



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

253138

(11) (B1)

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>

G 01 N 31/22

(22) Přihlášeno 26 11 85

(21) PV 8529-85

(40) Zveřejněno 12 03 87

(45) Vyřáno 16 05 88

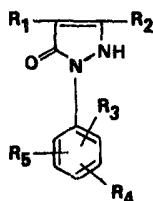
(75)

Autor vynálezu

HRBOTICKÁ EVA RNDr., SVOBODA VLASTIMIL ing., BRNO

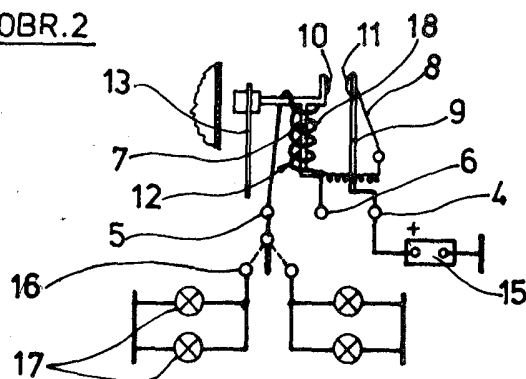
(54) Diagnostické proužky ke stanovení součástí biologických kapalin

Předmětem jsou diagnostické proužky pro stanovení množství peroxidu vodíku v moči, určené pro využití v lékařství. Podle vynálezu proužky navíc proti známému stavu obsahují pyrazolon obecného vzorce I



s pěti radikály, z nichž první dva jsou alkyly o počtu uhlíků 1 až 6 nebo vodík a zbývající tři jsou stejné nebo rozdílné substituenty jako vodík, halogen, nitroskupina, sulfoskupina nebo fenoxyskupina. Při zachování barevných vlastností tak dochází ke snížení citlivosti reakce tak, že proužky reagují na množství peroxidu vodíku až do určité hranice koncentrací.

OBR.2



Předmětem vynálezu jsou diagnostické proužky ke stanovení diagnosticky významných složek biologických kapalin, které pomocí vhodných pomocných reakcí generují peroxid vodíku.

V klinicko-biochemické laboratorní diagnostice je velmi často potřeba stanovit peroxid vodíku vzniklý in situ při některých enzymových reakcích. Je tomu tak například při stanovení glukosy nebo kyseliny močové v biologických kapalinách, jako například v moči nebo krvi; glukosa nebo kyselina močová se při tomto stanovení převádějí pomocí specifických enzymů, oxidoreduktas, na své oxidační produkty, kyselinu glukonovou, případně allatonin, za současného vzniku ekvivalentního množství peroxidu vodíku. Pomocí další specifické reakce se takto vzniklý peroxid vodíku stanoví tak, že za přítomnosti vhodného katalyzátoru nejčastěji enzymu peroxidasy, oxiduje bezbarvý chromogen na barvivo, jehož množství - úměrné množství peroxidu vodíku - se pak zjistí podle intenzity vzniklého zbarvení. Obdobným způsobem, i když s použitím poněkud složitějších pomocných reakcí, lze stanovit např. i cholesterol nebo triglyceridy.

Druh a vlastnosti chromogenu, používaného pro tato stanovení jsou obzvláště důležité u tzv. diagnostických proužků, u nichž veškerá činidla potřebná pro průběh uvedených pomocných enzymových reakcí i koncové barevné reakce jsou obsažena v pevné fázi na vhodném nosiči.

V minulosti byly pro tento účel užívány prakticky výlučně chromogeny benzidínového typu, jako o-toluidin, 2,7-diaminofluoren nebo 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin. V poslední době jsou však tyto chromogeny nahrazovány vhodnějším chromogenním systémem, založeným na tzv. Trinderově reakci, tj. na oxidační kopulaci vhodné nukleofilní organické sloučeniny jako aktivní barvotvorné komponenty s vhodnou pasívní barvotvornou komponentou za vzniku intenzivně zbarveného chinoniminového nebo diazamerocyaninového barviva.

Jako aktivní komponenty jsou pro tento účel používány vesměs aminosloučeniny, z nichž se nejlépe osvědčily aromatické nebo heterocyklické aminy se šestičlenným kruhem (viz DOS 3 032 421 a NDR patent 135 243) nebo 4-aminoantipyrin a/nebo heterocyklické hydrazony, jako například 3-methyl-2-benzthiazolinon-hydrazon (viz US patent 4 427 770; 4 119 405 nebo čs.

