



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

215110
(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
G 01 N 33/46

op. 31/22

(22) Přihlášeno 29 09 78
(21) (PV 6315-78)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 30 09 77
(P 27 44 046.6)
Německá spolková republika

(40) Zveřejněno 30 10 81

(45) Vydáno 15 10 84

(72)
Autor vynálezu

WERNER WOLFGANG dr., RITTERSDORF WALTER dr., MANNHEIM
(NSR)

(73)
Majitel patentu

BOEHRINGER MANNHEIM GmbH, MANNHEIM (NSR)

(54) Reagenční prostředek, zejména reagenční proužek ke stanovení
kyseliny močové v tělních tekutinách

1

2

Předmět vynálezu se týká reagenčního prostředku, zejména reagenčního proužku, pro stanovení kyseliny močové v tělních tekutinách.

Reagenční prostředek obsahuje jako indikátor radikál příslušného azinu, pufr, s výhodou citrátový nebo ftalátový, pro nastavení hodnoty pH na 3 až 7, s výhodou 4 až 6, smáčedlo, například laurylfosfát, dioktylsulfosukcinát, laurylpolyglykoléter nebo laurylpyridiniumchlorid a zahušťovadlo alginát, ether celulózy nebo karboxymethylcelulózu.

Účelem vynálezu je rychlé stanovení kyseliny močové, což je důležité zejména pro diagnózu dny a jiných onemocnění, při nichž je ovlivňován metabolismus purinových derivátů.

Vynález se týká rychlého diagnostika ke stanovení kyseliny močové v tělních tekutinách, zejména v krvi a séru.

Stanovení kyseliny močové v krvi, popřípadě v séru je velmi důležité pro diagnózu dny a jiných onemocnění, při nichž je ovlivňován metabolismus purinových derivátů. V lidské krvi je obvykle obsaženo až 7 mg kyseliny močové/100 ml, při patologických stavech může však tato hodnota vystoupit na dvojnásobek až trojnásobek.

Je známo velké množství kvantitativních mokřých způsobů, které jsou v podstatě založeny na dvou metodách: a) reakce, při nichž se používá kyseliny močové jako redukčního činidla, například redukce kyseliny fosfowolframové a kolorimetrické vyhodnocení vzniklého modrého zbarvení, b) enzymové stanovení kyseliny močové urikázou, při kterém vzniklý peroxid vodíku oxiduje v přítomnosti peroxidázy chromogen na barvivo, jehož hloubka zbarvení je mírou koncentrace přítomné kyseliny močové. Tyto způsoby jsou však většinou poměrně nákladné a kromě toho náročné na čas, protože před reakcí musí být odstraněny všechny bílkoviny obsažené v séru. Tohoto času nejpřesnější způsob, který popsal Kageyama [Clin. Chim. Acta 31, 421, 1971], a který je založen na enzymovém stanovení pomocí urikázy, vyžaduje celkovou dobu analýzy asi 75 minut.

Nechyběly tudíž pokusy vyvinout rychlé diagnostikum pro stanovení kyseliny močové. Jako rychlá diagnostika se zde míní pomůcky, které dovolují rychlé a nekomplikované stanovení požadovaných látek, například neškoleným personálem. Jsou to většinou savé nosiče, které jsou napojeny příslušnými reagensy nebo vodovzdorné filmy, do kterých jsou reagensy vpraveny. Ponoření nebo pokapání zkoušenou tekutinou vyvolá změnu barvy, kterou lze hodnotit například pomocí srovnávacích barev.

Tak je v USA patentu č. 3 536 448 popisováno rychlé diagnostikum, které se skládá ze dvou papírků, které jsou slepeny a potaženy ochrannou vrstvou. Jeden papírek přitom obsahuje kyselinu etyléndiamintetraoctovou, wolframan sodný a síran hydrazinu, druhý papírek fosfowolframan. Toto rychlé diagnostikum dovoluje však jenom kvalitativní důkaz kyseliny močové a neposkytuje žádnou indikaci případných patologických stavů.

V britském patentu č. 1 282 089 jsou popisovány papírky, které obsahují soli trojmocného železa, persíran a 2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazin nebo 2,2':6',2''-terpyridyl.

