

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

285 242

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1179-93**

(22) Přihlášeno: **17. 06. 93**

(40) Zveřejněno: **18. 10. 95**
(Věstník č. 10/95)

(47) Uděleno: **19. 04. 99**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **16. 06. 99**
(Věstník č. 6/99)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 G 1/46

C 12 N 11/12

(73) Majitel patentu:

ORITEST, SPOL. S. R. O., Praha, CZ;

(72) Původce vynálezu:

Tušarová Ivana ing., Praha, CZ;

Halámek Emil prof. CSc., Vyškov, CZ;

Orel Josef, Praha, CZ;

(74) Zástupce:

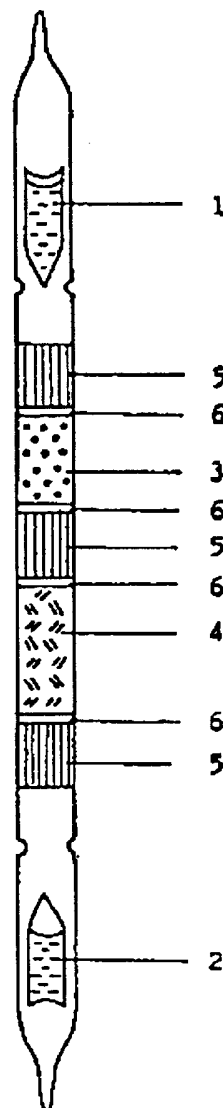
PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jívenská 1273,
Praha 4, 14021;

(54) Název vynálezu:

**Detekční trubička inhibitorů
cholinesteráz ve vzduchu a vodě**

(57) Anotace:

Řešení se týká detekční trubičky inhibitorů cholinesteráz ve vzduchu a vodě, která obsahuje dvě ampulky s tlumivým roztokem pH 6,0 až 9,0, srovnávací vrstvu z drceného skla impregnovanou směsí substrátu a chromogenního činidla nebo chromogenním substrátem a indikační vrstvu z granulované bělené celulózy s imobilizovanou cholinesterázou. Srovnávací vrstva z drceného skla obsahuje jako substrát acetylthiocholin nebo butyrylthiocholin a jako chromogenní činidlo kyselinu 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoovou). Nebo srovnávací vrstva obsahuje jako substrát acetylthiocholin nebo butyrylthiocholin a jako chromogenní činidlo N-ethyl-N-[4-[4-ethyl-3-sulfofenyl]methylaminofenyl]fenylmethylen-2,5-cyklohexadien]-1-yliden]-3-sulfobenzenmethanaminiumnatriumhydroxid-vnitřní sůl. Nebo srovnávací vrstva obsahuje chromogenní substrát, 1-[thiazolylazo]-2-acetoxy-5-methylbenzodimethylsulfát. Indikační vrstva s výhodou obsahuje hovězí mozkovou acetylcholinesterázu nebo plazmovou koňskou butyrylcholinesterázu.



CZ 285 242 B6

Detekční trubička inhibitorů cholinesteráz ve vzduchu a voděOblast techniky

Vynález se týká trubičky k detekci inhibitorů cholinesteráz ve vzduchu a vodě. Vynález řeší konstrukci prostředku k určení extrémně toxických sloučenin významných v oblasti vojenské a průmyslové chemie, agrochemie, monitorování životního prostředí, po civilní obranu a bezpečnost státu.

Dosavadní stav techniky

Pro detekci a stanovení početného souboru inhibitorů cholinesteráz [AMMON R. – VOSS G., Pflügers Arch. ges. Physiol., 235 (1935), s. 393; MICHEL O., H., J., Lab clin. Med., 34 (1949), s. 1564], je široce využívána v celé řadě modifikací a aplikací biochemická cholinesterázová reakce jako velmi citlivá a selektivní metoda. Na cholinesterázové reakci jsou založeny různé typy technických prostředků k detekci a stanovení inhibitorů cholinesteráz, počínaje komplikovanými automatickými analyzátory ovzduší a vody, přes jednodušší provedení, jako jsou detekční trubičky [LEICHNITZ, K.: Prüfröhrchen–Taschenbuch. 5. Ausgabe, Drägenwerk AG, Lübeck 1982, s. 131], až po nejjednodušší, ale o to více používané detekční papíry [WP 85/04423, čs. autorské osvědčení č. 2701].