Jako pasívní barvotvorné kopulační komponenty byly pak použity různé aromatické aminy (viz Clin. Chem. 17, 1 154 (1971), Clin. Chem. 18, 943 (1972) nebo DOS 3 124 594), substituované fenoly popřípadě naftoly (Ann. Clin. Biochem. 6, 24 (1969); US patent 4 119 504; US patent 4 427 770; DOS 2 744 812; DOS 3 000 380; DOS 2 838 877; NDR patent 135 243), substituovaný 8-hydroxychinolin, obecně známý pod názvem primachin-difosfát (DOS 2 855 433) nebo substituované 5-pyrazolony (DOS 3 032 421).

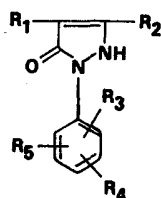
Diagnostické proužky, jejichž barevná odezva na peroxid vodíku, popřípadě na látky, které tento peroxid vodíku v průběhu vhodné pomocné enzymové reakce generují, je založena na tomto chromogenním systému, vynikají výbornými vlastnostmi: např. glukosu v moči lze pomocí těchto proužků stanovit v extrémně širokém rozmezí od mírně zvýšených glykosurií od 0,35 až 0,50 g/l glukosy až po neobyčejně vysoké patologické hodnoty, přesahující 30 až 50 g/l. Obdobně se tyto proužky osvědčují i pro vyšetřování séra nebo krve, kde je možné pomocí nich stanovit s poměrně vysokou přesností obsah glukosy od hypoglykemií v rozsahu 0,20 až 0,40 g/l glukosy až po poměrně těžké hyperglykémie, při nichž koncentrace glukosy v séru dosahuje až 8,0 g/l a více.

V některých případech je však žádoucí, aby tyto proužky indikovaly pouze koncentrace glukosy, zvýšené nad určitou hranici. Je to zejména u proužků, obsahujících dvě indikační zóny, z nichž pomocí první je možno stanovit nižší koncentraci glukosy např. do 1,1 g/l (což je horní hranice tzv. normální hodnoty), pomocí druhé pak koncentrace ležící nad touto hodnotou. Při tom je výhodné použít pro nižší koncentrační rozsah zónu s chromogenem benzidino-

pis takovýchto dvouzónových proužků a výhody jejich použití jsou uvedeny například v již citovaném US patentu 4 427 770.

Chromogenní systémy na bázi oxidační kopulace uvedené výše však pro tento účel nejsou zcela vhodné, neboť díky své poměrně vysoké citlivosti indikují přítomnost a množství glukosy již od jejích velmi nízkých koncentrací, což ovšem při použití na těchto dvouzónových proužcích není žádoucí. Obdobně však i např. u proužků pro stanovení glukosy v moči indikují proužky s tímto chromogenním systémem i nejnižší nadfyziologické vylučování glukosy nadměrně intenzivní pozitivní reakci, což někdy znesnadňuje přesnější diferenciaci pozitivních nálezů v oblasti 0,35 až 1,0 g/l glukosy, která je ovšem z hlediska diagnostického velmi důležitá. Bylo proto třeba vyvinout diagnostické proužky, u nichž by při zachování vynikajících barevných vlastností uvedeného chromogenního systému byla citlivost reakce snížena tak, aby proužky reagovaly první zřetelně pozitivní reakcí na množství peroxidu vodíku - a tím tedy na množství látky tento peroxid generující - teprve od určité hranice koncentrací.

Tento úkol se podařilo vyřešit předloženým vynálezem, jehož předmětem jsou diagnostické proužky ke stanovení součástí biologických kapalin obsahující chromogenní systém na bázi oxidační kopulace aromatického nebo heterocyklického aminu s fenolem, naftolem nebo 1,3-disubstituovaným 5-pyrazolonem, vyznačené tím, že obsahují pyrazolon obecného vzorce I



(I)

v němž  $R_1$  je alkyl o počtu uhlíků 1 až 6,  $R_2$  je vodík nebo alkyl o počtu uhlíků 1 až 6 a  $R_3$  až  $R_5$  jsou stejné nebo rozdílné substituenty jako vodík, halogen, nitroskupina, sulfoskupina nebo fenoxyskupina.

