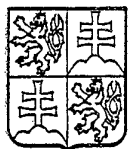


ČESKÁ  
A SLOVENSKÁ  
FEDERATIVNÍ  
REPUBLIKA  
(19)



FEDERÁLNÍ  
ÚŘAD PRO  
VYNÁLEZY

- (21) Číslo přihlášky: **4707-89**  
(22) Přihlášeno: 08. 08. 89  
(40) Zveřejněno: 19. 02. 92  
(47) Uděleno: 28. 12. 92  
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17. 02. 93

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**G 01 N 31/22**  
**G 01 N 33/68**

(73) Majitel patentu:  
Výzkumný ústav veterinárního lékařství,  
Brno, CS;

(72) Původce vynálezu:  
Standara Stanislav RNDr., Brno, CS;

(54) Název vynálezu:  
**Ninhydrinové činidlo a způsob jeho  
přípravy**

(57) Anotace:  
Ninhydrinové činidlo ke stanovení aminokyselin, zejména v automatických analyzátoch aminokyselin. Činidlo obsahuje v jednom litru 8 až 20 g ninhydrinu, 250 až 500 ml ústojného roztoku o hodnotě pH 5,3 až 5,7, například sodnooctanového pufru, 500 až 750 ml 2-methoxyethanolu a  $3 \cdot 10^{-2}$  až  $9 \cdot 10^{-2}$  g tetrahydroboratu sodného a připraví se tak, že ve 2-methoxyethanolu, zbaveném kyslíku probubláváním inertním plynem, se za míchání a stálého přívodu plynu postupně rozpustí ninhydrin a tetrahydroborat sodný, ke vzniklému roztoku se přidá paralelně připravený a kyslíku zbavený ústojný roztok a v přivádění plynu se pokračuje až do odstranění posledních stop kyslíku ze systému.

Vynález se týká ninhydrinového činidla ke stanovení aminokyselin, zejména v automatických analyzátoch aminokyselin, a způsobu jeho přípravy.

Metody kvantitativního stanovení aminokyselin po jejich rozdělení ionexovou chromatografií, založené na detekci aminokyselin ninhydrinem, patří v práci stále k nejužívanějším. Barevná reakce mezi látkami obsahujícími aminoskupinu a ninhydrinem je velmi citlivá. Primární aminokyseliny jsou ninhydrinem desaminovány a dekarboxylovány za tvorby purpurové zbarveného komplexu Ruhemanovy červeně, absorbující v maximu při 570 nm s molárním extinkčním koeficientem cca  $2 \cdot 10^4 \cdot \text{cm}^{-1} \cdot 1 \cdot \text{mol}^{-1}$ . Sekundární aminokyseliny, jako prolin a hydroxyprolin, tvoří žlutě zbarvený komplex s minimální absorpcí při 440 nm a molárním extinkčním koeficientem 2 až  $4 \cdot 10^3$ .

Od doby, kdy byla chemická reakce ninhydrinu s aminokyselinami adaptována na plně automatizovaný systém analýzy, se pozornost zaměřuje na optimalizaci složení ninhydrinového činidla, vedoucí k zajištění požadovaného stabilního lineárního vztahu mezi vývojem charakteristického zbarvení komplexu a koncentrací látky. Reakcí aminokyselin s ninhydrinem vzniká barevný komplex Ruhemanovy červeně (Ruheman, J., J. Chem. Soc. 99, 707/1911/). Lineární vztah mezi intenzitou barevného komplexu a koncentrací aminokyselin a optimální vývoj zbarvení je zajišťován přítomností redukované formy ninhydrinu, hydrindantinu, v reakční směsi (Moore, S., Stein, W.H., 1948, J. Biol. Chem. 176, 367-388). Z odborné literatury je znám značný počet modifikací ninhydrinového činidla. Ve snaze zlepšit stabilitu a citlivost ninhydrinového systému byly zkoušeny různé ústroje, rozpouštědla a zejména různé redukující látky, zajišťující v systému vznik pro reprodukovatelný průběh reakce a optimální vývoj zbarvení nezbytné redukované formy ninhydrinu, hydrindantinu. Přidávání samotného hydrindantinu do systému sice svůj účel rovněž splní (Moore, S., Stein, W.H., 1954, J. Biol. Chem. 211, 907-913/), ale je pro jeho obtížnou dostupnost a vysokou cenu neekonomické. Různě obměňovány byly i koncentrace ninhydrinu a reakční teploty.

