



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

200 564

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 02 01 79
(21) PV 9-79

(51) Int. Cl.³ G 01 N 31/22

(40) Zveřejněno 31 12 79
(45) Vydáno 30 04 83

(75)

Autor vynálezu SVOBODA VLASTIMIL ing. a SEDLINSKÁ BOŽENA PhMr., BRNO

(54) Diagnostický proužek ke stanovení azokopulovatelných látek v biologických kapalinách

1

Vynález se týká způsobu přípravy stabilních diagnostických proužků pro důkaz a semi-
kvantitativní stanovení azokopulovatelných látek v biologických materiálech.

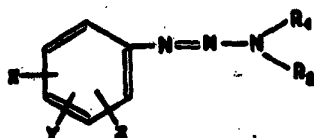
Kvalitativní detekce a kvantitativní stanovení různých součástí moče, krve, mozko-
míšního moku a jiných tělních kapalin se stává v posledních letech jednou z nejdůležitěj-
ších diagnostických metod. V mnoha případech dovoluje určit diagnosu onemocnění dříve, než
se toto projeví klinicky. Obzvláštní význam mají pak stanovení, která lze provést pomocí
takzvaných rychlých testů, jako jsou například diagnostické proužky, neboť tyto testy je
možné použít i mimo dosah speciálně vybavené laboratoře, například v ordinaci praktického
lékaře, u lůžka pacienta a podobně.

Mezi diagnosticky velmi významná vyšetření patří mimo jiné i důkaz a kvantitativní
stanovení látek, poskytujících s diazoniovými solemi výrazně zbarvené sloučeniny. Typic-
kými představiteli takovýchto azokopulovatelných látek v biologických materiálech, ze-
jména moči, jsou dvě hlavní žlučová barviva, bilirubin a urobilinogen. Jejich důkaz
a kvantitativní stanovení například v moči, dovoluje nejen podpořit diagnosu různých
krevních, jaterních nebo žlučkových onemocnění, ale často umožňuje jako jediná metoda
rozpoznat tato onemocnění dříve, než dojde k jejich klinické manifestaci.

Pro citlivý, specifický důkaz a stanovení bilirubinu v biologických materiálech je
používána takzvaná Van den Berghova azokopulační reakce, založená na vzniku barevné azo-

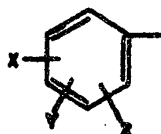
eloučeniny azobilirubinu, která se vytvoří z bilirubinu působením vhodné diazoniové soli. Při metodách spektrofotometrických se pro tuto reakci nejčastěji používá diazotovaná kyselina sulfanilová, u tabletových testů pak například p-nitrobenzendiazonium-p-toluensulfonát (viz patent DE 1 102 444); v diagnostických proužcích jsou pak užívány diazoniové soli, odvozené od různě substituovaných hlavně halogenovaných anilinů, jako jsou například 2,4-dichloraniliny, 2,5-dichloraniliny nebo 2,6-dichloraniliny (viz například patenty US 1 298 762 a 1 300 311 nebo patenty GB 1 389 386 a 1 389 368). Ke stanovení urobilinogenu je pak užívána analogická azokopulační reakce, avšak s použitím diazoniové soli, substituované na aromatickém jádře elektropositivními radikály, jako jsou například nižší alkylové zbytky, alkoxylové zbytky a podobně (viz patent GB 1 343 247). Indikační zóna těchto proužků obsahujících uvedené diazoniové soli, sestává z nosiče, například filtračního papíru nebo rouna ze syntetických vláken, který byl napojen roztokem vhodné silné kyseliny jako například kyseliny šťavelové, sulfosalicylové, metafosforečné a podobně s roztokem diazoniové soli a vysušen; diazoniová sůl se při tom může použít již jako taková ve stabilizované formě tetrafluoroborátu, p-toluensulfonátu, tetrachlorozinečnanu a podobně (viz patenty GB 1 343 247, 1 389 366 a 1 389 368) nebo se k impregnaci nosiče použije roztok výchozího substituovaného aromatického aminu a dusitanu, takže k vytvoření diazoniové soli dojde teprve v tomto impregnačním roztoku (viz US patenty 1 298 762 a 1 300 311 a GB patenty 1 343 248 a 1 389 368). Čsl. autorské osvědčení č. 164 557 pak popisuje možnost vytvoření této diazoniové soli přímo na nosiči z příslušného triazenu a vhodné kyseliny. Ve všech těchto případech hotové proužky obsahují vedle silné kyseliny, potřebné pro průběh azokopulační reakce, diazoniovou sůl, která je však i ve své stabilizované formě nestálá a rychle se rozkládá, jsou-li proužky vystaveny působení vzdušné vlhkosti nebo světla. Proužky obsahující vysoce reaktivní diazoniové soli, jako jsou například soli odvozené od halogenových aromatických amidů, dávají navzdor reakce i s řadou jiných součástí vyšetřovaného biologického materiálu. Tak například proužky určené ke stanovení bilirubinu v moči se barví v některých močích poměrně intenzivně žlutě až oranžově; při vizuálním hodnocení takto nespecificky zbarvených proužků pak může dojít k tomu, že se slabě růžový až fialový odstín skutečně pozitivní reakce na bilirubin buď nepostihne, neboť je překryt silnějším oranžovým nespecifickým zbarvením, nebo naopak je toto nespecifické zbarvení považováno za skutečně pozitivní reakci.

