UF

ČESKÁ A SLOVENSKÁ FEDERATIVNÍ REPUBLIKA
(19)

FEDERÁLNÍ ÚŘAD PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU
K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

271 851
(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.[5]
G 01 N 31/22

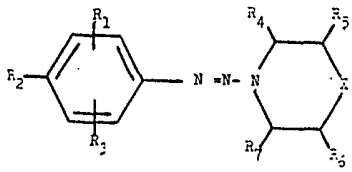
(21) PV 6648-86.G
(22) Přihlášeno 15 09 86

(40) Zveřejněno 14 03 90
(45) Vydáno 16 09 91

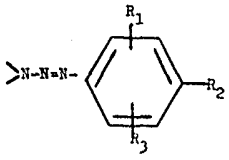
(75) Autor vynálezu BEŇOVSKÝ PETR RNDr.;
SVOBODA VLASTIMIL ing.; BRNO

(54) Stabilní diagnostické přípravky ke stanovení azokopulovatelných látek v biologických kapalinách a materiálech

(57) Podstatou řešení je složení a způsob přípravy stabilního diagnostického přípravku ke stanovení azokopulovatelných látek; zejména bilirubinu a urobilinogenu v biologických kapalinách a materiálech. Přípravky obsahují popřípadě vhodnou minerální nebo organickou kyselinu a/nebo kysele reagující sůl; dále obsahují benzenazosloučeninu obecného vzorce I a/nebo II; v němž substituenty R_1 až R_3 jsou stejné nebo rozdílné atomy nebo skupiny a R_4 až R_7 značí nezávisle na sobě vodík; nižší alkyl nebo oxoskupinu a X značí atom uhlíku, kyslíku nebo dusíku. Ve srovnání s dosud známými přípravky vyniká řešení podstatně vyšší stabilitou; umožňuje přípravu prostředků; které dosud nebylo možné vůbec vyrobit vzhledem ke značné nestabilitě některých diazonizových solí a lze je použít jak ke spektrofotometrickému stanovení látek v roztoku; tak i ve formě tablet nebo diagnostických proužků.



(I)



(II)

CS 271851 B1

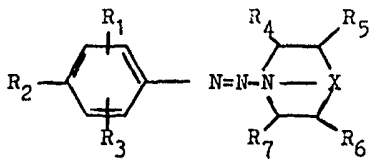
Vynález se týká složení a způsobu přípravy stabilního diagnostického přípravku ke stanovení azokopulovatelných látek, zejména bilirubinu a urobilinogenu v biologických kapalinách a materiálech.

Kvalitativní detekce a kvantitativní stanovení různých součástí biologických kapalin a materiálů, jako například moče, séra, mozkomíšního moku, stolice a podobně se stalo v posledních desetiletích jednou z nejdůležitějších diagnostických metod, sloužících nejen k potvrzení nebo upřesnění konečné diagnosy, ale umožňující v mnoha případech stanovit diagnostiku onemocnění ještě dříve, než dojde k jeho klinické manifestaci. Mezi významná vyšetření tohoto druhu patří mimo jiné i stanovení látek, poskytujících výrazné, specifické a kvantitativně probíhající azokopulační reakce s diazoniovými solemi. Typickými představiteli takovýchto azokopulačních látek v biologických kapalinách a materiálech jsou dvě hlavní žlučová barviva, bilirubin a urobilinogen. Jejich důkaz a stanovení například v moči, séru nebo stolici představuje významný prostředek při stanovení diagnosy různých krevních, jaterních nebo žlučových poruch a onemocnění.

Pro stanovení obou uvedených látek azokopulační reakcí byla v minulosti navržena celá řada aromatických diazoniových solí: z nich se však jako nejvhodnější ukázaly - a jsou také nejvíc užívány - diazoniové soli odvozené od anilinu, substituované na benzenovém jádře buď elektronakceptorními atomy, nebo skupinami, jako halogeny, sulfoskupinou nebo nitroskupinou pro stanovení bilirubinu, nebo skupinami elektrondonorními, jako hydroxyl, alkyly, alkoxyly a podobně pro stanovení urobilinogenu. Společnou nevýhodu všech těchto diazoniových solí je však jejich obecně známá malá stabilita vůči světlu, vlhkosti a jiným vlivům, takže pro provedení příslušných stanovení bilirubinu nebo urobilinogenu je potřebné tyto diazoniové soli připravovat čerstvě těsně před použitím. Poněkud lepší situace je u diagnostických přípravků používaných v pevné fázi, tj. u tabletových testů nebo tzv. diagnostických proužků. V těchto přípravcích jsou diazoniové soli, stabilizované jako tetrafluoroborátové, chlorzinečnaté nebo arylsulfonátové soli, sice poněkud stabilnější, avšak i zde je nutné během skladování přípravky velmi pečlivě chránit před světlem a vzdušnou vlhkostí, aby nedošlo k poměrně rychlému rozkladu a znehodnocení přípravků.