Předpokládá se, že soli trojmocného železa tvoří komplexy s triazinem nebo terpyridylem, které jsou potom redukovány kyselinou močovou v komplexy dvojmocného železa, přičemž dochází ke změně barvy, která je přímo úměrná koncentraci kyseliny

močové. Tyto papírky jsou však velice citlivé na světlo, tudíž málo vhodné pro praktické využití.

Podle japonského patentu č. 9096—789 se namáčí do séra obsahujícího kyselinu močovou papírek, který obsahuje urikázu a pomocné látky. Když urikáza zoxiduje kyselinu močovou na peroxid vodíku a alantoin, přitiskne se tento papírek na jiný papírek, který obsahuje peroxidázu a o-tolidin. Peroxid vodíku přitom reaguje s o-tolidinem za vzniku barviva. Je jasné, že tento způsob je zdlouhavý a vzhledem k nezbytným difúzním procesům z jednoho papírku na druhý nemůže být příliš přesný.

Zatímco výše uvedená rychlá diagnostika využívá principu přímého kolorimetrického stanovení, při němž vzniklé zbarvení je úměrné koncentraci měřené kyseliny močové, je v německém patentu č. 2 550 634 popsán princip testu „inverzní kolorimetrie“. Při něm se nanáší předem určené množství barevného indikátoru na pevný netečný nosič. Hodnocená látka odbarvuje indikátor tak, že odbarvení je úměrné množství stanovené látky. Překročení kritické mezní koncentrace stanovené látky lze touto metodou velice přesně určit pomocí úplného odbarvení odpovídajícího množství indikátoru.

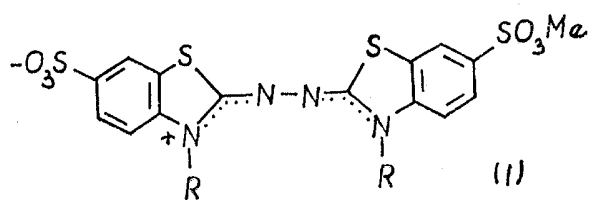
V německém patentu č. 2 550 634 je popisováno rychlé diagnostikum pro stanovení kyseliny močové v krvi. Pro tento účel se impregnuje papír ze skelných vláken jódem, jodidem draselným a škrobem a dalším impregnováním se potahuje membránou z kolodia a další membránou z kolodia a pevného uhlíčitánu sodného. Krev obsahující kyselinu močovou odbarvuje jódškrobový komplex, po smytí krve lze hodnotit stupeň odbarvení. Koncentraci jódškrobového komplexu lze nastavit tak, že přesně odpovídá právě patologickému množství kyseliny močové a umožňuje kladné nebo záporné rozhodnutí. Pomocí dalších zkušebních oblastí s jinými koncentracemi jódu lze provádět odstupňovaná hodnocení. To samo o sobě použitelné diagnostikum má však podstatné nevýhody: trojnásobná impregnace je velmi nákladná. Vypustí-li se druhá membrána, musí být zkoušená tekutina předem zalkalizována, což je pro uživatele nevýhodné. Kromě toho testovací proužek není skladovatelný, protože jód při styku se stopami alkálie disproportionuje.

Existovala tudíž potřeba vyvinout jednoduše vyrobitelné a použité stabilní, rychlé diagnostikum ke stanovení kyseliny močové v séru a zejména v krvi.

S překvapením bylo nyní zjištěno, že rychlou diagnózu kyseliny močové v séru nebo v krvi lze provádět pomocí reagenčního prostředku, především reagenčního proužku, na bázi inverzní kolorimetrie.

Podstata reagenčního prostředku, zejména reagenčního proužku, ke stanovení kyseliny močové v tělních tekutinách spočívá

v tom, že obsahuje jako indikátor radikál obecného vzorce I



ve kterém znamenají

R metylovou nebo etylovou skupinu a Me atom sodíku nebo lithia nebo amoniou skupinu, příslušného azinu, pro nastavení hodnoty pH na 3 až 7, s výhodou na 4 až 6, pufr, například citrátový nebo ftalátový, a dále smáčedlo, například laurylfosfát, dioktysulfosukcinát, laurylpolyglykoléter, nebo laurylpyridiniumchlorid a zahušťovadlo, například alginát, éter celulózy nebo karboxymethylcelulózu.

