



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 208 277

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 21 05 79
(21) PV 3511-79

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³ G 01 N 31/22

(40) Zveřejněno 31 12 80
(45) Vydáno 01 11 81

(75)

Autor vynálezu

D O U Š A SVATOPLUK, PRAHA

(54)

Způsob kompenzace nelinearity při stanovení bílkovin biuretovou reakcí

Vynález řeší odstranění nelinearity při stanovení bílkovin biuretovou reakcí na dvoucestných automatických analyzátořech. Při stanovení bílkovin na automatických analyzátořech proudí hlavní větví biuretové činidlo a vedlejší větví alkalický roztok činidla pro slepé stanovení, které se vyznačuje tím, že obsahuje 1-5% hmotových komplexně vázaných iontů dvojmocné mědi, vázáno na celkové množství iontů dvojmocné mědi, obsažených v základním biuretovém činidle.

Vynález může být využit při analytických stanoveních na automatických analyzátořech v lékařství, farmaceutickém průmyslu, analytické chemii a biologii.

Vynález se týká způsobu kompenzace nelinearity při stanovení bílkovin biuretovou reakcí a to zejména při aplikaci metody na automatickém analyzátoru.

V současné době jsou v širokém oboru rozvinuty automatizované analytické postupy. Jednou z takových metod je stanovení bílkovin biuretovou reakcí. Její princip spočívá v interakci iontů mědi s bílkovinou v alkalickém prostředí za tvorby fialově zbarveného komplexu. S použitím peristaltické pumpy probíhá v automatickém analyzátoru reakce kontinuálně v hadicovém systému a zapisovač kreslí křivky, kde vzdálenost vrcholu od základny určuje obsah bílkoviny ve vzorku. Spektrofotometr analyzátoru je dvoupaprskový a společně s návaznou analytickou jednotkou je dvoucestný. V hlavní větvi přístroje proudí biuretové činidlo, obsahující ionty mědi a ve vedlejší větvi činidlo pro slepé stanovení, které kompenzuje nespecifické absorpce, způsobené přítomností barviv, například hemu, nebo různých zákalů ve vzorku. Do obou větví se současně automaticky nasávají jednak roztoky zkoušených vzorků, jednak samotné rozpouštědlo, kterým bývá voda nebo fyziologický roztok. Rozpouštědlo při tomto kontinuálním způsobu totiž odděluje v hadicovém systému navzájem jednotlivé vzorky. Také před vlastním započítáním analýzy se do přístroje nasává pouze rozpouštědlo a v této fázi se na zapisovači přístroje kompenzuje nastavením báze modré zbarvení vlastního biuretového činidla. Počet modifikací ve složení biuretového činidla, používaných v praxi, je značný. Avšak v zásadě je to vždy alkalický komplex měďnatých iontů. Všechny modifikace mají při kvantitativním průběhu biuretové reakce jeden zásadní nedostatek a to nelinearitě mezi skutečným obsahem bílkoviny a příslušnou absorpencí, při použití automatického analyzátoru indikovanou na zapisovači výškou vrcholu křivky. Je to zákonitý jev a má jednoduché vysvětlení. Jak již bylo řečeno, před analýzou vlastních vzorků se nasává do obou větví analyzátoru pouze rozpouštědlo. V hlavní větvi proudí modrý roztok biuretového činidla, ve vedlejší větvi bezbarvý roztok činidla pro slepé stanovení. Modré zbarvení biuretového činidla se kompenzuje na zapisovači nastavením báze a to v konstantní hodnotě pro všechny následně analyzované vzorky bez zřetele na to, jakou mají koncentraci bílkovin. To není teoreticky správné, ale technicky to nelze bez složité regulační elektroniky jinak provést. Totiž část modrého zbarvení biuretového činidla se spotřebuje na tvorbu silnějšího komplexu fialového bílkovina-měď a správně by se tedy měla kompenzovat pouze absorpce zbývajících modrého zbarvení. Tato zbývající absorpce by měla být tím nižší, čím vyšší je obsah bílkoviny ve zkoušeném vzorku.