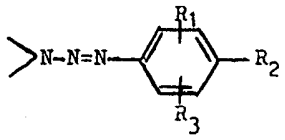
Prvním pokusem o odstranění tohoto nedostatku byl vynález, popsaný v britském patentu 1;117;250. Podle tohoto vynálezu je v tabletových nebo proužkových testech, určených ke stanovení bilirubinu v moči nebo séru, nahražena diazoniová sůl příslušným triazenem, který je v přípravku dokonale stabilní. Nevýhodou tohoto řešení byla však skutečnost, že na tabletu nebo proužek bylo nutné po nanesení vzorku nanést také silnou minerální kyselinu, kterou se triazen převedl na reakce schopnou diazoniovou sůl. V tomto ohledu bylo výhodnější řešení podle čs. autorského osvědčení č. 200 564, ve kterém byly popsány diagnostické proužky, obsahující vedle příslušného triazenu již i vhodnou kyselinu, takže proužky byly schopné poskytovat reakci s bilirubinem nebo urobilinogenem přímo, bez nutnosti další operace, tj. nanesení silné kyseliny. Nevýhodu tohoto řešení však byla opět skutečnost, že příprava těchto proužků byla značně obtížná, protože v průběhu přípravy těchto proužků bylo nutné zabránit styku triazenu s kyselinou, aby k přeměně triazenu na diazoniovou sůl nedošlo již v této fázi. Navrhované řešení, nanášet triazen z nevodného rozpouštědla na nosič s již nanesenou kyselinou bylo totiž použitelné jen pro některé triazeny, protože použité triazeny byly vesměs substituovány hydrofilními karboxylovými nebo sulfonovými skupinami, které značně snižovaly rozpustnost triazenů v nevodných rozpouštědlech.

Tento nedostatek řeší předložený vynález, jehož podstatou jsou diagnostické přípravky ke stanovení azokopulovatelných součástí biologických kapalin a materiálů, zejména bilirubinu nebo urobilinogenu, obsahující popřípadě minerální nebo organickou kyselinu a/nebo kyselé reagující sůl, dále obsahující benzenazosloučeninu obecného vzorce I



(I)

ve kterém substituenty R_1 až R_3 jsou stejné nebo rozdílné atomy nebo skupiny, jako vodík, halogen; nitroskupina, sulfoskupina, popřípadě N-acylovaná skupina amidosulfonová, hydroxyl; alkyl nebo alkoxyl s 1 až 3 atomy uhlíku; aralkosy se 7 až 8 atomy uhlíku, trifluormethyl-skupina; skupina-NH.R, ve které R je acetyl nebo benzoyl-skupina, R_4 až R_7 značí nezávisle na sobě vodík; nižší alkyl s 1 až 3 atomy uhlíku nebo oxoskupinu a X značí atom uhlíku, kyslíku nebo dusíku popřípadě substituovaného nižším alkylem o počtu uhlíkových atomů 1 až 4; nebo skupinu obecného vzorce II



(II)

ve kterém substituenty R_1 až R_3 jsou stejné nebo rozdílné atomy nebo skupiny; jako vodík, halogen; nitroskupina; sulfoskupina; popřípadě N-acylovaná skupina amidosulfonová; hydroxyl, alkyl nebo alkoxyl s 1 až 3 atomy uhlíku, aralkoxyl se 7 až 8 atomy uhlíku, trifluormethyl-skupina; skupina NH.R; ve které R je acetyl nebo benzoyl-skupina.

