



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

200 258

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 18 09 78
(21) PV 6002 - 78

(51) Int. Cl.³

G 01 N 31/22

(40) Zveřejněno 31 08 79
(45) Vydáno 01 12 82

(75)

Autor vynálezu TUREK STANISLAV MUDr., PRAHA

(54) Činidlo pro analytické stanovení aldosoých sacharidů

1

Vynález se týká činidla pro analytické stanovení aldosoých sacharidů metodou, založenou na kondenzaci reakční zplodiny sacharidů při zahřívání v kyselém prostředí s aromatickým aminem nebo jeho derivátem, za vzniku zbarvení roztoku, přičemž intenzita zbarvení je úměrná kvantu stanoveného sacharidu.

Ku přípravě činidel tohoto typu byly dosud použity různé aromatické aminy a jejich deriváty, jako anilin, p-bromanilin, o-toluidin, benzidin, difenylamin, 2-aminodifenyl, m-aminofenol, kyselina p-aminobenzoová a kyselina p-aminosalicylová. Reakce se provádí buď přímo zahříváním roztoku sacharidu s činidlem v kyselém prostředí, nejčastěji v roztoku kyseliny octové, nebo - u pentos - po převedení sacharidu na furfural, jeho oddělení destilací a smísením destilátu s činidlem.

Nevýhodou dosud používaných činidel je citlivost aromatických aminoderivátů /v substanci i roztoku/ vůči vzdušné oxidaci, přičemž vznikají rušivá zbarvení. Z toho vyplývá vysoká náročnost na čistotu jednak samotných aromatických aminoderivátů, jednak i používaných rozpustidel a kyselin, zejména co do obsahu nečistot, katalyzujících oxidační změny. Proto jsou nutné v těchto případech dodatečné purifikace, jako redestilace a rekrystalizace používaných látek a ještě i přidávání stabilizačních látek do reakčního roztoku. Některé z používaných aminů, jako o-toluidin, jsou těkavé, zapáchající a jejich používání je rizikové po zdravotnické stránce.

Orto-toluidin je potenciálně kancerogenní. Intenzita zbarvení u reakce s o-toluidinem poměrně rychle slábne, takže fotometrické měření je nutno provést během 30 min po provedení reakce.

Uvedené nedostatky odstraňuje činidlo podle vynálezu, jehož podstata je v tom, že jako aktivní látku obsahuje etylester kyseliny para-aminobenzoové v množství 2 až 8 % hmot., který při kondenzaci s reakčními produkty aldosoých sacharidů dává vznik intenzivnímu žlutooranžovému zbarvení roztoku. Tato reakce probíhá při zahřívání v roztoku kyseliny octové nebo i v roztoku organických kyselin v organickém rozpustidle. Intenzita zbarvení roztoku je při použití etylesteru kyseliny para-aminobenzoové lineárně úměrná koncentraci sacharidu v rozmezí, vhodném pro ultramikroanalytické fotometrické měření a citlivost této barevné reakce je vyšší, nežli při použití o-toluidinu i anilinu. Intenzita zbarvení - na rozdíl od použití o-toluidinu - neklesá ani během 24 hod. Etylester kyseliny para-aminobenzoové je látkou v substanci i v roztoku stabilnější vůči vzdušné oxidaci nežli dosud používané aromatické aminoderiváty, a je možné jej používat již v čistotě, která odpovídá požadavkům československého lékopisu 2, aniž by vznikala rušivá zbarvení roztoku. Ku případně reakčních roztoků je možno použít kyselinu octovou koncentrovanou v čistotě, odpovídající československému lékopisu 3. K reakčním roztokům etylesteru kyseliny para-aminobenzoové není nutno přidávat látky inhibující oxidaci. Tyto reakční roztoky je možno uchovávat při pokojové teplotě. Obchodní cena etylesteru kyseliny para-aminobenzoové je nižší, nežli kyseliny para-aminobenzoové vyhovující čistoty. Vlastnosti etylesteru kyseliny para-aminobenzoové jsou dobře známy, jelikož je tato sloučenina již několik desetiletí používána v lékařství a farmacii.