Nyní však bylo s překvapením zjištěno, že všechny tyto nedostatky lze do značné míry odstranit, použijí-li se k důkazu a stanovení azokopulovatelných látek, zejména bilirubinu a urobilinogenu, v biologických kapalinách diagnostické proužky dle tohoto vynálezu, jejichž indikační zóna, sestávající z nasávkového nosiče, obsahuje kyselé reagující látku, například kyselinu citronovou, šťavelovou, amidosulfonovou, metafosforečnou, kyselý síran draselný nebo arylsulfonovou kyselinu o počtu atomů uhlíku 6 až 12 a s 1 až 3 sulfonovými skupinami nebo jejich směs a triazen obecného vzorce (I).



(I)

v němž substituenty X, Y a Z značí stejné nebo rozdílné atomy nebo skupiny, například vodík, halogen, nitroskupinu, alkylový nebo alkoxylový zbytek s 1 až 3 atomy uhlíku, nebo aralkoxylový zbytek se 7 až 8 atomy uhlíku, skupinu hydroxylovou, nebo aminoskupinu popřípadě dále acetylovanou nebo benzoylovanou, nebo skupiny $-COR$ nebo $-SO_2R$, v nichž R značí hydroxylový zbytek, alkylovou nebo aminoskupinu s 1 až 2 atomy uhlíku a symboly R_1 a R_2 značí nezávisle na sobě vodík, alkylový zbytek, hydroxyalkylový zbytek, karboxyalkylový zbytek nebo sulfoalkylový zbytek s 1 až 4 atomy uhlíku nebo jeden ze symbolů R_1 nebo R_2 představuje aromatický zbytek obecného vzorce (II),



(II).

v němž substituenty X, Y a Z mají shora uvedený význam, přičemž alespoň jeden z nich je karboxylová nebo sulfoskupina. Tyto triazeny mohou být při tom v indikační zóně proužku obsaženy buď volně nebo s výhodou ve formě soli s ionty alkalických kovů nebo alkalických zemín, například s ionty lithia, draslíku, sodíku, vápníku, barya nebo stroncia a podobně.

Podstata vynálezu, ve srovnání se současným stavem techniky, tedy spočívá v tom, že indikační část papírků dle vynálezu, neobsahuje diazoniovou sůl, ale příslušný výše definovaný triazen, ze kterého se azokopulace schopná diazoniová sůl generuje působením přítomné kyselce reagující látky teprve v okamžiku použití papírku, to znamená při namočení do vodné biologické kapaliny. Přitom se podle účelu použití proužku volí s ohledem na substituenty X, Y a Z takový triazen, aby z něho v okamžiku použití vznikla diazoniová sůl, specifická pro danou azokopulovatelnou látku. Tak například proužky pro stanovení bilirubinu obsahující s výhodou ve své indikační zóně triazen, v němž substituenty X, Y a Z tvoří elektronegativní atomy nebo skupiny, například $X = 1-Cl$, $Y = H$ a $Z = 6-Cl$; naopak pro získání proužků specifických pro urobilinogen je výhodné použít takové triazeny, v nichž převažují substituenty elektropositivní, například triazen, v němž $X = Y = H$ a $Z = 4-methoxy$ nebo $4-benzyloxy$ skupina.

Příprava takovýchto papírků se provádí tak, že se vhodný nasákový nosič, naimpregnuje vodným roztokem kyselin nebo jejich směsí a dokonale vysuší v proudu teplého vzduchu. Poté se na nosič nanese roztok triazenu nebo jeho soli v nevodném rozpouštědle a nosič se opět vysuší. Jako nevodná rozpouštědla soužící k přípravě roztoku triazenu nebo jeho soli, se při tom rozumí taková aprotická rozpouštědla, v nichž nedochází k rozkladu triazenu na příslušnou diazoniovou sůl působením H^+ -iontů. Typickými příklady takovýchto rozpouštědel jsou aceton, ethylacetát, benzen, toluen, dimethylsulfoxid, dimethylformamid a jiné. Z hlediska rozpustnosti triazenů v těchto rozpouštědlech je obecně vhodnější použít směs dvou nebo více různých rozpouštědel, jako například směs dimethylsulfoxidu a acetonu nebo ethylacetátu, nebo toluenu. Takto naimpregnovaný nosič se poté rozřeší na malé čtyřúhelníky o rozměrech například 6×6 mm, které se připojí na jeden konec úzkého proužku folie z plastické hmoty, například způsobem popsaným v patentu DE 2 118 455 nebo patentu GB 1 073 596. Jako nasákový nosič je možné ve smyslu tohoto vynálezu použít jakoukoliv vhod-