Benzenazosloučeniny obecného vzorce I; jejichž použití v diagnostických přípravcích tvoří hlavní předmět vynálezu; jsou látky dokonale stabilní jak vůči vzdušné vlhkosti, tak i vůči působení světla. V kyselém prostředí se však rozkládají za vzniku ekvivalentního množství příslušné benzendiazoniové soli; která potom vstupuje do vlastní azokopulační reakce. Příslušná kyselina nebo kyselé reagující látka může být s výhodou obsažena již v prostředku podle vynálezu; nebo může být přidána teprve v okamžiku provedení analýzy; tj. při vlastním použití prostředků podle vynálezu.

Diagnostické prostředky podle tohoto vynálezu jsou podle způsobu provedení použitelné jak pro spektrofotometrická stanovení, při kterých probíhá stanovení azokopulovatelných látek v roztoku, tak i ve formě tablet nebo diagnostických proužků. Ve všech těchto přípravcích je možné - podle druhu azokopulovatelné látky - použít benzenazosloučeniny obecného vzorce I substituované na benzenovém jádře nejrůznějšími substituenty R_1 až R_3 podle výše uvedené definice. Pro stanovení bilirubinu se nejlépe osvědčují benzenazosloučeniny; ve kterých dva ze substituentů R_1 až R_3 jsou atomy chloru v polohách 2;4-; 2,5- nebo 2;6- a třetí substituent je vodík; pro stanovení urobilinogenu potom benzenazosloučeniny, ve kterých R_2 je nižší alkoxyl- například methoxyl- nebo ethoxyl-, nebo aralkoxyl-, kde R_2 ne například benzyloxyskupina a substituenty R_1 a R_3 jsou atomy vodíku, popřípadě trifluormethyl- skupina. Vedle uvedených dvou hlavních azokopulovatelných součástí biologických kapalin a materiálů jsou však přípravky podle tohoto vynálezu vhodné pro důkaz a stanovení i dalších azokopulovatelných látek, jako je například kyselina vanillylmandlová, jejíž stanovení v moči má velký význam pro diagnosu pheochromocytomu. V tomto případě je výhodné použít přípravek obsahující benzenazosloučeninu, ve které R_2 je skupina NO_2 a substituenty R_1 a R_3 jsou vodíkové atomy. Heterocyklickou část benzenazosloučeniny obecného vzorce I může tvořit buď morfolin; ve kterém X=O; nebo piperidin (X=C) nebo i piperazin (X=N); které jsou popřípadě dále substituovány buď skupinami alkylovými; jako je tomu například u 2;6-dimethylpiperazinu (R_4=R_6=CH_3 a R_5=R_7=H), nebo N-methylpiperazinu (X=N.CH_3), nebo oxoskupinami; jako je například diketopiperazin

(R_4=R_6=O; R_5=R_7=H). V některých případech je výhodné použití i substituovaných N,N'-dis-(benzenazosloučenin) odvozených od piperazinu; tj. benzenazosloučenin obecného vzorce I, u kterých X představuje skupinu obecného vzorce II a substituenty R_1 až R_3 jsou na obou benzenových jádrech stejné.

Minerální nebo organická kyselina a/nebo kysele reagující sůl, obsažená popřípadě v prostředcích podle vynálezu má dvojí funkci: jednak, jak bylo uvedeno výše, způsobuje předměnu benzenazosloučeniny obecného vzorce I na příslušnou diazoniovou sůl; jednak vytváří i vhodně kyselé prostředí, nutné v některých případech pro žádoucí průběh azokopulační reakce se stanovovanou látkou. Pro tento účel je možné použít jakékoliv pevné nebo kapalné kyseliny, jako je například kyselina chlorovodíková, kyselina metafosforečná, kyselina citronová, vinná, šťavelová, nebo aromatické sulfonové kyseliny nebo jejich směsi nebo i kysele reagující soli, jako například kyselý síran draselný, popřípadě vyžaduje-li vlastní azokopulační reakce ručité hodnoty pH, i směsi kyselin s alkalickými solemi kyselin.

Je samozřejmé, že přípravky podle vynálezu mohou vedle uvedených dvou hlavních látek, tj. benzenazosloučeniny obecného vzorce I a popřípadě kysele reagující látky, obsahovat s výhodou i další složky, které celý přípravek ještě dále stabilizují, popřípadě podporují a urychlují průběh vlastní azokopulační reakce.

