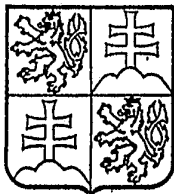


ČESKÁ A SLOVENSKÁ  
FEDERATIVNÍ  
REPUBLIKA  
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD  
PRO VYNÁLEZY

# POPIS VYNÁLEZU

## K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

273 657

(21) PV 3369-87.U  
(22) Přihlášeno 12 05 87

(40) Zveřejněno 14 08 90  
(45) Vydáno 24 03 92

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl. 5  
G 01 N 21/27  
G 01 N 21/78

(75) Autor vynálezu VALÍČKOVÁ MARTA prom. farm.,  
CHROMÝ VRATISLAV ing. CSc., BRNO

(54) Dvousložkové činidlo pro fotometrické  
stanovení hořčíku

(57) Činidlo se skládá ze dvou roztoků, a to z roztoku metalochromního indikátoru 1-azo-2-hydroxy-3-(2,4-dimethylkarboxyanilido)-naftalen-1'-(2-hydroxybenzenu) ve specifické směsi dvou organických rozpouštědel N,N-dimethylformamidu a dimethylsulfoxidu a z roztoku tetraboritanového pufru obsahujícího acyklický alkohol s celkovým počtem 1 až 3 atomy uhlíku. Obě složky jsou v činidle obsaženy v objemových poměrech 1 : 10 až 1 : 50. Dvousložkové činidlo se vyznačuje vysokou stálostí metalochromního indikátoru v roztoku a je zejména vhodné pro analýzu hořčíku v tělních tekutinách. Vlastní analytické činidlo pro stanovení hořčíku se připraví smícháním jeho obou složek ve výše uvedených poměrech před provedením analýzy.

Předmětem vynálezu je dvousložkové činidlo pro fotometrické stanovení hořčíku.

Je známo, že hořčík je nezbytný aktivátor řady enzymových pochodů zejména transfosforylačních a bývá nezbytným elementem i při oxidačních fosforylacích. Hraje významnou úlohu v metabolismu ribonukleových kyselin, cholesterolu, lipidů, aktivaci esterů cholesterolu a různých lipas, působí aktivačně při syntéze metabolismu bílkovin. Významný je i vliv hořčíku na centrální nervový systém; nedostatek hořčíku způsobuje zvýšenou dráždivost až tetanii. Snížený obsah hořčíku v séru byl zjištěn při poruchách nervových, cévních a srdečních, při těžkých průjmových onemocněních, cirhose jater a některých dalších onemocněních. Zvýšený obsah hořčíku je naproti tomu nacházen zejména při nedostatečnosti ledvin, při diabetických komatech a acidosách.

Z uvedeného vyplývá, že stanovení hořčíku zejména v krevním séru je důležitým ukazatelem řady vážných poruch. Proto je stanovení sérového hořčíku zařazeno do palety biochemických vyšetření prováděných v oddělení klinické biochemie.

Ke stanovení obsahu hořčíku, zejména v séru nebo v moči, byla postupně navržena celá řada analytických metod, z nichž v poslední době jednoznačně převažují metody instrumentální, založené na atomové absorpční spektrofotometrii a metody fotometrické, kdy se měří zbarvení barevných komplexů hořčíku s vhodnými analytickými činidly, například metalochromními indikátory. Fotometrické metody s ohledem na dostupné přístrojové vybavení většiny biochemických laboratoří zatím převažují.

Pro fotometrické stanovení hořčíku se v posledních letech využívá hlavně 1-azo-2-hydroxy-3-(2,4-dimethylkarboxyanilido)-naftalen-1'-(2-hydroxybenzen), nazývaný také komerčními názvy Magon nebo Xylidilová modř II. Podrobným studiem optických vlastností Magonu se zabývali například Svoboda a Chromý (Anal. Chim. Acta 54, 121 až 131, 1971) a jeho aplikaci pro fotometrické stanovení hořčíku v biologických tekutinách popsali Chromý a spol. (Biochem. Med. 7, 208 až 217, 1973). Při fotometrickém stanovení hořčíku Magonem se měří zbarvení relativně slabého komplexu o složení  $MgR_2$ , kde R je Magon, s konstantou stability  $K = 6,1 \cdot 10^9$  a absorpčním molárním koeficientem  $4,3 \cdot 10^4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ . Pracuje se s nejméně trojnásobným přebytkem činidla a měří se při vlnové délce 505 nm.