Tento nový chromogenní systém vyniká proti dosud známým systémům tím, že pomocí pyrazolonu I je možné libovolně regulovat spodní hranici citlivosti proužků vzhledem k množství původního analytu, při jehož enzymové transformaci vzniká peroxid vodíku. Tato skutečnost je dána pravděpodobně tím, že v tomto novém systému dochází přednostně k oxidační kopulaci aktivní kopulační komponenty s pyrazolonem I za vzniku bezbarvého produktu. Teprve po spotřebování veškerého pyrazolonu I, což odpovídá spotřebování ekvivalentní části peroxidu vodíku, dojde k reakci aktivní kopulační komponenty s vlastní barvotvornou komponentou, tj. aromatickým nebo heterocyklickým aminem, fenolem, naftolem nebo 5-pyrazolonem, majícím však - na rozdíl od pyrazolonu I - volnou, nesubstituovanou methylenovou skupinu v poloze 4.

Z uvedeného nástinu předpokládaných pochodů, které probíhají při pozitivní reakci v chromogenním systému proužků podle vynálezu, vyplývají i potřebné vzájemné poměry jednotlivých složek. Poměr aktivní a pasivní barvotvorné komponenty není kritický a může se pohybovat v poměrně širokých mezích od přebytku komponenty aktivní až po poměrně vysoký přebytek komponenty pasivní. U většiny proužků se však z hlediska výtěžku oxidační kopulace a z toho vyplývajících barevných vlastností proužků ukázal výhodným stechiometrický poměr obou těchto složek až do zhruba trojnásobného molárního přebytku pasivní kopulační komponenty. Možnost použití aktivní a pasivní kopulační komponenty v prakticky zcela libovolných molárních poměrech vyplývá konečně i z popisu výše citovaných vynálezů, jako například z amerických patentních spisů 4 119 405 a 4 427 770 nebo DOS 3 032 421.

Množství pyrazolonu I (který lze z hlediska předpokládaného mechanismu jeho účinku označit za bezbarvou pasivní kopulační komponentu) použitého na proužcích podle vynálezu se řídí hranicí koncentrace peroxidu vodíku (případně látky, která tento peroxid v průběhu při-

slušné pomocné reakce generuje), při níž mají proužky poskytovat první pozitivní reakci. Toto množství pyrazolonu I, případně jeho molární poměr například k barvotvorné pasivní komponentě je závislý jak na substituentech  $R_1$  až  $R_5$  v pyrazolonu I, tak i na použité kombinaci aktivní a pasivní barvotvorné komponenty a hlavně na biologické kapalině, k jejímuž vyšetřování jsou proužky určeny.

Tak například u proužků pro stanovení glukosy v moči, které jako chromogenní systém obsahují kombinaci 4-aminoantipyrinu s 1-fenyl-3-methyl-5-pyrazolonem a jako pyrazolon I 1-(4-sulfofenyl)-3,4-dimethyl-5-pyrazolon, a u nichž je nutné potlačit pozitivní reakci do koncentrace glukosy 0,20 g/l a zeslabit pozitivní reakci pro koncentrace glukosy 0,30 až 0,50 g/l, je nutné použít poměrně vysoké množství pyrazolonu I, vyjádřené molárním poměrem k 1-fenyl-3-methyl-5-pyrazolonu 1 ku 5.

U proužků pro stanovení glukosy v kapilární krvi, obsahujících chromogenní systém 4-aminoantipyrin s 1-(sulfofenyl)-3-methyl-5-pyrazolonem a jako pyrazolon I 1-(4-sulfofenyl)-3-methyl-4-butyl-5-pyrazolon, u nichž je třeba potlačit pozitivní reakci až do koncentrace glukosy 1,0 až 1,1 g/l, však postačuje molární poměr obou složek pouze 1 ku 100 až 1 ku 140. Obecně se tudíž pyrazolon I používá v diagnostických proužcích podle vynálezu v množství definovaném poměrem k pasivní barvotvorné komponentě 1 ku 2,5 až 1 ku 250, přičemž u proužků pro stanovení glukosy v moči činí tento poměr s výhodou 1 ku 2,5 až 1 ku 25, u proužků pro stanovení glukosy v krvi nebo séru s výhodou 1 ku 50 až 1 ku 150.