Doposud známé typy trubiček založených na biochemické cholinesterázové reakci mají bez ohledu na konstrukční řešení obdobnou citlivost a selektivitu.

Komerčně dostupné detekční trubičky jsou konstrukčně zatavené skleněné trubičky obsahující oddělené vrstvy inertních nosičů a sorbentů s činidly a ampulky s kapalnými činidly, potřebnými pro biochemickou enzymovou reakci. Obvykle mají trubičky sorpční vrstvu, nejčastěji silikagelovou, na které se při prosávání vzduchu trubičkou sorbují inhibitory. Pak se na tuto vrstvu převede enzym, a po inkubaci enzymu s inhibitorem substrát, buď postupným rozbitím ampulek s roztoky činidel, nebo spláchnutím činidel z inertních nosičů rozpuštěním suchých činidel po rozbití ampulky s tlumivým roztokem. I přes komplikované provedení je tento biochemický reakční princip jediným, který je dostatečně citlivý na přítomnost extrémně toxických inhibitorů cholinesteráz v ovzduší a stále používaným pro konstrukci jednoduchých technických prostředků. Nejbližším známým řešením trubičky k určení inhibitorů cholinesteráz ve vzduchu je biochemická trubička používaná v armádě a Civilní obraně ČR a SR. Trubička obsahuje ampulku s pufrovaným roztokem butyrylcholinesterázy a ampulku s roztokem substrátu butyrylcholinjodidu a acidobazického indikátoru fenolové červeně. Po rozbití ampulky s enzymem a prosátí analyzovaného vzduchu přes vrstvu drceného skla smočeného roztokem butyrylcholinesterázy a po rozbití ampulky s roztokem substrátu a acidobazickým indikátorem se vizuálně porovná změna zbarvení náplně zkušební a srovnávací průkazníkové trubičky. Nevýhodou takovýchto trubiček je krátká doba expirace v důsledku toho, že jak enzym, tak i substrát jsou ve vodném roztoku a rovněž principiální závislost detekce na kyselých a bazických látkách zachycených z analyzovaného vzduchu v trubičce. Výhodnějším řešením biochemické trubičky s dobrou stabilitou při skladování je trubička podle NL 1568383. Trubička obsahuje jednu ampulku s tlumivým roztokem a lyofilizované preparáty enzymu a chromogenního substrátu s přidáním látek urychlujících rozpouštění činidel v tlumivém roztoku a indikační zónu, na které se sorbují inhibitory. Po otevření trubičky a prosátí vzduchu se rozbitím ampule s pufrem oba rozpustné preparáty, enzym i chromogenní substrát, smyjí na indikační vrstvu se sorbovanými inhibitory a vyhodnotí se zbarvení této vrstvy po proběhnutí enzymové reakce.

Užívané trubičky neumožňují analýzu vody a vodných roztoků.

Uvedené nedostatky, zejména nízká životnost trubiček, rušivý vliv kyselých a bazických látek, nižší citlivost, nemožnost analýzy vody, při vysokých ekonomických nákladech na výrobu, jsou odstraněny detekční trubičkou inhibitorů cholinesteráz ve vzduchu a vodě podle vynálezu.

5

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je detekční trubička inhibitorů cholinesteráz ve vzduchu a vodě, která obsahuje dvě ampulky s tlumivým roztokem pH 6,0 až 9,0, srovnávací vrstvu z drceného skla impregnovanou směsí substrátu a chromogenního činidla nebo chromogenním substrátem a indikační vrstvu z granulované bělené celulosy s imobilizovanou cholinesterázou. S výhodou srovnávací vrstva z drceného skla obsahuje jako substrát acetylthiocholin nebo butyrylthiocholin a jako chromogenní činidlo kyselinu 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoovou). Nebo s výhodou srovnávací vrstva obsahuje jako substrát acetylthiocholin nebo butyrylthiocholin a jako chromogenní činidlo N-ethyl-N-[4[4ethyl[3sulfofenyl)methyl]amino]fenyl]fenylmethylen]-2,5-cyklohexadien]-1-yliden]-3-sulfobenzen-methan aminiumnatrium hydroxid-vnitřní sůl. Nebo s výhodou srovnávací vrstva obsahuje chromogenní substrát, 1-[thiazolylazo]-2-acetoxy-5-methylbenzen dimethylsulfát.

