ČESKÁ A SLOVENSKÁ FEDERATIVNÍ REPUBLIKA
(19)

FEDERÁLNÍ ÚŘAD PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

269 879

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.[4] C 12 Q 1/32

(21) PV 5032 - 87.V
(22) Přihlášeno 03 07 87

(40) Zveřejněno 13 10 89
(45) Vydáno 18 02 91

(75) Autor vynálezu
SKURSKÝ LADISLAV doc.RNDr. CSc.,
SVOBODA VLASTIMIL ing.,
NOVOTNÁ RŮŽENA,
PECHMANN VLADIMÍR, BRNO,
ROČEK JAROSLAV RNDr., NEDVĚDICE,
ANDRYS CTIBOR RNDr., HRADEC KRÁLOVÉ

(54) Přípravek k enzymovému stanovení koncentrace alkoholu v biologických tekutinách

(57) Řešení se týká přípravku k enzymovému stanovení koncentrace alkoholu v biologických tekutinách obsahující alkoholdehydrogenasu, nikotinamidadenindinukleotid a tlumič o pH 4,5 až 10,5, který dále obsahuje chromogenní systém určitého složení se čtyřmi substituenty až osmi substituenty. Jako stabilizátor obsahuje přípravek monosacharid nebo oligosacharid a/nebo přirozenou nebo syntetickou polymerní látku. Tento přípravek lze provést jako soupravu činidel, tabletový nebo proužkový test k detekci alkoholu v dechu, slinách nebo krevním séru.

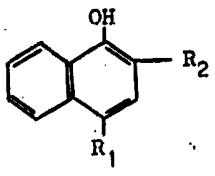
CS 269 879 B1

Stanovení relativně nízkých koncentrací alkoholu v biologických tekutinách, zejména v krvi, patří mezi velmi časté operace v biochemické a zvláště forenzní analyze. Tradičně se pro tento účel užívá takzvaná Widmarkova zkouška, založená na vydestilování těkavého alkoholu z vyšetřovaného vzorku do oxidační směsi a stanovení úbytku oxidačního činidla, který je úměrný množství alkoholu (viz E.M.Widmark, Biochem. Ž. 131, 473-483/1922). I když tato metoda je prozatím v řadě zemí uznávána jako jedině platná pro forenzní účely, byly v průběhu let vypracovány a zvedeny do praxe modernější, jednodušší a mnohdy i specifičtější postupy. Nejjednodušší a zcela spolehlivé je například stanovení plynově chromatografické, které bylo také v některých zemích připuštěno pro soudní analyzy. Vedle toho se však v poslední době stále více prosazují metody enzymového stanovení alkoholu, jejichž nesporná výhoda tkví v prvé řadě v jednoduchosti, citlivosti a značné specifičnosti. Tyto metody jsou vesměs založeny na oxidaci alkoholu za přítomnosti enzymu alkoholdehydrogenasy (E.C. 1.1.1.1.) za současné redukce koenzymu nikotinamidadenindinukleotidu (NAD) na jeho redukovanou formu (NADH). Přírůstek NADH, úměrný obsahu alkoholu se při tom stanoví změřením charakteristické absorbance při 340 nm (viz. T. Büchner, H. Redetzki, Klin. Wschr. 29, 615/1951). Tato metoda se také stala základem některých průmyslově vyráběných souprav pro stanovení alkoholu v krvi.

Významného zvýšení citlivosti uvedené enzymové metody bylo dosaženo spřažením tvorby NADH s jeho reoxidací pomocí p-nitrosodimethylanilinu, který se redukuje na produkt - pravděpodobně chinondiiminový kation-, reagující s fenoly nebo naftoly za vzniku intenzivně zbarvených indanilinových barviv. Intenzita vzniklého zbarvení je potom mírou alkoholu ve vyšetřovaném materiálu (viz. J. Kovář, a kol. Anal. Biochem. 137. 74-79/1984).

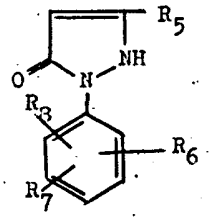
Tato modifikace enzymového stanovení je oproti dříve vyvinutým postupům výhodnější tím, že k jejímu provedení je zapotřebí podstatně méně drahých preparátů, jako je enzym alkoholdehydrogenasa a NAD. Její nevýhodou je však opět skutečnost, že při aplikaci na stanovení alkoholu v biologických kapalinách a materiálech, jako je například krev, je nutné tyto materiály derpoteinovat, což ovšem celý postup značně komplikuje a prodlužuje.

