



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

228 836

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 01 10 82
(21) PV 6997-82

(51) Int. Cl.³ G 01 N 21/17

(40) Zveřejněno 15 09 83
(45) Vydáno 01 01 86

(75)

Autor vynálezu FISCHER JIŘÍ RNDr.,
CHROMÝ VRATISLAV ing. CSc., BRNO

(54) Činidlo pro fotometrické kinetické stanovení kreatininu pro potlačení interference bilirubinu

Činidlo podle vynálezu obsahuje na 1 mol kyseliny pikrové dané množství molů mědnaté soli, s výhodou síranu nebo chloridu mědnatého, dané množství molů vinanu sodnodraselného a molů dibutyl-naftalensulfonanu sodného. Činidlo dále obsahuje určité množství molů hydroxidu sodného.

Stanovení obsahu kreatininu v séru a moči je vhodné pro laboratorní diagnostickou metodu při sledování onemocnění ledvin.

Předmětem vynálezu je činidlo pro fotometrické kinetické stanovení kreatininu pro potlačení interference bilirubinu.

Stanovení obsahu kreatininu v séru a moči je závažná laboratorní diagnostická metoda při sledování onemocnění ledvin, která patří mezi běžné analyzy prováděné ve všech základních typech zdravotnických zařízení.

Fotometrické metody stanovení obsahu kreatininu v biologickém materiálu jsou většinou založeny na Jaffého reakci kreatininu s alkalickým roztokem kyseliny pikrové za vzniku oranžově zbarveného reakčního produktu. Tato reakce je málo specifická a kromě kreatininu reaguje i řada dalších složek séra, například glukosa, některé ketošloučeniny a redukující látky, které jsou souhrnně zahrnovány pod tak zvané pseudochromogeny.

Složitější pracovní postupy při fotometrickém stanovení kreatininu v biologickém materiálu často navazují na předchozí separaci interferujících látek, nebo separaci kreatininu ze vzorku. Jsou pracné a časově náročné a v praxi se proto téměř neužívají. Jednoduché starší rutinní metody fotometrického stanovení sérového kreatininu jsou většinou založeny na fotometrickém stanovení po předchozí deproteinaci séra, čímž se eliminuje

zejména nepříznivý vliv bílkovin a bilirubinu.

228 836

Kinetické metody stanovení sérového kreatininu jsou podstatně rychlejší a jednodušší, není nutná deproteinace. Vynechání deproteinace sérových bílkovin je v kinetických postupech nahrazeno přidavkem povrchově aktivních látek, obvykle laurylsulfátu sodného, který vliv bílkovin částečně eliminuje. Interference dalších pseudochromogenů je při kinetickém způsobu stanovení potlačena vlivem jejich rozdílných reakčních rychlostí ve srovnání s reakční rychlostí kreatininu s kyselinou pikrovou. Tak například stanovení v tomto případě neruší acetoctan, kyselina močová a kyselina askorbová. Není ale potlačena interference bilirubinu, jehož přítomnost způsobuje zápornou chybu úměrnou jeho koncentraci v analysovaném vzorku. I při běžné koncentraci bilirubinu v séru 20 $\mu\text{mol/l}$ může při kinetickém stanovení s dosud známými činidly dosáhnout systematická záporná chyba až 25 $\mu\text{mol kreatininu/l}$. Falešně nižší hodnota sérového kreatininu vlivem interference bilirubinu může mít za následek mylnou diagnosu a poškození nemocného, zejména u počátečních stavů ledvinového poškození. Je tedy žádoucí připravit pro fotometrické kinetické stanovení kreatininu v biologických tekutinách takové činidlo, které by vliv sérového bilirubinu eliminovalo.

K eliminaci vlivu bilirubinu při fotometrickém kinetickém stanovení kreatininu směřuje činidlo podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že na 1 mol kyseliny pikrové obsahuje 0,01 až 0,06 molů měďnaté soli, s výhodou síranu nebo chloridu měďnatého, 0,01 až 0,2 molů vinanu sodnodraselného a 0,5 až 0,9 molů dibutyl-naftalensulfonanu sodného. Činidlo podle vynálezu může dále obsahovat 12 až 16 molů hydroxidu sodného,

vztaženo na 1 mol kyseliny pikrové.