Je samozřejmé, že vedle uvedeného chromogenního systému a pyrazolonu I obsahují proužky podle vynálezu řadu dalších látek a činidel, potřebných pro žádoucí průběh celé indikační reakce. U proužků pro stanovení glukosy, kyseliny močové, cholesterolu nebo triglyceridů jsou to v první řadě specifické enzymy, za jejichž přítomnosti jsou tyto součásti biologických kapalin transformovány za současného vzniku peroxidu vodíku. Při stanovení glukosy a kyseliny močové jsou to pouze příslušné oxidoreduktasy - glukosaoxidas nebo urikasa. Pro stanovení cholesterolu nebo triglyceridů však proužky obsahují - vedle příslušné oxidoreduktasy - ještě i další enzymy, potřebné pro transformaci stanovované látky na produkt, přístupný konečné oxidasové reakci. Tyto enzymy jsou obecně známy a již poměrně dlouhou dobu používané v klinicko-biochemické analytice. Popis takovýchto složitějších enzymových systémů lze nalézt například v americkém patentním spise 3 983 005 nebo v DOS 2 512 586 a 2 737 286.

Vlastní oxidační kopulace obou barvotvorných komponent i kopulace aktivní komponenty s pyrazolonem I působením peroxidu vodíku probíhá značně pomalu. Urychlení této reakce lze dosáhnout celou řadou vhodných katalyzátorů, z nichž se však v praxi nejlépe osvědčil enzym peroxidasa, která tvoří také nezbytnou součást proužků podle vynálezu.

Vedle těchto hlavních složek mohou však proužky podle vynálezu s výhodou obsahovat ještě řadu dalších pomocných látek vytvářejících vhodné podmínky pro průběh všech reakcí, které při stanovení příslušné součásti biologických kapalin na proužku probíhají. V první řadě je to tlumič, jehož úkolem je nejen vytvářet optimální pH pro všechny výše popsané enzymové reakce, ale i pro vlastní koncovou barevnou reakci, tj. oxidační kopulaci barvotvorných složek chromogenního systému. Pro tento účel může být použit jakýkoliv z obecně známých a pro tento účel běžně užívaných neinterferujících tlumičů o pH 4,0 až 9,0, jako jsou například tlumiče citrátové, malonátové, fosfátové, tlumiče na bázi tris(hydroxymethyl)-amino-methanu a podobně.

Další účinnou složkou proužků podle vynálezu mohou být s výhodou tzv. zahušťovadla, což jsou přirozené nebo syntetické polymerní látky, jako například želatina, karagenan, alginát, polyvinylpyrrolidon, polyvinylalkohol, kopolymer maleinanhydridu s methylvinyleterem, étery nebo estery celulózy nebo jejich směsi. Tato zahušťovadla celý reakční systém proužků stabilizují a vedle toho mají i pozitivní vliv na zvýraznění barevné reakce proužků při pozitivní reakci.

Dále je výhodné, jestliže proužky obsahují i vhodná smáčedla, jako například laurylsulfát, dioktysulfojantaran nebo polyethylenglykol, které zvyšují smáčivost proužků a usnadňují tak proniknutí vyšetřované kapaliny k činidlům a tím urychlují průběh reakce proužků. Navíc přispívají tyto látky i ke zvýšení čistoty odstínu a brilance zabarvení vzniklého při pozitivní reakci proužků.

V některých případech je výhodné, jestliže proužky obsahují ještě také vhodné indifferenční barvivo, které koriguje výsledný barevný odstín proužků při pozitivní reakci a zvýrazňuje rozdíl v intenzitě zabarvení při reakci proužků s rozdílnými koncentracemi peroxidu vodíku, případně výchozího analytu, z něhož tento peroxid vznikl. I když zásadně lze pro tento účel použít nejrůznější barviva, ve většině případů se nejlépe osvědčují barviva žlutá, jako například tartrazin, fluorescein nebo kyselina pikrová.

