

Fordeling (stk.) av melkeprøver i
ulike klasser for ureainnhold

Urea mg/100 ml	< 20	20-30	>30	
< 20	17	3	-	
20-30	2	34	3	
> 30	-	8	51	
Referanseutførelse totalt/stk.	19	45	54	118

Med fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen ble 86,4 % av prøvene klassifisert i rett klasse sammenlignet med referanseutførelsen. I tabell 2 vises en tilsvarende prøvefordeling hvor det er tatt hensyn til det indre avvik (± 5 %) i referanseutførelsen. Derigjennom ble andelen rett klassifiserte prøver 94,1 %.

Tabell 2

Fordeling (stk.) av melkeprøver i
ulike klasser for ureainnhold

Urea mg/100 ml	< 20	20-30	>30	
< 20	18	1	-	
20-30	1	40	1	
> 30	-	4	53	
Referanseutførelse totalt/stk.	19	45	54	118

Eksempel 3

Ureainnholdet i 64 melkeprøver ble bestemt ved hjelp av testpinner av type Azostix^R (Rierärztl. Prax. 1985, 13:559) beregnet for gårdsbruk, ovennevnte referanseutførelse, samt fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen. Resultatene vises tabellene 3 og 4.

Tabell 3

Fordeling (stk.) av melkeprøver i ulike klasser for ureainnhold ved hjelp av indikatorpinner

5

10

Urea mg/100 ml	< 20	20-30	>30	
< 20	7	-	-	
20-30	6	21	5	
> 30	-	1	24	
Referanseutførelse totalt/stk.	13	22	28	64

Ved hjelp av indikatorpinnene ble 82,8 % av prøvene (53/64) plassert i riktig klasse.

15

Tabell 4

Fordeling (stk.) av melkeprøver i ulike klasser for ureainnhold med fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen

20

25

Urea mg/100 ml	< 20	20-30	>30	
< 20	13	2	-	
20-30	-	17	2	
> 30	-	3	27	
Referanseutførelse totalt/stk.	13	22	29	64

Med fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen ble 89,1 % av prøvene (57/64) plassert i riktig klasse.

30

Eksempel 4

35

I et 4 ml kar ble det tilsatt 0,5 ml av den i eksempel 1 nevnte buffer/indikatorblanding I i flytende form, dvs. uten alginat. Karets munning ble dekket med en teflon-folie med en porestørrelse på 0,5 μ m. I et annet tilsvarende kar ble det tilsatt 0,2 ml melk og ca. 15 U urease. Etter 2,5 min. ble det tilført 200 μ l 0,1M NaOH. Karet med buffer/indikatorblandingen og karet med prøven og de øvrige reagenser ble forenet ved at munningene ble stilt mot hverandre og

karene tapet sammen slik at det ble oppnådd et helt lukket rom hvor en gassgjennomtrengelig folie skilte buffer/indikatorblanding fra de øvrige reagenser. De således forenede kar fikk stå i kontakt i ett min, hvorefter indikatorblandingens farge ble avlest. En parallell bestemmelse ble utført med den i eksempel 1 nevnte buffer/indikatorblanding II i flytende form. Resultatet ble tolket på samme måte som i eksempel 1. Ureainnholdet for 24 melkeprøver ble bestemt. 87,5 % av prøvene ble plassert i riktig klasse. Resultatene er vist i tabell 5.

Tabell 5

Fordeling (stk.) av melkeprøver i
ulike klasser for ureainnhold

Urea mg/100 ml	< 20	20-30	> 30	
< 20	6	-	-	
20-30	1	8	1	
> 30	-	1	7	
Referanseutførelse totalt/stk.	7	9	8	24

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for bestemmelse av ureainnhold i
5 en prøve, spesielt i melk, ved hjelp av urease, base og en
indikator,
k a r a k t e r i s e r t v e d at i det minste omsetnin-
gen med basen utføres i et lukket rom hvor et indikatorsystem
er plassert slik at det ikke kommer i kontakt med de øvrige
10 reagenser.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at i det minste omsetnin-
gen med basen utføres i lukket kar hvor indikatorsystemet er
15 plassert i karets lokk.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at bestemmelsen utføres
som en dobbelttest ved at det anvendes et indikatorsystem som
20 omfatter to buffer/indikatorblandinger som forandrer farge ved
ulike pH-verdier.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den ene buffer/-
25 indikatorblanding forandrer farge når ureainnholdet er minst
20 mg/100 ml og den andre buffer/indikatorblanding forandrer
farge når ureainnholdet overstiger 30 mg/100 ml.

5. Fremgangsmåte ifølge krav 4,
30 k a r a k t e r i s e r t v e d at buffer/indikatorbland-
ingene inneholder to fosfatbufferer av forskjellig konsentra-
sjon.

6. Fremgangsmåte ifølge krav 5,
35 k a r a k t e r i s e r t v e d at fosfatbufferene inne-
holder natriumsalt av fenolrødt og natriumsalt av bromtymol-
blått i vektforholdet 1:1.

7. Prøveanordning for bestemmelse av urea ved hjelp av urease, base og en indikator,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter et lukket rom hvor i det minste omsetningen med basen finner sted og
5 hvor et indikatorsystem er plassert slik at det ikke kommer i kontakt med de øvrige reagenser.

8. Prøveanordning ifølge krav 7,
k a r a k t e r i s e r t v e d at indikatorsystemet er i
10 fast form.

9. Prøveanordning ifølge krav 7,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter et gjenlukkbart kammer med indikatorsystemet plassert i lokket og de
15 øvrige reagenser på bunnen.

10. Prøveanordning ifølge krav 7,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter de reagenser ifølge krav 3-6 som er nødvendige for å utføre en
20 dobbelttest.

25

30

35