Indikační vrstva s výhodou obsahuje hovězí mozkovou acetylcholinesterázu nebo plasmovou koňskou butyrylcholinesterázu.

Použití trubičky spočívá v prosávání vzduchu obsahujícího páry nebo aerosol inhibitorů cholinesteráz indikační vrstvou zvlhčenou tlumivým roztokem rozbitím ampulky nebo v smočení indikační vrstvy analyzovanou vodou. Po ukončení prosávání nebo po vyjmutí z vody a po době inkubace imobilizovaného enzymu na indikační vrstvě se sorbovaným inhibitorem se na indikační vrstvu smyje ze srovnávací vrstvy substrát a chromogenní činidlo nebo chromogenní substrát rozbitím ampulky s tlumivým roztokem a porovná se zbarvení indikační a srovnávací vrstvy.

30

Trubička podle vynálezu má proti dosud používaným trubičkám vyšší citlivost při důkazu inhibitorů cholinesterázy v důsledku použití specifického enzymu a substrátu a možnosti dalšího zvýšení citlivosti prodloužením inkubace enzymu s inhibitorem, delší expirací a umožňuje důkaz inhibitorů i ve vodě a vodných extraktech ze vzorků v širokém rozpětí pH, a porovnání rychlosti vybarvování indikační a srovnávací vrstvy umožňuje semikvantitativní vyhodnocení koncentrace inhibitoru.

35

Přehled obrázků na výkresech

40

Na připojeném výkresu je znázorněný model trubičky.

Příklady provedení vynálezu

45

Trubička podle obrázku 1 sestává ze dvou ampulek s tlumivým roztokem 1 a 2, ze srovnávací vrstvy 3 impregnované substrátem a chromogenním činidlem nebo chromogenním substrátem, z indikační vrstvy 4 s imobilizovanou cholinesterázou. Vrstvy jsou od sebe odděleny a v trubičce utěsněny polyethylenovými hvězdičkami 5, hvězdičky 5 jsou od vrstev odděleny sítěmi z polyamidové tkaniny 6.

50

Příklad 1

Trubička podle obrázku 1 obsahuje 2 ampulky s fosfátovým tlumivým roztokem pH 8,5, srovnávací vrstva je 0,1 g žluté skleněné drtě ($\lambda_{\max}$ 412 nm) zrnitosti 1,0 až 1,2 mm impregnované ethanolovým roztokem obsahujícím 1 % acetylthiocholinjodidu a 0,3 % kyseliny 5,5'-dithio-bis(2-dinitrobenzoové). Indikační vrstva je 0,05 g bílé granulované celulosy zrnitosti 0,8 až 1,2 mm s imobilizovanou acetylcholinesterázou o specifické aktivitě 1,5 nkat na 1 mg celulosy. Po ulomení konců trubičky a rozbití ampulky pod indikační vrstvou tak, aby roztok z ampulky smočil indikační vrstvu, se trubičkou prosává analyzovaný vzduch. Po ukončení prosávání se rozbije ampulka s tlumivým roztokem nad srovnávací vrstvou a roztok se setřepe na indikační vrstvu. Za přítomnosti inhibitorů v analyzovaném vzduchu zůstane indikační vrstva bílá, neinhibovaná indikační vrstva se zbarví do 1 minuty žlutě. Při prosávání 1,4 l vzduchu za minutu v průběhu 2 minut je možné zjistit $5 \cdot 10^{-7}$ mg.l⁻¹ isopropylmethylfosfonofluoridatu, $3 \cdot 10^{-7}$ mg.l⁻¹ pinakolylmethylfosfonofluoridatu, $2 \cdot 10^{-7}$ mg.l⁻¹ O-ethyl-S-(2-diisopropylaminoethyl)methylthiofosfonatu a $1 \cdot 10^{-7}$ mg.l⁻¹ 2-imethylaminoethylmethylamidofosfofluoridatu.