Diagnosticke proužky podle tohoto vynálezu se připravují o sobě známým a pro přípravu diagnostických proužků obecně používaným způsobem spočívajícím v tom, že se všechny výše uvedené složky rozpustí ve vhodných rozpouštědlech jako například ve vodě, alkoholu, acetonu a tento tzv. impregnační roztok se nanese na nasákavou podložku, jako je filtrační papír nebo rouno ze syntetických vláken a vysuší.

V některých případech je pak výhodné část uvedených součástí rozpustit v jednom roztoku a část pak odděleně na druhý impregnační roztok a tyto roztoky nanést na nasákavý nosič postupně, přičemž po každé této impregnaci se nosič důkladně vysuší, například proudem horkého vzduchu. Tento způsob přípravy diagnostických proužků je blíže popsán v níže uvedených případech provedení vynálezu. Je však možné také všechny výše uvedené složky inkorporovat do vhodné polymerní vrstvy, která se pak ve formě tenkého filmu nanese na podložku z plastické hmoty, jak popisuje například americký patent 3 630 957. Tuto polymerní vrstvu s chromogenním systémem podle vynálezu lze vedle toho použít i jako reakční vrstvu v tzv. integrálním analytickém elementu popsaném podrobně například v americkém patentu 3 992 158.

Proti dříve známým řešením jsou proužky podle tohoto vynálezu charakteristické tím, že použitím vhodného množství pyrazolonu I v jejich reakčním systému je možné podle potřeby měnit hranici jejich citlivosti vůči peroxidu vodíku a tím vůči stanovované součásti vyšetřované biologické kapaliny. Tato přednost proužků podle vynálezu se uplatňuje ve všech případech, kdy je třeba zachytit stanovovanou součást biologické kapaliny teprve od jisté koncentrace, jako je například horní hranice tzv. normální hodnoty.

#### P ř í k l a d 1

Proužky ke stanovení glukosy v moči  
Impregnační roztok A

|                                         |          |
|-----------------------------------------|----------|
| citrátový tlumič o pH 5,3               | 62,00 ml |
| želatina, 1,5% vodný roztok             | 33,00 ml |
| glukosaoxidasa, 24 U/mg                 | 1,65 g   |
| peroxidasa, 100 U/mg, 1,8% vodný roztok | 4,85 ml  |

Impregnační roztok B

|                                           |          |
|-------------------------------------------|----------|
| metanol                                   | 27,00 ml |
| voda destilovaná                          | 20,30 ml |
| 1-fenyl-3-methyl-5-pyrazolon              | 1,45 g   |
| 1-(4-sulfofenyl)-3,4-dimethyl-5-pyrazolon | 0,41 g   |
| 4-aminoantipyrin                          | 0,62 g   |
| o-dianisidin                              | 0,62 g   |
| polyvinylpyrrolidon K 90, 5% vodný roztok | 20,30 ml |
| laurylsulfát sodný                        | 0,41 g   |

|                                                                        |          |
|------------------------------------------------------------------------|----------|
| hydroxypropylcelulóza, 2% vodný roztok ve směsi<br>metanol-voda 1 ku 1 | 30,00 ml |
| tartrazin, 1% vodný roztok                                             | 2,40 ml  |

Oba impregnační roztoky se připraví odděleně smícháním, popřípadě rozpuštěním všech složek v uvedeném pořadí. Na filtrační papír o plošné hmotnosti  $180 \text{ g/m}^2$  se nanese impregnační roztok A a papír se dokonale vysuší proudem teplého vzduchu. Na tento papír se pak nanese impregnační roztok B a vysuší stejným způsobem. Vysušený papír se poté rozřeže na čtverečky o rozměru  $6 \times 6 \text{ mm}$  a nalepí - například pomocí oboustranné samolepící pásky - na podložku z bílé plastické hmoty. Ve srovnání s proužky připravenými stejným způsobem, avšak bez 1-(4-sulfofenyl)-3,4-dimethyl-5-pyrazolonu, poskytují proužky podle tohoto vynálezu vizuálně podstatně lépe rozlišitelné zbarvení v oblasti nejnižších patologických koncentrací glukosy v moči (0,35 až  $1,0 \text{ g/l}$ ), i silnějších glykosurií ( $10$  až  $30 \text{ g/l}$ ). Vedle toho jsou tyto proužky i stabilnější vůči vzdušné vlhkosti.