Komplex je nutné měřit v prostředí obsahujícím 60 až 40 objemových dílů vody a 40 až 60 objemových dílů alkoholu. Jinak klesá citlivost stanovení a jak činidlo, tak i komplex se z reakční směsi vylučují. Vyšší množství alkoholu je naopak nepříznivé, neboť při analýze biologických tekutin způsobuje srážení bílkovin ze vzorku. Z uvedených důvodů se obvykle připravuje roztok Magonu v alkoholu, který se před analýzou smíchá se stejným množstvím vodného roztoku pufru. Poměrně velmi specifické a přesné dodržení optimálních reakčních podmínek klade vysoké nároky na složení, stálost a čistotu analytického činidla.

Nevýhodou metalochromního činidla Magon je jeho malá rozpustnost ve vodě a polárních rozpouštědlech. Proto se obvykle připravují roztoky Magonu rozpouštěním ve vroucím ethanolu nebo rozpouštěním v dimethylformamidu a naředěním ethanolem. Jak bylo zjištěno, ani tyto roztoky nejsou stálé a vhodné pro analytické účely. Magon se z těchto roztoků postupně vylučuje ve formě nerozpustné látky, klesá jeho účinná koncentrace v činidle a mění se jak směrnice kalibrační přímky, tak i lineární rozsah kalibrační funkce. Magon vyloučený spontánně z ethanolového roztoku se během stárnutí již nechová jako metalochromní indikátor, jedná se pravděpodobně o oxidovanou formu, která není vhodná pro fotometrické účely. Uvedené nevýhody, nízká rozpustnost Magonu, změny, kterým podléhá v roztoku ethanolu, mají nepříznivý vliv na fotometrické stanovení hořčíku, neboť se mění citlivost reakce a průběh kalibrační funkce.

Zejména při stanovení hořčíku v séru nemocných s vážnými ledvinovými poruchami, kdy rychle vzrůstá obsah hořčíku v séru, nestačí analytická koncentrace Magonu v činidle a narůstá nebezpečí nesprávné analýzy, diagnózy a postupu léčebného procesu. V řadě případů je nutné sérum ředit a výsledkem je další snížení přesnosti analýzy. Je proto žádoucí

tyto nevýhody odstranit a připravit takové analytické činidlo pro fotometrické stanovení hořčíku, které by nemělo uvedené nedostatky.

Nevýhody odstraňuje dvousložkové činidlo pro fotometrické stanovení hořčíku na bázi 1-azo-2-hydroxy-3-(2,4-dimethylkarboxyanilido)-naftalen-1'-(2-hydroxybenzenu) a tetraboritanového pufru. Jeho podstata spočívá v tom, že se skládá z jednoho objemového dílu roztoku obsahujícího 1 až 10 mmol/l 1-azo-2-hydroxy-3-(2,4-dimethylkarboxyanilido)-naftalen-1'-(2-hydroxybenzenu), 5 až 7 mol/l N,N-dimethylformamidu a 4 až 9 mol/l dimethylsulfoxidu a 10 až 50 objemových dílů vodně-alkoholického roztoku obsahujícího 0,005 až 0,1 mol/l tetraboritanu alkalického kovu a 4 až 15 mol/l acyklického alkoholu o celkovém počtu 1 až 3 atomů uhlíku.