Jako rozpouštědlo byl zkoušen 2-methoxyethanol pufrovaný 4 N octanem sodným při pH 5,51 (Moore S., Stein, W.H., 1948, J. Biol. Chem. 176, 367-388), dimethylsulfoxid pufrovaný 4 N octanem lithným při pH 5,20 (Moore, S., 1968, J. Biol. Chem. 243, 6281-6283), dále pak tetramethylesulfon pufrovaný 4 N octanem lithným (Pickering, M.V., USP 4274833 /1981/) a ethylenglykol pufrovaný 4 N octanem sodným (Rausberg, P.H./1988/, Sborník z mezinárodní konference Analytika aminokyselin v zemědělství, Moskva 6.-7.4. 1988 /31 stran/).

Koncentrace ninhydrinu činí obvykle 2 % hmot., ale používá se i nižší. Užití reakční teploty je dáno konstrukcí reaktoru. Na rozdíl od reaktorů vodních jsou moderní kapilární reaktory vysokoteplotní, protože většina aminokyselin dosahuje maximálních hodnot barevného výtěžku při cca 125 °C.

K redukci ninhydrinu lze užít kyanidu draselného (Rosen, H., Berard, C.W., Levenson, S.M., 1962, Anal. Biochem. 4, 213-221,

Schwerdtfeger, E., 1962, *J. Chromatogr.* 7, 418-419) nebo kyseliny askorbové či jejích solí (Abdehalden, R. *Z. Physiol. Chem.* 252, 89 /1938/; West, E.S., Rinehart, R.E., 1942, *J. Biol. Chem.* 146, 105-108). Obě uvedené látky však musejí být přítomny v extrémně vysokém  $5 \cdot 10^{-3}$  M zředění, při kterém je obtížné udržet stabilitu činidla, protože dokonce již minutové působení kyslíku způsobuje velkou ztrátu schopnosti vyvíjet zbarvení. Přítomnost kyseliny askorbové v reakční směsi navíc vede k tvorbě artefaktů, které se na chromatogramu projevují negativně.

Úspěšné bylo užití chloridu cínatého jako redukční látky (Moore, S., Stein, W.H., 1948, *J. Biol. Chem.* 176, 67-388, Spackman, D.H., Stein, W.H., Moore, S., 1958, *Anal. Chem.* 30, 1190-1206). Činidlo však v průběhu stání vytváří bílou sraženinu cínatých solí, které zůstávají v zásobní nádrži, odkud se pak dostávají do průtočného systému analyzátoru a způsobují nepravidelnosti průtoku. V některých typech analyzátorů se proto zařazují do ninhydrinového průtočného systému filtry. Další nevýhodou tohoto systému je, že činidlo je k použití až po delší stání, kdy se zbarvení vyvíjí, prakticky se užívá až druhý den po přípravě (James, L.B., 1978, *J. Chromatogr.* 152, 298-300; *Ibid* 1984, 284, 97-103).

Chlorid titanitý, užitý jako redukční látka (James, L.B., 1971, *J. Chromatogr.* 59, 178-180), přináší výhody rychlejší přípravy a užití, činidlo je použitelné již i 30 minut po přípravě. Nevýhodou však je možná tvorba oxidů titanu, zejména oxidu titaničitého, který je nerozpustný dokonce i v silných kyselinách. Dalším nedostatkem je nutnost spektrofotometrické kontroly redukčního potenciálu chloridu titanitého před jeho užitím k přípravě činidla.