Činidla pro analytické stanovení sacharidů s použitím etylesteru kyseliny para-aminobenzoové se připraví rozpuštěním této sloučeniny buď v kyselině octové nebo ve směsi kyseliny octové s organickým rozpustidlem neutrální povahy, jako například etylenglykolmonometyléterem. Je možno připravit i činidlo bez kyseliny octové, a to rozpuštěním etylesteru kyseliny para-aminobenzoové v organickém rozpustidle, obsahujícím rozpuštěnou organickou hydroxykyselinu, jako kyselinu citronovou nebo glykolovou nebo mléčnou nebo jablečnou.

Bylo zjištěno, že pro dosažení maximální intenzity zbarvení roztoku při reakci s aldosoými sacharidy má být koncentrace etylesteru kyseliny para-aminobenzoové v použitém činidle nejméně 5 % (vyjádřeno ve hmotnostních dílech této látky ve 100 objemových dílech roztoku/).

Příklad 1

50 g etylesteru kyseliny para-aminobenzoové čistoty podle československého lékopisu 2 (synonymum Benzocainum) se rozpustí v kyselině octové koncentrace 99 % a čistoty pro analýsy, roztok se doplní do 1 litru a po promíchání se zfiltruje skelným filtrem. Místo kyseliny octové 99 % p.a. je možno použít i kyselinu octovou koncentrovanou čistoty podle československého lékopisu 3.

Příklad 2

Postupuje se jako v příkladu 1, ale část kyseliny octové se nahradí neutrálním organickým rozpustidlem, jako etylenglykolmonomethyléterem. Při obsahu do 30 objemových procent etylenglykolmonomethyléteru je citlivost reakce stejná, jako v samotné kyselině octové, se stoupající koncentrací etylenglykolmonomethyléteru citlivost reakce klesá. Při obsahu 50 % etylenglykolmonomethyléteru je však intenzita barevné reakce vyšší než činí polovina absorbance s činidlem v koncentrované kyselině octové.

Příklad 3

300 g etylesteru kyseliny para-aminobenzoové čistoty podle československého lékopisu 2 se rozpustí v 600 mililitrech čistého etylenglykolmonomethyléteru a roztok se zfiltruje skelným filtrem. Tento trvanlivý roztok slouží s výhodou k přípravě reakčních roztoků v kyselině octové, které pak není nutno již filtrovat. Například 150 mililitrů výše uvedeného roztoku etylesteru kyseliny para-aminobenzoové v etylenglykolmonomethyléteru se doplní za promíchání kyselinou octovou čistoty podle československého lékopisu 3 na objem 1 litru, čímž je připraveno činidlo k použití.

Příklad 4

V tomto příkladu se popisuje příprava činidla bez obsahu kyseliny octové : V čistém etylenglykolmonomethyléteru se rozpustí etylester kyseliny para-aminobenzoové čistoty podle československého lékopisu 2 a kyselina citronová čistoty p.a tak, aby výsledná koncentrace (v hmotnostních dílech na celkový objem roztoku) byla 6 % u etylesteru kyseliny para-aminobenzoové a 25 % u kyseliny citronové. Místo kyseliny citronové nebo její části lze použít i kyselinu glykolovou nebo kyselinu mléčnou nebo kyselinu jablečnou. Část etylenglykolmonomethyléteru je možno nahradit některým nižším alifatickým alkoholem (např. metylalkoholem) ke snížení viskozity roztoku.