Tento problém řeší předložený vynález. Jeho podstata spočívá v tom, že přípravek dále obsahuje chromogenní systém sestávající ze substituovaného p-nitrosoanilinu jako například p-nitroso-N-alkyl- nebo p-nitroso-N,N-dialkylanilin v němž alkyl může obsahovat 1 až 4 atomy uhlíků nebo p-nitroso-N-aryl- nebo nitroso-N,N-diarylanilin, ve kterém aryl znamená fenyl nebo tolyl a pasivní kopulační komponenty, například substituovaný 1-naftol obecného vzorce I,



I.

ve kterém R_1 je vodík nebo halogen nebo sulfoskupina nebo alkoxyl o počtu uhlíků 1 až 12 nebo popřípadě dále substituovaná fenoxyskupina a R_2 je karboxyl nebo skupina $-CONR_3R_4$, ve které substituenty R_3 a R_4 jsou stejné nebo rozdílné atomy nebo skupiny jako vodík, alkyl o počtu atomů uhlíku 1 až 18 nebo karboxyalkyl o počtu uhlíku 1 až 5 nebo substituovaný 5-pyrazolon obecného vzorce II



II.

ve kterém R_5 je vodík nebo alkyl o počtu uhlíku 1 až 4 nebo oxoskupina a substituenty R_6 až R_8 představují nezávisle na sobě vodík nebo halogen nebo sulfoskupinu a který dále obsahuje tlumič o pH 4,5 až 10,5 a jako stabilizátor mono- nebo oligosacharid, jako například glukosu, fruktosu, rhamnosu nebo sacharosu a/nebo přirozenou nebo syntetickou polymerní látku jako například želatinu, albumin, škrob, karboxymethylcelulosu, methylhydroxy-propylcelulosu, polyvinylpyrrolidon nebo polyvinylalkohol.

Přípravek pro stanovení alkoholu podle tohoto vynálezu může být proveden buď ve formě soupravy činidel, sloužící k spektrofotometrickému určení koncentrace alkoholu v roztoku podle absorbance vzniklého chinoniminového barviva, nebo může být koncipován jako tabletový nebo proužkový test, to je v provedení, ve kterém všechna činidla potřebná k průběhu barevné analytické reakce jsou v prostředku obsažena v pevné fázi, popřípadě zakotvena na vhodném nasákavém nosiči. Stanovení alkoholu pomocí takovýchto přípravků se potom provede velmi jednoduše tak, že se kapka například krevního séra nebo slin nanese na proužek nebo tabletu a po určité době se vzniklé zbarvení porovná se zkusmo zhotovenou barevnou stupnicí, jejíž jednotlivá barevná pole odpovídají určitým koncentracím alkoholu. Dalším možným způsobem aplikace tohoto vynálezu může být detekční trubička ke stanovení obsahu par alkoholu v dechu. Reakční soustava je v tomto případě nanesena na vhodný nosič, kterým je naplněna skleněná trubička. Po průchodu vydechnutého vzduchu dojde k barevné změně náplně trubičky. Tato změna se vyhodnotí porovnáním se zkusmo zhotovenou barevnou stupnicí.

Tyto různé možnosti provedení přípravku k enzymovému stanovení koncentrace alkoholu podle vynálezu ilustrují blíže následující příklady.

Příklad 1

Souprava činidel pro spektrofotometrické stanovení alkoholu :

Činidlo č. 1

Alkoholdehydrogenasa (z koňských jater)	2,0	ukat
Nikotinamidadenindinukleotid (NAD)	50,0	mg
Polyvinylalkohol	500,0	mg
Pyrofosfátový tlumič o pH 8,5, 0,1 M roztok	50,0	ml

Činidlo č. 2

p-Nitroso-N-fenylanilin	25	mg
1-(4-sulfofenyl)-3-methyl-5-pyrazolon	14,0	mg
Pyrofosfátový tlumič o pH 8,5, 0,1 M roztok	50,0	ml

Při stanovení alkoholu se smíchá 0,5 ml. činidla č. 1 a 0,5 ml činidla č. 2, přidá se 5,0 /ul vyšetřovaného séra a po 5 minutách se změří absorbance při vlnové délce 530 nm proti slepému pokusu, ke kterému místo vzorku séra bylo přidáno 5,0 /ul vody. Podle zjištěné absorbance se obsah alkoholu v séru odvodí například pomocí zkusmo zhotovené kalibrační křivky. Touto metodou lze stanovit látkové množství alkoholu v rozmezí 0,01 až 0,1 /umolu s 5% přesností. Při vyšší koncentraci je nutno analyzovaný vzorek ředit.