Radikály obecného vzorce I jsou tmavě zbarvené sloučeniny, které jsou redukovány kyselinou močovou v bezbarvé aziny. Při předem daném množství radikálů představuje stupeň odbarvení míru koncentrace kyseliny močové. Skutečnost, že radikály podle vynálezu dovoluují stanovení kyseliny močové pomocí rychlých diagnostik nebyla předvídatelná. Bylo jenom známo, že kyselina močová reaguje nějakým způsobem s radikálem obecného vzorce I, protože například při stanovení glukózy podle německého patentu č. 1 648 840 a 2 042 828 ruší kyselina močová při oxidaci příslušných azinů v radikál: bylo však rovněž známo, že toto rušení není stechiometrické (D. Eberhardt se spol. Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 9, 362 až 363, 1971). Bylo tedy nutno předpokládat, že aziny a radikály obecného vzorce I nejsou vhodné pro kvantitativní stanovení kyseliny močové.

Rychlá diagnostika podle vynálezu lze připravovat následujícím způsobem:

Pro rychlý test na kyselinu močovou v séru lze použít jako svého nosiče papíru nebo rouna. Filtrační papír se tedy impregnuje radikálem obecného vzorce I, dále pufrům, jakož i obvyklými pomocnými látkami jako smáčedly, zahušťovadly atd.

Pro rychlý test na kyselinu močovou v celé krvi lze výše zmíněné papíry potom impregnovat v organických rozpouštědlech étery celulózy, popřípadě estery celulózy, např. podle německého patentu č. 1 277 019 nebo vosky podle německého patentu č. 1 598 048. Vytvořená membrána a popřípadě i hydrofobizace zkušební papírku dovoluují potom smytí krve. Vhodnější je však vpravovat radikály obecného vzorce I do vodovzdorných filmů podle německého patentu č. 1 598 153, ze kterých stačí krev jenom setřít.

Radikály obecného vzorce I lze připravovat jako substance, a to oxidací přísluš-

ných azinů jódem, octanem olovičitým, kyslíčným olovičitým nebo jinými vhodnými oxidačními činidly (srovnej například Hünig, Liebigs Ann. Chem. 676, 36 až 51, 1964). Lze je však pomocí těchto oxidačních činidel nebo peroxidem vodíku a proxidázou vytvářet přímo v impregnačním roztoku. Množství radikálů, kterých se používá v recepturách, se řídí množstvím kyseliny močové, která má být stanovena, lze je stanovit snadno empiricky.

K udaným recepturám je účelné přidávat ještě příslušné aziny, aby se bezpečně zamezilo případné disproportionaci radikálů.

Takové disproportionaci lze zamezit dále přidáním neutrálních anorganických solí alkalických kovů, jako chloridů, bromidů, sulfátů a jiných.

Jako pufrů přicházejí v úvahu obvyklé systémy pro rychlé testy, jako například citrátový, ftalátový aj. Protože podle okolností při použití většího množství radikálů (pro vyšší koncentrace kyseliny močové) může docházet k vysolovacím efektům, je občas účelné u výše uvedených pufrů jako kation používat lithium.

Hodnota pH pufru se má pohybovat mezi 3 a 7, s výhodou mezi 4 a 6. Vyšší hodnoty pH jsou neúčelné, neboť způsobují rozpad radikálů.

Jako smáčedla přicházejí v úvahu obvyklá smáčedla neiontogeni, aniontová a kationtová, jako například laurylsulfát, dioktysulfosukcinát, laurylpolyglykoléter, laurylpyridiniumchlorid a další.

Jako zahušťovadla lze používat algináty, étery celulózy, karboxymethylcelulózu apod.

Jako disperzí na bázi umělých hmot pro výrobu zkušebních filmů, lze používat těch, které jsou popsány v německém patentu č. 1 598 153, s výhodou polyvinylpropionátu, -acetátu a jejich směsných polymerů.