#### P ř í k l a d 2

Proužky ke stanovení glukosy v kapilární krvi  
Impregnační roztok A

|                                         |          |
|-----------------------------------------|----------|
| citrátový tlumič o pH 5,3               | 58,20 ml |
| želatina, 1,5% vodný roztok             | 38,80 ml |
| glukosaoxidasa, 20 U/mg                 | 4,20 g   |
| peroxidasa, 100 U/mg, 1,8% vodný roztok | 3,20 ml  |

#### Impregnační roztok B

|                                                 |          |
|-------------------------------------------------|----------|
| metanol                                         | 65,00 ml |
| voda destilovaná                                | 32,60 ml |
| 1-(4-sulfofenyl)-3-methyl-5-pyrazolon           | 2,90 g   |
| 1-fenyl-3-methyl-4-butyl-5-pyrazolon            | 0,15 g   |
| 4-aminoantipyrin                                | 0,80 g   |
| tartrazin, 1% vodný roztok                      | 2,30 ml  |
| dioktylsulfojantaran sodný, 3% roztok v etanolu | 14,00 ml |

#### Impregnační roztok C

|                             |          |
|-----------------------------|----------|
| etanol                      | 33,00 ml |
| toluen                      | 29,00 ml |
| dichlormetan                | 19,00 ml |
| metanol                     | 19,00 ml |
| methylhydroxypropylcelulóza | 2,30 g   |
| ethylcelulóza               | 1,20 g   |
| polyvinylbutyral B 20 H     | 1,70 g   |

Jednotlivé impregnační roztoky se nanesou postupně na filtrační papír o plošné hmotnosti  $180 \text{ g/m}^2$  tak, aby papír byl roztokem právě nasycen. Po nanesení každého roztoku se papír důkladně vysuší proudem horkého vzduchu. Poslední impregnace, provedená pomocí impregnačního roztoku C, slouží k vytvoření semipermeabilní membrány, která zadrží na svém povrchu krevní elementy a propustí k reakčnímu systému proužků pouze krevní plasmu, případně sérum.

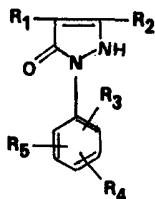
Takto naimpregnovaný papír se zpracuje na konečné proužky způsobem popsáním v příkladu 1. Po nakápnutí kapky krve na čtvereček naimpregnovaného papíru (reakční zónu proužků) se po 60 s odstraní krevní elementy otřením ovlhčenou buničitou vatou a vzniklé červené zbarvení reakční zóny, které je úměrné koncentraci glukosy ve vyšetřované krvi, se vyhodnotí buď vizuálně srovnáním se zkusmo zhotověnou barevnou srovnávací stupnicí, nebo změřením reflexe při vlnové délce  $495 \text{ nm}$  na vhodném reflexním fotometru. Tyto proužky slouží ke stano-

vení glukosy v kapilární krvi v rozmezí koncentrací od 1,20 g do 8,0 g/l; reakční zónu připravenou popsáním způsobem je vhodné použít na dvouzónovém proužku v kombinaci se zónou určenou pro stanovení glukosy v rozmezí 0,20 až 1,2 g/l, jak popisuje americký patent 4 427 770.

Jestliže se v impregnačním roztoku B nahradí 1-fenyl-3-methyl-4-butyl-5-pyrazolon stejným množstvím 1-(2-chlor-4-sulfofenyl)-3,4-diethyl-5-pyrazolonu, získají se proužky prakticky stejných vlastností.

#### PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Diagnostické proužky ke stanovení součástí biologických kapalin obsahující chromogenní systém na bázi oxidační kopulace aromatického nebo heterocyklického aminu s fenolem, naftolem nebo 1,3-disubstituovaným 5-pyrazolonem, vyznačené tím, že obsahují pyrazolon I obecného vzorce



v němž  $R_1$  je alkyl o počtu uhlíků 1 až 6,  $R_2$  je vodík nebo alkyl o počtu uhlíků 1 až 6, a  $R_3$  až  $R_5$  jsou stejné nebo rozdílné substituenty jako vodík, halogen, nitroskupina, sulfoskupina nebo fenoxyskupina.