Aldosové sacharidy je možno stanovit činidly, obsahujícími etylester kyseliny para-aminobenzoové tak, že 1 objemový díl roztoku sacharidu se zahřívá s 8 až 15 objemovými díly činidla po dobu 15 až 45 min ve vroucí vodní lázni. Vzniklé zbarvení roztoku se měří spektrofotometricky. Takto je možno stanovit aldosové sacharidy již v koncentracích řádově 10 mg na 1 litr roztoku při měření ve viditelné části spektra - např. při 420 nm, při měření v ultrafialové části spektra - a to při 340 až 350 nm - i v nižších koncentracích. Přitom ketosové sacharidy dávají neměřitelné zbarvení.

Příklad 5

V tomto odstavci je uveden příklad stanovení tzv. krevního cukru. 0,05 mililitru krve se smísí s 0,50 mililitru 5 % roztoku kyseliny trichloroctové a vysrážené bílkoviny se odstředí. Do vysoké zkumavky se odměří 0,20 mililitru čirého supernatantu a přidá se 2,0 mililitru činidla, obsahujícího etylester kyseliny para-aminobenzoové, připraveného podle příkladu 1 nebo 2 nebo 3. Zkumavka se zahřívá 15 min ve vroucí lázni vodní. Stejným způsobem se zpracuje slepá zkouška a standardní roztok, například roztok obsahující 5 milimolů glukosy v 1 litru. Po ochlazení obsahu zkumavek na 20 °C se intenzita zbarvení roztoku

měří spektrofotometricky při 420 nm vlnové délky v kyvetách šířky vrstvy 1 cm. Stabilita zbarvení roztoku je podstatně vyšší, nežli při použití orto-toluidinového činidla. Fotometrické měření je možno provést i po několika hodinách po reakci. Výpočet koncentrace se provede známým způsobem.

Příklad 6

V tomto odstavci je uveden příklad stanovení tzv krevního cukru s použitím činidla, obsahujícího etylester kyseliny para-aminobenzoové, připraveného podle příkladu 4-činidlo bez kyseliny octové. Deproteinace krve se provede stejně jako v příkladu 5. Do reakce se odměří 0,25 mililitru deproteinátu a přidá se 2,0 mililitru činidla, připraveného podle příkladu 4. Zkumavka s roztokem se zahřívá 30 min ve vroucí vodní lázni. Dále se postupuje stejně, jako v příkladu 5.

Při stanovení pentosových aldosa a pentosanů v biologickém materiálu je možno tyto sacharidy převést na furfural, tento oddělit destilací a stanovit barevnou reakcí po smíšení s činidlem, obsahujícím etylester kyseliny para-aminobenzoové. K měření je možno použít spektrofotometrického maxima v ultrafialové oblasti při 340 nm nebo maxima při 500 nm v prostředí kyseliny octové.

Při analýze roztoku směsi aldohexos a aldopentos činidlem etylesteru kyseliny para-aminobenzoové v kyselině octové je možno fotometrickým měřením při 2 vlnových délkách světla, a to 42 a 500 nm, stanovit poněkud hexos a pentos v roztoku.

Činidlo s etylesterem kyseliny para-aminobenzoové je možno použít v tenkovrstevné chromatografii k detekci rozdělených aldosaových sacharidů.

Činidlo obsahující jako účinnou látku etylester kyseliny para-aminobenzoové je možno použít v klinické chemii, biochemii, farmacii, kvasné chemii, potravinářské chemii, například k analýze sacharidů v obilí, ovoci a zelenině a v chemii dřeva a celulózy. Výhodou použití etylesteru kyseliny para-aminobenzoové je to, že jde o látku průmyslově vyráběnou k hojnému použití ve farmacii, lékařství, a to v dostatečné čistotě.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Činidlo pro analytické stanovení aldosaových sacharidů, obsahující aktivní látku a kyselý rozpustidlo, například kyselinu octovou nebo směs kyseliny octové a etylenglykolmonomethyléteri nebo roztok kyseliny citrónové v etylenglykolmonomethyléteri, vyznačené tím, že jako aktivní látku obsahuje etylester kyseliny para-aminobenzoové v množství 2 až 8 % hmot.