Zkušební papírky, popřípadě zkušební filmy, se vyrábějí obvyklým způsobem, řezou se na malé čtverečky (například 6 × 6 mm) a přilepí, přivaří nebo jinak upevní na tyčinkovité nosiče, s výhodou na fólie. Zkušební tyčinky jenom s jednou zkušební plochou jsou vhodné především k měření pomocí jednoduchých reflexních fotometrů nebo k vizuálnímu srovnání se srovnávacími barvami. Zvláště výhodné je však nanášet na testovací tyčinku více zkušebních ploch se stoupající koncentrací radikálů. Přitom se získává po nanesení hodnocené kapaliny celá řada úplně a částečně odbarvených a vůbec neodbarvených zkušebních ploch, ve kterých lze rozeznat jednoznačně i bez srovnávacích barev ekvivalenční bod, tj. bod právě vzniklého odbarvení.

V příkladech bude vynález blíže vysvětlen, přičemž bude používáno následujících zkratk:

Radikál A = radikál diamonné soli kyseliny

ny azino-bis-N-etylbenzthiazolon-disulfonové

Radikál B = radikál dvojlithné soli kyseliny azino-bis-N-etyl-benzthiazolon-disulfonové

Složení

Disperze polyvinylacetátpropionátu
Alginát sodný, 1,85 % v 0,5 M pufru fosforečnanu sodného, pH 5,6
Radikál A (33,8 %)
Dvojamonná sůl kyseliny azino-N-etylbenzthiazolon-disulfonové ve 22 ml vody
Dioktysulfosukcinát sodný v 8 ml metanolu

Radikál C = radikál dvojlithné soli kyseliny azino-bis-N-methylbenzthiazolon-disulfonové

Příklad 1

45 g

35 g

x g

y g

0,75 g

Receptura	a	b	c	d	e	f	g
x	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,1 g
y	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50	0,60 g

Složky byly důkladně smíchány a k odstranění vzdušných bublin byly odstředěny po dobu 5 minut při 1500 ot/min. Filmy tlusté 0,38 mm byly potom natřeny na polykarbonátovou fólii a 30 minut sušeny při teplotě 50 °C. Povrstvené materiály byly nařezány na 6 mm široké pásy a připevněny ve vzdálenosti 1 mm vedle sebe na polyesterovou fólii. Ta byla nařezána na 6 mm široké tyčinky, takže se získaly zkušební pásy, které obsahovaly vedle sebe sedm zkušebních ploch a až g. Na zkušební pásy byla nakapána séra, která obsahovala 2, 4, 6, 8 a 10 mg kyseliny močové/100 ml a po 5 minutách otřena.

Byl získán následující výsledek:

Složení

Disperze polyvinylacetátpropionátu
Alginát sodný, 1,85 % v 0,5 M pufru citranu lithného, pH 6
Radikál B (35,1 %)
Dvojlithná sůl kyseliny azino-N-etyl-benzthiazolon-disulfonové
Fluorované neionogenní smáčedlo (Forafac 1110)
Destilovaná voda

45 g

35 g

0,2 g

0,2 g

0,2 g

20 ml

Hmota byla smíchána jako v příkladu 1, odstředěna, natřena a sušena.

Po rozstříkání byly analogicky podle příkladu 1 vyrobeny zkušební pásy, které měly pouze jednu zkušební plochu.

Sérum

mg/100 ml

2 žádná zkušební plocha dokonale odbarvená

4 odbarvení zkušební plochy a a b

6 odbarvení zkušební plochy a až d

8 odbarvení zkušební plochy a až f

10 odbarvení všech zkušebních ploch

Obsah kyseliny močové lze tedy snadno odhadnout následujícím způsobem: mg kyseliny močové/100 ml = počet odbarvených zkušebních ploch + 2.

Příklad 2

Zkušební plocha byla pokapána krví obsahující kyselinu močovou, po 1 minutě otřena a změřena na komerčním reflexním fotometru (Rēflomatu).