Jsou to v prvé řadě různé povrchově aktivní látky. Tyto látky, jejichž výhodnost použití v obdobných přípravcích je obecně známá, urychlují průběh vlastní azokopulační reakce a v některých případech i stabilizují azobarvivo vzniklé při azokopulační reakci. Jejich přítomnost v diagnostických přípravcích je dokonce nutná, jde-li o stanovení azokopulačních látek, u kterých probíhá azokopulační reakce bez těchto akcelerátorů tak pomalu, že je tímto způsobem nelze prakticky vůbec stanovit. Typickým představitelem takovýchto azokopulovatelných látek je například tzv. "nepřímý" bilirubin. Jako vhodné povrchově aktivní látky mohou být v přípravcích podle vynálezu použity látky aniontaktivního, kationaktivního nebo i neionogenního typu, jako jsou například laurylsulfát, dialkyestery kyseliny sulfojantarové, cetyltrimethylamonium chlorid nebo bromid, benzyl-di-methyl-hexadecylamonium chlorid, polyethylenglykol nebo různé polyoxyethylenfenoly. Tyto látky dokonce v mnoha případech zvyšují i intenzitu vzniklého zbarvení při azokopulační reakci, čímž lze dosáhnout i zvýšení citlivosti přípravků vůči stanovované azokopulovatelné složce vyšetřovaného biologického materiálu.

Proti dosud známým přípravkům ke stanovení azokopulovatelných látek vyniká řešení podle vynálezu nejen podstatně vyšší stabilitou vůči vzdušné vlhkosti a světlu, ale umožňuje i přípravu prostředků, které dosud nebylo možné vůbec vyrobit vzhledem ke značné nestabilitě některých diazoniových solí, jako je například diazotovaná kyselina sulfanilová nebo sulfanilamid, které jsou v pevném suchém stavu až výbušné.

Jak bylo výše uvedeno, lze přípravky podle vynálezu použít jak ke spektrofotometrickému stanovení azokopulovatelných látek v roztoku, tak i ve formě tablet nebo tzv. diagnostických proužků. Provedení přípravku podle uvedených způsobů použití je samozřejmě rozdílné, jak je zřejmé z níže uvedených příkladů.

Příklad 1

Diagnostické proužky ke stanovení urobilinogenu v moči.

Filtrační papír o plošné hmotnosti 120 g/m^2 se postupně naimpregnuje níže uvedenými roztoky A a B do nasycení tak, že po každé impregnaci se papír dokonale vysuší proudem vzduchu o teplotě 60 °C. Naimpregnovaný a vysušený papír se potom nařeže na čtverečky o rozměru 6x6 mm a nalepí pomocí oboustranné samolepicí pásky na jeden konec podložky z bílé plastické hmoty o rozměru 6x90 mm.

Impregnační roztok A:

Kyselina citronová	20,0 g

Kyselina 1,5-naftalendisulfonová 2Na-s 1	14,0 g
Laurylsulfát sodný	2,5 g
Voda destilovaná	100 ml

Impregnační roztok B:

N-(4-Benzyloxybenzenazo)morfolin	0,65 g
Octan ethylnatý	100 ml

Tyto proužky se po namočení do moče obsahující urobilinogen barví jasně červeně, přičemž intenzita tohoto zbarvení je přímo úměrná koncentraci urobilinogenu v rozmezí 5 až 200 /umol/l. V tomto ohledu jsou proužky zcela rovnocenné dosud známým proužkům obsahujícím místo N-(4-benzyloxybenzenazo)morfolinu diazoniovou sůl odvozenou od p-benzyloxyanilinu, jsou však podstatně stabilnější jak vůči vzdušné vlhkosti, tak zejména proti působení světla. Prakticky identické vlastnosti vykazují i proužky, u kterých byl N-(4-benzyloxybenzenazo)morfolin nahrazen N-(4-methoxybenzenazo)-piperidinem.

Příklad 2

Diagnostické proužky ke stanovení bilirubinu v moči.

Diagnostické proužky se připraví způsobem popsaným v příkladu 1, avšak s použitím filtračního papíru o plošné hmotnosti 180 g/m^2 a impregnačních roztoků o následujícím složení:

Impregnační roztok A:

Kyselina metafosforečná	10,0 g
Kyselina vinná	3,1 g
Tetrafluoroboritan sodný	1,0 g
3,9-Diethyl-6-hydroxy-tridekan-1-sulfonová kyselina, sodná sůl; 25% vodný roztok	2,5 ml
Voda destilovaná	100 ml

Impregnační roztok B:

N-(2,6-dichlorbenzenazo)morfolin	0,1 g
Octan ethylnatý	100 ml

Tyto proužky indikují přítomnost konjugovaného bilirubinu v moči stejně jako proužky s diazoniovou solí odvozenou od 2,6-dichloranilinu, jsou však podstatně stabilnější a nedávají nespecifické reakce s řadou dalších azokopulovatelných součástí moče. Navíc, jejich reakce s bilirubinem je intenzívnější a výraznější, takže umožňují nejen stanovení i nejnižších nadfyziologických koncentrací bilirubinu v moči, ale i jeho spolehlivější semikvantitativní stanovení v rozsahu 5 až 100 /umol/l.