Příklad 2

Diagnostické proužky ke stanovení alkoholu ve slinách

Impregnační roztok I

Alkoholdeydrogenasa (z koňských jater)	200 /ukat
Nikotinamidadenosindinukleotid (NAD)	0,40 g
Želatina	5,0 g
Polyvinylpyrolidon K 90	3,0 g
Polyvinylalkohol	5,0 g
Albumin (hovězí)	5,0 g
Sacharosa	10,0 g
Pyrofosfátový tlumič pH 8,5, 0,1 M	1 000,0 ml

Impregnační roztok II

N-Methyl-N-karboxymethylamid kyseliny 1-hydroxy-2-naftoové	1,0 g
p-Nitroso-N,N-dimethylanilin	2,0 g
Toluen	1 000,0 ml

Impregnační roztoky se připraví postupným rozpouštěním jednotlivých komponent v uvedeném pořadí. Na filtrační papír o plošné hmotnosti 180 g/m^2 se potom nanese impregnační roztok č. I do nasycení papíru a papír se vysuší proudem vzduchu zahřátého na 40° C, nebo ve vakuové sušárně nebo lyofilizací. Potom se na tento papír nanese obdobným způsobem impregnační roztok II a opět se papír vysuší. Takto naimpregnovaný papír se potom rozřeže na čtverečky 6 x 6 mm, které se nalepí například pomocí oboustranné samolepicí pásky na jeden konec podložky z bílé plastické hmoty o rozměrech 6 x 80 mm. Takto se získají testační proužka nesoucí na svém konci indikační zónu, která se po namočení do kapaliny obsahující alkohol, jako jsou například sliny nebo sérum barví zeleně až modře, přičemž odstín a intenzita tohoto zbarvení jsou přímo úměrné koncentraci alkoholu ve vyšetřované kapalině. Tato koncentrace se určí porovnáním vzniklého zbarvení se zkusmo zhotovenou barevnou stupnicí, jejíž jednotlivá barevná pole odpovídají určitým koncentracím alkoholu. Touto metodou lze rychle, bez přístrojových nároků stanovit koncentraci 0,1 až 1,0 promile alkoholu s přesností 0,2 promile ve zkoumaném vzorku. Finanční náklady na jedno stanovení jsou nižší, než u jiných přípravků, přičemž citlivost jiných přípravků je až od 0,5 až 0,6 promile a stanovení ruší například cigaretový kouř.

Příklad 3

Detekční tablety ke stanovení alkoholu

Tabletovací směs č. I

Alkoholdehydrogenasa (z koňských jater)	37,0 /ukat
Nikotinamidadenindinukleoid	1,0 g
Sacharosa	1,0 g
Škrob bramborový	7,5 g
Talek	1,0 g

Pyrofosfátový tlumič o pH 8,5, 0,2 M roztok	10,0 ml

Tabletovací směs č. II

p-Nitroso-N,N-dimethylanilin	22,0 mg
N-Oktadecylamid kyseliny 1-hydroxy-4-sulfo-2-naftoové	20,0 mg
Talek	1,0 g
Škrob bramborový	9,0 g

Tabletovací směs č. I se připraví tak, že se v pyrofosfátovém tlumiči rozpustí alkoholdehydrogenasa, nikotinamidadenindinukleotid a sacharosa a roztokem se stejnoměrně zkropí zhomogenizovaná navážka škrobu a talku. Vzniklá pastovitá hmota se potom dokonale zhomogenizuje a potom se v tenké vrstvě dokonale vysuší ve vakuu při teplotě do 30° C.

Tabletovací směs č. II se připraví smícháním a důkladnou homogenizací všech tří komponent, předem jemně pomletých. Obě tabletovací směsi se potom smíchají a dokonale zhomogenizují a vzniklá směs se ihned ztabletuje na tablety o hmotnosti 100 až 200 mg.

Stanovení alkoholu pomocí těchto tablet se provádí tak, že se vyšetřovaný vzorek, jako sliny nebo sérum nanese v množství 50 µl na povrch tablety a po 3 minutách se vizuálně vyhodnotí vzniklé zelené až modré zbarvení tablety srovnáním se zkusmo zhotovenou barevnou srovnávací stupnicí.
Touto metodou lze rychle bez přístrojových nároků stanovit koncentraci alkoholu v rozsahu 0,1 až 1,0 promile s přesností 0,25 promile ve zkoumaném vzorku.