Velmi stabilní ninhydrinové činidlo, které netvoří precipitáty, bylo získáno redukcí ninhydrinu in situ tetrahydroboratem sodným v dimethylsulfoxidu (Moore, S., 1968, *J. Biol. Chem.* 243, 6281-6283). Užití tetrahydroboratu sodného jako redukční látky ve spojení s dimethylsulfoxidem jako rozpouštědlem a se 4 N lithiumpacetátovým pufrům o pH 5,2 k přípravě ninhydrinového činidla pro automatické analyzátorů aminokyselin (Takahashi, S., 1978, *J. Biochem.* 83, 57-60) je také předmětem japonské patentové přihlášky 81-55 853 (1979). V ní uvedeným postupem se sice podaří získat velmi stabilní ninhydrinové činidlo, jeho užití je však limitováno závažným nedostatkem, spočívajícím ve výrazném posunu základní linie při stanovení bazických aminokyselin. Uvedená skutečnost je autory vysvětlována ovlivněním tvorby zbarvení reakční směsi za vysokých hodnot pH, tj. pH vyšších než 8, tj. v případě pufrů používaných k eluci bazických aminokyselin. Navrhují kompromisní opatření, kterým je zvýšení základní linie v bazické oblasti chromatogramu možné částečně eliminovat. Navržený postup spočívá v užití nižší než limitní, to je optimální koncentrace tetrahydroboratu sodného, avšak za současného snížení barevného výtěžku pro všechny aminokyseliny. Alternativním postupem je současné snížení obsahu ninhydrinu a tetrahydroboratu v činidle asi na polovinu, přičemž je zvýšit třeba průtok ninhydrinového činidla tak, aby byl stejný jako průtok elučního pufru. Oba uvedené postupy umožňují použití uvedeného systému i pro analýzu bazic-

kých aminokyselin, ale s tím, že dosažené zvýšení základní linie ovlivňuje jednak nepříznivě přesnost stanovení v oblasti bazických aminokyselin, jednak způsobuje snížení barevného výtěžku a tím i citlivost metody - barevný výtěžek klesá u jednotlivých aminokyselin cca od 15 do 40 %.

Cílem vynálezu je odstranit výše uvedené nedostatky řešení, které představuje současný stav techniky v tomto oboru. Vynález je založen na poznatku, že tvorba barevného komplexu v bazické oblasti je negativně ovlivněna oxidativními vlastnostmi rozpouštědla - dimethylsulfoxidu, který za daných reakčních podmínek působí kompetitivně vůči tetrahydroboratu sodnému jako redukující složce ninhydrinu při tvorbě komplexu, a že tedy dimethylsulfoxid jako rozpouštědlo je třeba v systému nahradit rozpouštědlem jiným, nevykazujícím zmíněné nepříznivé vlastnosti, a v souvislosti s tím složení nového ninhydrinového činidla pro praktické použití v automatických analyzátorech aminokyselin optimalizovat.

Vytčeného cíle bylo dosaženo a předmětem vynálezu je ninhydrinové činidlo ke stanovení aminokyselin, zejména v automatických analyzátorech aminokyselin, jehož podstata spočívá v tom, že činidlo obsahuje v jednom litru 8 až 20 g ninhydrinu, 250 až 500 ml ústojného roztoku o hodnotě pH v rozmezí hodnot 5,3 až 5,7, například sodnooctanového pufru, 500 až 750 ml 2-methoxyethanolu a  $3 \cdot 10^{-2}$  až  $9 \cdot 10^{-2}$  g tetrahydroboratu sodného.

Předností ninhydrinového činidla podle vynálezu je, že při zachování všech výhod známých činidel s tetrahydroboratem jako redukční látkou nevykazuje nežádoucí posun - zvýšení základní linie při stanovení bazických aminokyselin při hodnotách pH vyšších než 8, který se projevuje u popsaného ninhydrinového činidla s dimethylsulfoxidem jako rozpouštědlem a s lithiiumacetátovým pufrům. Tato skutečnost dobře dokumentuje obr. č. 1, který znázorňuje srovnání detekce 17 aminokyselin hydrolyzátového programu za použití ninhydrinového činidla podle vynálezu a ninhydrinového činidla, připraveného podle japonské patentové přihlášky 81-55 853.

