

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

32 361

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/46 (2006.01)
G01N 31/22 (2006.01)
C12N 11/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2018-35268**
(22) Přihlášeno: **20.08.2018**
(47) Zapsáno: **26.11.2018**

(73) Majitel:
ORITEST spol. s r.o., Praha 5, Smíchov, CZ

(72) Původce:
prof. Ing. Vladimír Pitschmann, CSc., Praha, CZ
Ing. Lukáš Matějovský, Hostivice, CZ

(54) Název užitého vzoru:
**Kolorimetrický biosenzor inhibitorů
cholinesteráz s dynamickým etalonem**

CZ 32361 U1

Kolorimetrický biosenzor inhibitorů cholinesteráz s dynamickým etalonem

Oblast techniky

Technické řešení se týká konstrukce jednoduchého kolorimetrického biosenzoru nervově paralytických látek a jiných vysoce toxických inhibitorů cholinesteráz ve vodě, v ovzduší i na kontaminovaných površích.

Dosavadní stav techniky

Kolorimetrické detektory, chemosenzory a biosenzory jsou z uživatelského hlediska jednoduché technické prostředky ke zjišťování nejrůznějších chemických látek. Příkladem takových prostředků mohou být indikační papírky, pásy a detekční trubičky. Tyto prostředky se používají také k detekci bojových chemických látek včetně nervově paralytických látek, které účinkují jako mohutné inhibitory cholinesteráz. Zejména kolorimetrické biosenzory inhibitorů cholinesteráz jsou vhodné pro rychlou, jednoduchou, a přitom selektivní terénní i laboratorní analýzu. Jejich nezastupitelné místo je při ochraně jednotlivce ve zvláště obtížných podmínkách, zejména pak když jsou odkázáni pouze na sebe. Mohou být použity ke kontrole ovzduší, vody i povrchů. [Halánek E., Kobliha Z., Pitschmann V.: Analýza bojových chemických látek. Univerzita obrany, Brno 2007]. Příkladem takových biosenzorů, používaných jako osobní detektory, je český prostředek DETEHIT, kanadský NAVD, francouzský DET INDIV mle F1, izraelský CDK nebo americký M256A1.

Všechny kolorimetrické biosenzory inhibitorů cholinesteráz jsou založené na enzymatické (cholinesterázové) reakci, tj. na katalytické hydrolýze vhodného substrátu cholinesterázou a barevné indikaci jeho hydrolytického produktu. Stupeň inhibice enzymu, daný rychlostí barevné změny, je pak úměrný koncentraci škodliviny. Nejbližším řešením je biosenzor/osobní detektor DETEHIT, který obsahuje enzym acetylcholinesterázu, substrát acetylthiocholin jodid a kyselinu 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoovou). V nepřítomnosti inhibitoru dochází k hydrolýze substrátu na thiocholin, jímž je chromogenní indikátor redukován na žlutě zbarvený produkt; v důsledku inhibice enzymu žádné zabarvení nevzniká, respektive vzniká později [Tušarová I., Halánek E.: CZ 288576 (2001)]. Známé modifikace biosenzoru DETEHIT obsahují chromogenní indikátory s výraznějším barevným efektem, např. 2,6-dichlorfenolindofenol nebo některé látky ze skupiny trifenylmetanových barviv [Pitschmann V., Matějovský L.: CZ 30 380 (2017); Pitschmann V., Matějovský L.: CZ 30 670 (2017); Pitschmann V., Matějovský L.: CZ 30 996 (2017); Pitschmann V., Matějovský L.: CZ 31 941 (2018)].

Jednou z hlavních předností jednoduchých kolorimetrických biosenzorů je možnost vyhodnocení barevného efektu vizuálně (volným okem). Tento způsob vyhodnocení je zcela namístě při orientačním zjišťování přítomnosti inhibitorů cholinesteráz ve vzorku, může však činit potíže při pokusu o jejich kvantitativní, resp. semikvantitativní stanovení. Tento nedostatek odstraňuje nebo podstatně omezuje konstrukce biosenzoru podle technického řešení.

Podstata technického řešení

Podstatou technického řešení je kolorimetrický biosenzor inhibitorů cholinesteráz v ovzduší, ve vodě i na površích, který je tvořen plastovou podložkou 1, na níž jsou nalepeny dvě tkaniny 2 a 3 s imobilizovaným enzymem, přičemž jedna z nich slouží jako detekční tkanina 2 a druhá jako dynamický etalon 3, a dále dva filtrační papíry 4 impregnované substrátem a indikátorem.