Příklad 4

Detekční trubička ke stanovení alkoholu v dechu

Impregnační roztok I

Alkoholdehydrogenasa (z koňských jater)	200 µkat
Nikotinamideadenindinukleotid	0,40 g
Polyvinylpyrolidon K 90	0,1 g
Polyvinylalkohol	1,0 g
Albumin hovězí	0,1 g
Pyrofosfátový tlumič pH 8,5, 0,1 M	1 000,0 ml

Impregnační roztok II

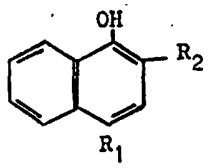
N-Methyl-N-karboxymethylamid kyseliny 1-hydroxy-2-naftoové	1,0 g
p-Nitroso-N,N-dimethylanilin	2,0 g
Toluen	1 000,0 ml

Impregnační roztoky se připraví postupným rozpouštěním jednotlivých komponent v uvedeném pořadí.
Na nosič Chromaton N zrnění 0,40 až 0,63 mm se rovnoměrně nanese impregnační roztok I, čímž se získá hustá kašovitá hmota. Po důkladné homogenisaci se tato hmota v tenké vrstvě vysuší ve vakuu při teplotě do 30° C.
Po usušení se produkt rozmělní na výchozí zrnění a stejným způsobem jako impregnační roztok I se nanese a vysuší na tomto produktu i impregnační roztok II.
Takto připravenou sypkou hmotou plníme skleněné trubičky, na jednom konci zatavené, o vnitřním průměru 5 mm sloupcem hmoty v délce 30 mm. Polohu sloupce v trubičce fixujeme porézními vložkami a potom se trubička ve vzdálenosti 50 mm od okraje sloupce hmoty zataví. Takto se získá detekční trubička v délce asi 10 cm.
Detekce alkoholu v dechu se provádí po odlomení obou konců detekční trubičky profouknutím známého objemu výdechu obsahujícího páry alkoholu. Tím dojde ke změně zbarvení náplně trubičky z intenzivně žluté barvy přes zelenou až na sytě modé zbarvení, podle koncentrace par alkoholu v dechu. Vyhodnocení koncentrace alkoholu se provede po-

rovnáním dosaženého zbarvení se zkusmo zhotovenou stupnicí barevných políček.
Touto metodou lze rychle bez nároků na měřicí přístroje detekovat alkohol v dechu, přičemž lze stanovit již koncentraci odpovídající 0,1 promile alkoholu v krvi vyšetřovaného. Tuto citlivost a rozsah detekce lze korigovat změnami v průměru trubičky, délkou sloupce náplně a zrnitostí nosiče.

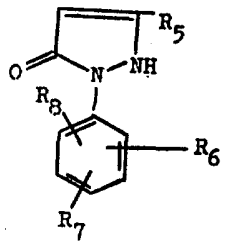
PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Přípravek k enzymovému stanovení koncentrace alkoholu v biologických tekutinách, obsahující alkoholdehydrogenasu, nikotinamidadenindinukleotid a tlumič o pH 4,5 až 10,5, vyznačující se tím, že obsahuje dále chromogenní systém, sestávající ze substituovaného p-nitrosoanilinu jako například p-nitroso-N-alkyl- nebo p-nitroso-N,N-dialkylanilin, ve kterém alkyl může obsahovat 1 až 4 atomy uhlíku nebo p-nitroso-N-aryl - nebo p-nitroso--N,N-diarylanilin, ve kterém aryl znamená fenyl nebo tolyl a pasivní kopulační komponenty, například substituovaný 1-naftol obecného vzorce I



I

ve kterém R_1 je vodík nebo halogen nebo sulfoskupina nebo alkoxyl o počtu uhlíků 1 až 12 nebo popřípadě dále substituovaná fenoxyskupina a R_2 je karboxyl nebo skupina - $CONR_3R_4$, ve které substituenty R_3 a R_4 jsou stejné nebo rozdílné atomy nebo skupiny jako vodík, alkyl o počtu atomů uhlíku 1 až 18 nebo karboxyalkyl o počtu atomů uhlíku 1 až 5 nebo substituovaný 5-pyrazolon obecného vzorce II



II

ve kterém R_5 je vodík nebo alkyl o počtu atomů uhlíku 1 až 4 nebo oxoskupina a substituenty R_6 až R_8 představují nezávisle na sobě vodík nebo halogen nebo sulfoskupinu.

2. Přípravek podle bodu 1, vyznačující se tím, že obsahuje jako stabilizátor monosacharid nebo oligosacharid, jako například glukosu, fruktosu, rhamnosu nebo sacharosu a/nebo přirozenou nebo syntetickou polymerní látku, jako například želatinu, albumin, škrob, dextran, karboxymethylcelulosu, methyl-hydroxypropylcelulosu, polyvinylpyrolidon nebo polyvinylalkohol.