Příklad 2

Trubička podle obrázku 1 obsahuje 2 ampulky s fosfátovým tlumivým roztokem pH 7,6, srovnávací vrstva je 0,1 g modré skleněné drtě ($\lambda_{\max}$ 580 nm) zrnitosti 1,0 až 1,2 mm impregnované lyofilizací s ethanolovým roztokem obsahujícím 0,6 % 1-[2-thiazolylazo]-2-acetoxy-5-methylbenzen dimethylsulfátu. Indikační vrstva je 0,05 g bělené granulované celulosy zrnitosti 1 mm s imobilizovanou butyrylcholinesterázou o specifické aktivitě 3 nkat na 1 mg celulosy. Po ulomení konců trubičky se indikační vrstva trubičky na 1 minutu ponoří do analyzovaného vodného roztoku, po vyjmutí a 30 minutách inkubace se rozbije ampulka s tlumivým roztokem nad srovnávací vrstvou a roztok se setřepe na indikační vrstvu. Výchozí žluté zbarvení indikační vrstvy za přítomnosti inhibitorů v analyzovaném vodném roztoku zůstane světle žluté. V nepřítomnosti inhibitorů ve vodě indikační vrstva do 2 minut zmodrá, stejně jako srovnávací vrstva. Po 30 minutách inkubace je možné zjistit 0,08 mg.l⁻¹ dichlorvosu, 0,4 mg.l⁻¹ phosdrinu, 0,04 mg.l⁻¹ carbofuranu, 0,3 mg.l⁻¹ aldicarbu.

Průmyslová využitelnost

Detekční trubička podle vynálezu je použitelná pro účely chemického průzkumu a kontroly a při monitorování životního prostředí, v chemickém a farmaceutickém průmyslu, v zemědělství a lesním hospodářství.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Detekční trubička inhibitorů cholinesteráz ve vzduchu a vodě, **vyznačující se tím**, že obsahuje dvě ampulky s tlumivým roztokem pH 6,0 až 9,0, srovnávací vrstvu z drčeného skla impregnovanou směsí substrátu a chromogenního činidla nebo chromogenním substrátem a indikační vrstvu z granulované bělené celulosy s imobilizovanou cholinesterázou.

2. Detekční trubička inhibitorů cholinesteráz ve vzduchu a vodě podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že srovnávací vrstva z drceného skla obsahuje jako substrát acetylthiocholin nebo butyrylthiocholin a jako chromogenní činidlo kyselinu 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoovou).

5

3. Detekční trubička inhibitorů cholinesteráz ve vzduchu a vodě podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že srovnávací vrstva obsahuje jako substrát acetylthiocholin nebo butyrylthiocholin a jako chromogenní činidlo N-ethyl-N-[4-[4[ethyl(3-sulfofenyl)methyl]amino]fenyl]fenylmethylen]-2,5-cyklohexadien]-1-yliden]-3-sulfo-benzenmethan aminiumnatrium hydroxid-vnitřní sůl.

10

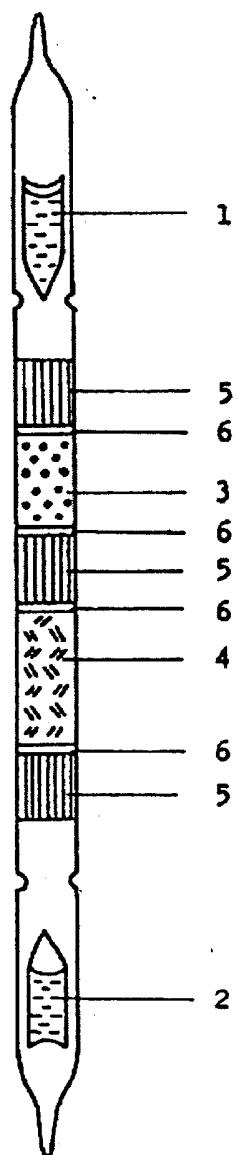
4. Detekční trubička inhibitorů cholinesteráz ve vzduchu a vodě podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že srovnávací vrstva obsahuje chromogenní substrát 1-[thiazolylazo]-2-acetoxy-5-methylbenzen dimethylsulfát.

15

5. Detekční trubička inhibitorů cholinesteráz ve vzduchu a vodě podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že indikační vrstva obsahuje hovězí mozkovou acetylcholinesterázu nebo plazmovou koňskou butyrylcholinesterázu.

20

1 výkres



Konec dokumentu