Základním prvkem technického řešení je zavedení dynamického etalonu, jenž nemá funkci obyčejného barevného standardu, jak je tomu u známých biosenzorů inhibitorů cholinesteráz.

Naopak, tento dynamický etalon, jehož složení je stejné jako složení detekční tkaniny (indikační zóny), slouží k provedení srovnávacího (slepého) testu. Zakomponováním dynamického etalonu do konstrukce biosenzoru se významně zvyšuje spolehlivost provedeného testu a zároveň zvyšuje jeho citlivost (nižší detekční limit), neboť o přítomnosti inhibitoru cholinesteráz ve vzorku lze rozhodnout už při malém časovém rozdílu změny zabarvení indikační zóny a etalonu.

Příklad uskutečnění technického řešení

- 10 Biosenzor, jehož konstrukční schéma je znázorněno na výkrese, je tvořen podložkou z plastu 1, na níž je nalepena detekční tkanina 2, dynamický etalon 3 a dva filtrační papíry 4 impregnované substrátem a indikátorem.

- 15 Detekční tkanina 2 a dynamický etalon 3 se připraví tak, že bílá celulózová tkanina se ponoří na dobu 25 minut do roztoku, který obsahuje butyrylcholinesterázu o specifické aktivitě 10 nkat/ml, 3,5 % (hmotn.) dextranu a 1,5 % (hmotn.) neiontové povrchově aktivní látky (C12-14 alkohol 7EO, Laureth-7) v tlumivém roztoku pH 7,4. Po impregnaci se tkanina vysuší při teplotě 20 až 25°C.

- 20 Papír se substrátem a chromogenním činidlem 4 se připraví tak, že filtrační papír se ponoří na dobu 5 minut do roztoku, který obsahuje 0,4 % (hmotn.) butyrylthiocholin jodidu a 0,2 % (hmotn.) N-ethyl-N-[4-[4[ethyl(3-sulfofenyl)methyl[amino]fenyl]fenylmetylen]-2,5-cyklohexadien]-1-yliden]-3-sulfo-benzenmethan aminiumnatrium hydroxidu - vnitřní soli (CAS 4680-78-8) v methanolu. Impregnovaný papír se vysuší při teplotě 20 až 25°C.

- 25 Použití biosenzoru pro analýzu vody je následující. Detekční tkanina 2 se ponoří do analyzovaného vzorku, po uplynutí 1 minuty se detektor vyjme a ponechá nejméně 1 minutu inkubovat. Exponovaná detekční tkanina 2 se opláchne nekontaminovanou vodou a ovlhčí se i etalon 3. Plastová podložka 1 se přeloží a obě ramena se přitisknou (po dobu minimálně 1 minuty) tak, aby tkaniny 2 a 3 s enzymem přiléhaly k filtračním papírům se substrátem a indikátorem. Po oddělení zón se sleduje změna zabarvení detekční tkaniny 2 ve srovnání s etalonem 3. Podobně se postupuje i při kontrole ovzduší nebo povrchů, s tím rozdílem, že detekční tkanina 2 se před použitím biosenzoru navlhčí vodou.

- 35 Průmyslová využitelnost

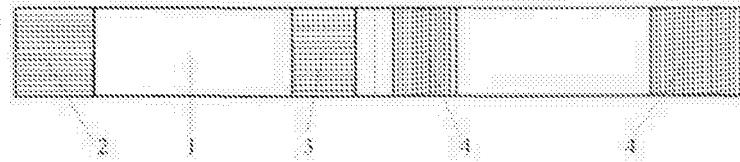
- 40 Technické řešení lze využít při výrobě kolorimetrického biosenzoru inhibitorů cholinesteráz, jenž je určen pro speciální jednotky Armády České republiky, Hasičského záchranného sboru České republiky a ostatních složek integrovaného záchranného systému ke kontrole vojensky významných nervově paralytických látek nebo organofosforových a karbamátových insekticidů ve vodě, ovzduší a na površích.

45 **NÁROKY NA OCHRANU**

1. Kolorimetrický detektor inhibitorů cholinesteráz v ovzduší, ve vodě i na površích, **vyznačující se tím**, 6 že je tvořen plastovou podložkou (1), na níž jsou nalepeny dvě tkaniny (2) a (3) s imobilizovaným enzymem, přičemž jedna z nich slouží jako detekční tkanina (2) a druhá jako dynamický etalon (3), a dále dva filtrační papíry (4) impregnované substrátem a indikátorem.

1 výkres

55



Obr. 1