Předmětem vynálezu je rovněž způsob přípravy ninhydrinového činidla, jehož podstata spočívá v tom, že v předloženém rozpouštědle - 2-methoxyethanolu, zbaveném kyslíku probubláváním inertním plynem, například žárovkárenským dusíkem nebo argonem, se za míchání a stálého přívodu inertního plynu postupně a v uvedeném pořadí rozpustí ninhydrin a tetrahydroborat sodný, ke vzniklému roztoku se přidá paralelně připravený a kyslíku zbavený ústojný roztok a v přivádění inertního plynu se pokračuje až do odstranění posledních stop kyslíku ze systému.

Ninhydrinové činidlo připravené způsobem podle vynálezu netvoří v průtočném systému analyzátoru sraženiny. Na rozdíl od obdobných činidel jiného složení není zapotřebí čekat na jeho dozrání. Činidlo je velmi stabilní - při 20 °C více než 1 měsíc, při 4 °C, tj. při teplotě chladicího prostoru automatického analyzátoru aminokyselin, je lze použít i po tříměsíčním skladování.

Způsob přípravy ninhydrinového činidla podle vynálezu de-

tailněji objasňuje níže uvedený příklad provedení.

Do zásobní nádrže ninhydrinové baterie analyzátoru, z níž se pětiminutovým vyháněním žárovkárenského dusíku odstraní kyslík, se předloží 1,5 l 2-methoxyethanolu, ze kterého se 20 minutovým probubláváním dusíku rovněž odstraní kyslík. Pak se přidá 30 g ninhydrinu, který se za pokračujícího probublávání dusíkem rozpustí. Současně se na teflonovém filmu naváží 0,120 g tetrahydroboratu sodného a navážené množství se po rozpuštění ninhydrinu spolu s teflonovým filmem vnese do zásobní nádrže. Směs se dále míchá na magnetické míchačce po dobu 30 minut za stálého převodu dusíku. Potom se přidá předem připravený 4 N sodnooctanový pufr o pH 5,5 v množství 0,5 l, z něhož byl 10 minutovým probubláváním odstraněn kyslík. Po přidávku tetrahydroboratu sodného se barva roztoku postupně mění ze žluté do červené a po přidání pufru až do purpurové. Finální roztok se ještě 15 až 20 minut probublává dusíkem do odstranění posledních stop kyslíku. Tím je činidlo připraveno k analýze.

Pro rutinní použití je vhodné činidlo uchovávat v chlazeném prostoru analyzátoru, není to však vysloveně nutné.

#### P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Ninhydrinové činidlo ke stanovení aminokyselin, zejména v automatických analyzátoch aminokyselin, vyznačující se tím, že v jednom litru obsahuje  
8 až 20 g ninhydrinu,  
250 až 500 ml ústojného roztoku o hodnotě pH v rozmezí hodnot 5,3 až 5,7, například sodnooctanového pufru,  
500 až 750 ml 2-methoxyethanolu a  
 $3 \cdot 10^{-2}$  až  $9 \cdot 10^{-2}$  g tetrahydroboratu sodného.
2. Způsob přípravy činidla podle bodu 1, vyznačený tím, že v předloženém rozpouštědle - 2-methoxyethanolu, zbaveném kyslíku probubláváním inertním plynem, například žárovkárenským dusíkem nebo argonem, se za míchání a stálého přívodu inertního plynu postupně a v uvedeném pořadí rozpustí ninhydrin a tetrahydroborat sodný, ke vzniklému roztoku se přidá paralelně připravený a kyslíku zbavený ústojný roztok a v přivádění plynu se pokračuje až do odstranění posledních stop kyslíku ze systému.

---

Konec dokumentu

---