Výsledek je shrnut v tabulce 1:

mg % kyseliny močové	Díly stupnice
0	45
2	42
3	38,5
4	35
5	32
6	28
7	23,5
8	21,5
9	19
10	16
11	13,5
12	9

Příklad 3

Filtrační papír (Schleicher a Schüll 2316
byl impregnován roztokem následujícího
složení a sušen při teplotě 50 °C:

Pufr citranu sodného, pH 6, 0,5 molární	50 ml
Radikál C (32,5 %)	0,175 g
Dvojlithná sůl kyseliny azino-bis-N-metyl- benzthiazolondisulfonové	0,2 g
Laurylpolyoxyetylénéter	0,1 g
Destilovaná voda	100 ml
do	

Papír se nařeže na 6 mm široké pásky a nalepí pomocí vhodného lepidla na polystyrenovou fólii. Ta se nařeže na 6 mm široké tyčinky, které mají na spodním konci čtvercovou zkušební plochu.

Zkušební tyčinky se namáčejí do séra obsahujícího kyselinu močovou a po 60 vteřinách hodnotí. Sérum s 8 mg kyseliny močové/100 ml způsobí úplné odbarvení, za-

tímco sérum se 7 mg/100 ml nechává ještě zelené zbarvení. Je-li při 7 mg/100 ml žádoucí úplné odbarvení, musí se navážít 0,155 gramu radikálu; pro 9 mg je zapotřebí 0,195 g. Tímto způsobem lze tudíž nastavit každou žádanou prahovou hodnotu.

Příklad 4

Složení

Disperze polyvinylacetátpropionátu	45 g
Alginát sodný, 1,5 % v 0,2 M vodném roztoku bromidu amonného	35 g
Radikál A (99,5 %)	210 mg
Dvojamonná sůl kyseliny azino-bis-N-etyl- benzthiazolon-disulfonové	1,05 g
Fluorované neiontogenní smáčedlo	0,2 g
Destilovaná voda	14,0 ml
nastavená 0,5 M amoniakem na hodnotu pH 5	

Z této hmoty byly vytaženy 0,2 mm tlusté filmy, které byly sušeny 30 minut při teplotě 50 °C a analogicky podle příkladu 2 dále zpracovány na zkušební (reagenční) proužky s jednou zkušební plochou.

Na zkušební plochu se nakape sérum s

obsahem kyseliny močové, po 5 minutách se otře a potom se měří na běžném komerčním remisním fotometru (Zeiss, PMQ III) při 620 μm .

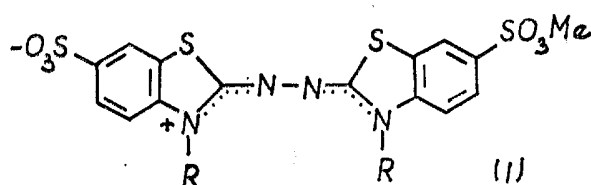
Výsledek je shrnut v tabulce 2:

Tabulka 2

mg % kyseliny močové	m	% remise	s
4,1	32,8		0,36
6,0	37,2		0,7
8,1	43,5		0,49
10,4	52,2		0,64
12,4	57,5		0,35

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Reagenční prostředek, zejména reagenční proužek, ke stanovení kyseliny močové v tělních tekutinách na principu inverzní kolorimetrie, vyznačující se tím, že obsahuje jako indikátor radikál příslušného azinu, obecného vzorce I



ve kterém znamenají

R metylovou nebo etylovou skupinu a
Me atom sodíku nebo lithia nebo amoniovou skupinu, pro nastavení hodnoty pH na

3 až 7, s výhodou na 4 až 6 pufr, například citrátový nebo italátový, a dále smáčedlo, například laurylfosfát, dioktylsulfosukcinát, laurylpolyglykoléter nebo laurylpyridiniumchlorid a zahušťovadlo, například alginát, éter celulózy nebo karboxymetylcelulózou.

2. Reagenční prostředek podle bodu 1, vyznačující se tím, že reagentie jsou vpraveny v svůj nosič, například v papír.

3. Reagenční prostředek podle bodu 1, vyznačující se tím, že reagentie jsou vpraveny ve film z umělé hmoty, například v polyvinylacetátpropionátu.

4. Reagenční prostředek podle bodů 1 až 3, vyznačující se tím, že na nosiči jsou upevněna vedle sebe alespoň dvě testovací políčka se vzájemně odlišným množstvím indikátoru.