Roztok Magonu podle vynálezu se vyznačuje velmi dobrou stabilitou, Magon se nevyklučuje z roztoku a jeho složení se dlouhodobě nemění. Uvedená kombinace dvou specifických organických rozpouštědel umožňuje podstatně zvýšit obsah Magonu v roztoku a zabráňuje jeho nevratným změnám. Kombinace vodného roztoku pufru s alifatickým alkoholem, který je obvykle nezbytnou součástí reakční směsi při stanovení hořčíku Magonem, stabilizuje dlouhodobě roztok pufru a chrání jej před bakteriální kontaminací. Pro vlastní fotometrické stanovení hořčíku se připraví reakční směs smícháním roztoku Magonu s roztokem pufru, například 1 díl roztoku Magonu a 25 dílů roztoku pufru podle vynálezu, které zaručují optimální složení reakční směsi pro fotometrické stanovení hořčíku. Směs obsahuje dostatečný přebytek Magonu postačující i pro analýzu biologických tekutin obsahujících patologicky zvýšený obsah hořčíku. Lze například provádět přímo, bez ředění, analýzu sér dialyzovaných nemocných obsahujících až 2 mmol hořčíku v litru séra.

Dvousložkové činidlo podle vynálezu lze průmyslově vyrábět, neboť jeho obě složky jsou stále a zaručují dlouhodobě přesné a správné fotometrické stanovení hořčíku s citlivostí a přesností požadovanou pro biochemické analýzy a v koncentračním rozsahu vhodném pro analýzu běžných biologických tekutin, zejména séra a plazmy, aniž by bylo nutné biologické vzorky před analýzou ředit.

#### Příklad 1

a) Připraví se roztok obsahující 1,44 g (3,5 mmol) 1-azo-2-hydroxy-3-(2,4-dimethylkarboxyanilido)-naftalen-1'-(2-hydroxybenzenu) (dále jen Magon), 450 ml (5,85 molů) N,N-dimethylformamidu a 450 ml (6,34 molů) dimethylsulfoxidu.

b) Připraví se 25 l roztoku pufru obsahujícího 97,6 g (0,25 molů) tetraboritanu sodného dekahydrátu v 10,2 l (0,57 molů) destilované vody a 12,2 l (214,6 molů) ethanolu. Roztok se promíchá a jeho pH se upraví postupným přidáváním hydroxidu sodného na pH 10,9 (potřeba asi 20 g hydroxidu sodného) a doplní se vodou na 25 l.

Pro fotometrické stanovení se připraví reakční směs obsahující jeden objemový díl roztoku a) a 25 objemových dílů roztoku b).

#### Příklad 2

a) Připraví se roztok 0,82 g (1,9 mmolů) Magonu ve směsi 365 g (5 molů) N,N-dimethylformamidu a 702 g (8,98 molů) dimethylsulfoxidu.

b) Připraví se 1 000 ml pufru obsahujícího 0,005 molů tetraboritanu draselného a 480 g (14,98 molů) methanolu a doplní se vodou na 1 000 ml. Jeho pH se nastaví na hodnotu  $11 \pm 0,2$ .

Před použitím se smíchají dva objemové díly roztoku a) s 25 objemovými díly roztoku b).

## Příklad 3

a) Připraví se roztok obsahující 4,1 g (9,9 mmolů) Magonu, 511 g (6,99 molů) N,N-dimethylformamidu a 313 g (4 moly) dimethylsulfoxidu.

b) Připraví se 1 000 ml pufru obsahujícího 0,1 molu tetraboritanu draselného a 241 g (4,0 mol) 1-propanolu, doplní se vodou na 1 000 ml a pH se nastaví jako v příkladu 1b).

Před fotometrickým stanovením hořčíku se smíchá 1 objemový díl roztoku a) s 50 objemovými díly roztoku b).

## P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Dvousložkové činidlo pro fotometrické stanovení hořčíku na bázi 1-azo-2-hydroxy-3-(2,4-dimethylkarboxyanilido)-naftalen-1'-(2-hydroxybenzenu) a tetraboritanového pufru, vyznačující se tím, že se skládá z jednoho objemového dílu roztoku obsahujícího 1 až 10 mmol/l 1-azo-2-hydroxy-3-(2,4-dimethylkarboxyanilido)-naftalen-1'-(2-hydroxybenzenu), 5 až 7 mol/l N,N-dimethylformamidu a 4 až 9 mol/l dimethylsulfoxidu a 10 až 50 objemových dílů vodně-alkoholického roztoku obsahujícího 0,005 až 0,1 mol/l tetraboritanu alkalického kovu a 4 až 15 mol/l acyklického alkoholu o celkovém počtu 1 až 3 atomů uhlíku.