228 836

Činidlo podle vynálezu je vhodné připravit odděleně ve formě dvou roztoků. Prvý roztok může s výhodou obsahovat kyselinu pikrovou, měďnatou sůl, vinan sodnodraselný a dibutyl naftalensulfonan sodný, druhý roztok může být tvořen samotným hydroxidem sodným. Rozdělení činidla podle vynálezu na dva roztoky je výhodné ze dvou důvodů. Při kinetickém stanovení kreatininu pomocí automatických analyzátorů se obvykle postupuje tak, že se vzorek smíchá s jedním roztokem činidla a druhý roztok se užívá jako starter kinetické reakce. Oddělení roztoku hydroxidu od roztoku kyseliny pikrové kromě tohoto zvyšuje stabilitu činidla. Pokud se užívá k analýze jediné činidlo, je vhodné je připravit smícháním obou roztoků před vlastní analýsou.

Při analýze sér obsahujících 100 μmol kreatininu/l, ke kterým byl přidáván bilirubin v množství 20 až 200 μmol /l byl s činidlem podle vynálezu vždy nalezen správný obsah kreatininu a vliv přidávaného bilirubinu se neprojevil. Na rozdíl od dosud známých činidel lze s činidlem podle vynálezu stanovit správný obsah kreatininu i u vzorků obsahujících běžné nebo i značně zvýšené množství bilirubinu, což má zásadní vliv na včasné rozpoznání poškození ledvin, umožňuje správné stanovení diagnózy, léčebného postupu a jeho kontrolu.

Příklad

Připraví se roztok obsahující 25,6 g kyseliny pikrové, 32,0 g dibutylnaftalensulfonanu sodného, 2,6 g vinanu sodnodraselného a 0,87 g síranu měďnatého pentahydrátu v 6600 ml vody. Při-

praví se roztok obsahující 66 g hydroxidu sodného ve 2200ml vody.

Před použitím se smíchají 3 objemové díly prvního roztoku s 1 objemovým dílem druhého roztoku.

Příklad 2

Připraví se činidlo obsahující v 1000 ml vodného roztoku 126mmolu kyseliny pikrové, 0,126mmolu dusičnanu měďnatého, 0,126 mmolu vinanu sodnodraselného, 100 mmolu dibutylnaftalensulfonanu sodného a 151 mmolu hydroxidu sodného. Činidlo se užívá přímo.

Příklad 3

Připraví se činidlo obsahující ve 100 ml vodného roztoku 12,6 mmolu kyseliny pikrové, 0,76 mmolu chloridu měďnatého, 2,5 mmolu vinanu sodnodraselného, 8 mmolu dibutylnaftalensulfonanu sodného a 201 mmolu hydroxidu sodného. Činidlo se používá přímo.

Příklad 4

K 0,5 ml vzorku séra nebo moči zředěné předtím vodou v poměru 1 ku 49 se přidá 1,6 ml činidla připraveného podle příkladů 1 až 3 a měří se změna absorbance mezi 30. až 120. s po smíchání vzorku s činidlem při konstatní teplotě v kyvetě 1 cm při vlnové délce 510 nm.

K 0,5 ml vzorku séra nebo zředěné moči se přidají 1,2 ml prvního roztoku podle příkladu 1 a reakce se nastartuje 0,4 ml roztoku hydroxidu sodného. Další postup je stejný jako v předešlém případě.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

228 836

1. Činidlo pro fotometrické kinetické stanovení kreatininu pro potlačení interference bilirubinu, vyznačené tím, že na 1 mol kyseliny pikrové obsahuje 0,01 až 0,06 molů měďnaté soli, s výhodou síranu nebo chloridu měďnatého, 0,01 až 0,2 molů vinanu sodnodraselného a 0,5 až 0,9 molů dibutyl-naftalensulfonanu sodného.
2. Činidlo podle bodu 1, vyznačené tím, že obsahuje 12 až 16 molů hydroxidu sodného, vztaženo na 1 mol kyseliny pikrové.