Obdobné vlastnosti vykazují i proužky, u kterých byl N-(2,6-dichlorbenzenazo)morfolin nahrazen stejným hmotovým množstvím 2,4- nebo 2,5-dichloranalogu, nebo i N,N'-bis-(2,6-dichlorbenzenazo)-piperazinem. Při použití 2,4- nebo 2,5-dichlorsubstituovaných benzenazosloučenin se však proužky při reakci s bilirubinem barví fialově až modrofialově a při přípravě proužků s N,N'-bis-(2,6-dichlorbenzenazo)piperazinem je možné této benzenazosloučeniny použít pouze v polovičním hmotovém množství.

Příklad 3

Přípravek pro stanovení bilirubinu v séru

Jemně rozetřená homogenní směs o složení

uhličitan sodný bezvodý	2,5 g
laktosa (monohydrát)	9,9 g
chlorid sodný	130 g
N-(2,4-dichlorbenzenazo)-N'-ethylpiperazin	35,6 g

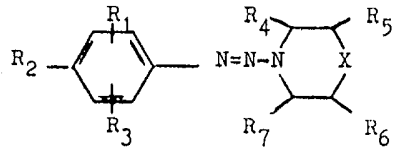
se o sobě známým způsobem slisuje do tablet o hmotnosti 0,10 g.

Pro použití těchto tablet při stanovení bilirubinu v séru se tableta rozpustí v 10 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci c_{HCl} = 0,165 mol/l, obsahujících polyethylenglykoldodecylether. K 1,50 ml takto připraveného roztoku se přidá 0,10 ml vyšetřovaného séra a reakční roztok se po promíchání nechá stát při teplotě místnosti ve tmě po dobu 20 minut. Po této době se změří absorbance tohoto roztoku při vlnové délce 530 až 540 nm proti kontrolnímu roztoku. Ze zjištěné hodnoty absorbance se potom vypočte (například pomocí předem připravené kalibrační přímky) obsah celkového bilirubinu ve vyšetřovaném vzorku séra.

Provede-li se rozpouštění tablety a další stanovení s použitím stejného množství kyseliny chlorovodíkové o stejné koncentraci, avšak bez přídavku polyethylenglykoldodecyletheru, a vzniklé zbarvení se vyhodnotí fotometricky přesně po 5 minutách, odpovídá odečtená hodnota absorbance obsahu tak zvaného přímého, konjugovaného bilirubinu ve vyšetřovaném vzorku séra.

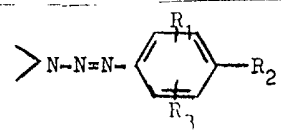
PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Diagnostický přípravek ke stanovení azokopulovatelných součástí biologických kapalin a materiálů, zejména bilirubinu a urobilinogenu, obsahující popřípadě minerální nebo organickou kyselinu a/nebo kyselé reagující sůl, vyznačující se tím, že obsahuje benzenazosloučeninu obecného vzorce I,



(I)

ve kterém substituenty R_1 až R_3 jsou stejné nebo rozdílné atomy nebo skupiny, jako vodík, halogen, nitroskupina, sulfoskupina, popřípadě N-acylovaná skupina amidosulfonová, hydroxyl, alkyl nebo alkoxyl s 1 až 3 atomy uhlíku, aralkoxyl se 7 až 8 atomy uhlíku, trifluoromethyl-skupina, skupina-NH.R, ve které R je acetyl nebo benzoyl-skupina, R_4 až R_7 značí nezávisle na sobě vodík, nižší alkyl s 1 až 3 atomy uhlíku nebo oxoskupinu a X značí atom uhlíku, kyslíku nebo dusíku popřípadě substituovaného nižším alkylem o počtu uhlíkových atomů 1 až 4, nebo skupinu obecného vzorce II



(II)