Ve skutečnosti se kompenzuje plná hodnota absorpce modrého zbarvení biuretového činidla a proto se u vzorků s vyšším obsahem bílkoviny získávají relativně nižší vrcholy příslušných křivek a vzájemné závislosti jsou nelineární. Některé automatizované pracovní postupy tohoto oboru kompenzují nelinearitě na příklad využitím termodynamiky rovnovážných stavů a nechávají reakci proběhnout pouze do střední fáze a v té měří absorpenci. Nevýhodou je, že způsob, závislý na teplotě a metoda je vhodná pro roztoky bílkovin v koncentračním rozsahu jednoho řádu a to 1 až 10%.

Uvedené nedostatky odstraňuje způsob kompenzace nelinearity při stanovení bílkovin biuretovou reakcí na dvoucestném automatickém analyzátoru, jehož podstatou je, že činidlo pro slepé stanovení, proudící ve vedlejší větvi, obsahuje 1 až 5% hmotových, s výhodou

3% hmotových komplexně vázaných iontů dvojmocné mědi, vztaženo na celkové množství komplexně vázaných iontů dvojmocné mědi, obsažených v základním biuretovém činidlo, proudícím v hlavní větvi a absorbance zbarvení komplexu měďnatých iontů s bílkovinou se odečítá od absorbance vlastní biuretové reakce a v závislosti na zjištěné koncentraci bílkoviny se kompenzuje nelinearita měřené absorbance.

Výhodou tohoto způsobu je jeho jednoduchost, zanedbatelná závislost na teplotě a možnost použití takového pracovního schématu, které umožňuje analyzovat roztoky bílkovin v rozmezí více než dvou řádů, prakticky 0,1 až 22%.

Příklad provedení vynálezu:

Složení činidel:

V 1000 ml vody se rozpustí:	Biuretové činidlo	Činidlo pro slepé stanovení
Síran měďnatý-pentahydrát	8,0 g	0,27 g
Vinan sodnodraselný-tetrahydrát	24,0 g	6,0 g
Dvojsodná sůl kyseliny ethylen- diaminotetraoctové-dihydrát	5,0 g	5,0 g
Hydroxyd draselný	32,0 g	32,0 g
Jodid draselný	5,0 g	5,0 g
Smáčedlo 2-ethylhexylsíran sodný	1,0 ml	1,0 ml

Srovnání výsledků, získaných při použití činidla pro vedlejší slepé stanovení podle vynálezu a činidla bez využití vynálezu.

Bylo analyzováno telecí sérum a lidský albumin v původní koncentraci a současně po zředění na polovinu a čtvrtinu původního obsahu bílkovin. V tabulce jsou uvedeny výšky vrcholů získaných křivek a z nich vypočtené obsahy bílkovin včetně příslušných absolutních chyb. Při výpočtu byla u každé skupiny vzata pro názornost nejnížší čtvrtinová hodnota jako standart.

Vzorek	Skutečný obsah bílkovin %	Činidlo podle vynálezu			Činidlo bez využití vynálezu		
		Výška vrcholu křivky mm	Vypočtený obsah bílkovin %	Absol. chyba %	Výška vrcholu mm	Vypočtený obsah bílk. %	Absol. chyba %
Telecí sérum	7,52	83,6	7,52	0	81,5	7,13	-0,39
	3,76	41,8	3,76	0	42,0	3,67	-0,09
	1,88	20,9	1,88	-	21,5	1,88	-
Lidský albumin	19,48	78,5	19,50	+0,02	93,1	19,13	-0,35
	9,74	39,2	9,74	0	47,0	9,66	-0,08
	4,87	19,6	4,87	-	23,7	4,87	-

PŘEDMĚT VYNÁLEZU.

Způsob kompenzace nelinearity při stanovení bílkovin biuretovou reakcí na dvoucestném automatickém analyzátoru, při kterém hlavní větví tohoto analyzátoru proudí biuretové činidlo a vedlejší větví alkalický roztok činidla pro slepé stanovení, vyznačený tím, že činidlo pro slepé stanovení, proudící vedlejší větví, obsahuje 1 až 5% hmotových, například 3% hmotové komplexně vázaných iontů dvojmocné mědi, obsažených v základním biuretovém činidle, produktem v hlavní větví a absorbance zbarvení komplexu měďnatých iontů s bílkovinou se odečítá od absorbance vlastní biuretové reakce a v závislosti na zjištěné koncentraci bílkoviny se kompenzuje nelinearita měřené absorbance.