nou a pro tento účel používanou látku, jako je filtrační papír, rouno ze syntetických vláken, nebo konečně i tenký film porézního syntetického polymeru nebo polykondensátu. Dále je výhodné, i když ne bezpodmínečně nutné, aby indikační zóna proužků podle tohoto vynálezu obsahovala ještě také některé pomocné látky, například stabilizátory, aktivátory azokopulační reakce, takzvané zahušřovadla a podobně. Jako stabilizátory, jejichž úkolem je stabilisovat diazoniovou sůl, vzniklou po namočení proužku do vyšetřované kapaliny tak dlouho, než zreaguje s azokopulovatelnou součástí této kapaliny se ve smyslu tohoto vynálezu rozumí známé a pro tento účel užívané sloučeniny, například kyseliny tetrafluoroborité nebo její soli nebo kyseliny arylsulfonové, například kyseliny p-toluensulfonové, kyselina 2,5-dimethylbenzensulfonová, kyseliny 1,5-naftalendisulfonové a 2,7-naftalendisulfonové, kyseliny naftalentrisulfonové a podobně. S výhodou lze některé z těchto stabilizátorů, například kyselinu p-toluensulfonovou nebo kyseliny 1,5-naftalendisulfonovou nebo 2,7-naftalendisulfonovou, použít i jako látky, které současně vedle svého stabilizačního účinku vytvářejí na nosiči dostatečně nízké pH, potřebné v okamžiku použití pro přeměnu triazenu na diazoniovou sůl a pro průběh azokopulační reakce.

Jako aktivátory azokopulační reakce lze s výhodou použít například estery kyseliny fosforečné, popsané blíže v již citovaných patentech GB 1 389 366 a 1 389 388, nebo i vhodná smáčedla, zejména anionaktivního typu, která obecně zvyšují rychlost proniknutí vyšetřované kapaliny do indikační zóny proužků a tím urychlují průběh přeměny triazenu na diazoniovou sůl a její reakci s azokopulovatelnou složkou vyšetřované kapaliny, navíc použitím esterů kyseliny fosforečné nebo anionaktivních smáčedel, například laurylsulfátu, dodecylbenzensulfonátu nebo dialkylesterů kyseliny sulfojantarové, se zvýší i intenzita vzniklého zabarvení proužků při pozitivní reakci, čímž se docílí zvýšení citlivosti proužků vůči azokopulovatelné složce vyšetřované biologické kapaliny.

Vedle těchto látek může indikační zóna proužků dle tohoto vynálezu obsahovat s výhodou i některá tak zvaná zahušřovadla, což jsou filmotvorné polymerní látky přírodního nebo syntetického původu, jako například škrob, želatina, polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidon a podobně. Jejich úkolem v indikační zóně proužků je zabránit ve fázi přípravy proužků a jejich skladování před použitím bezprostřednímu styku triazenu s kyselinami a tak zamezit předčasné přeměně triazenu na příslušnou diazoniovou sůl. Vedle této hlavní funkce však přináší jejich použití v indikační zóně proužků i výhodu jakési "egalizace", to je zvýšení rovnoměrnosti vybarvení celé indikační plošky proužku při pozitivní reakci s azokopulovatelnou látkou. Tyto pomocné látky mohou být na nosič nanášeny v kterékoliv z obou výše uvedených impregnací, to je buď spolu s roztokem kyselé reagující látky, nebo jako součást roztoku triazenu v nevodném rozpouštědle. Někdy je dokonce výhodné nanést například zahušřovadlo ve formě samostatné třetí impregnace po nanesení kyselé reagující látky při impregnaci roztokem triazenu, čímž se docílí ve fázi výroby papírků ještě dokonalejšího oddělení triazenu od kyseliny a tím potlačení jakékoliv možnosti přeměny triazenu na diazoniovou sůl dříve, než se proužek namočí do vyšetřované vodné kapaliny. Proti dosud známým diagnostickým proužkům, které obsahují ve své indikační zóně diazoniovou sůl, mají proužky dle tohoto vynálezu výhodu nejen ve větší stabilitě, neboť jak je obec-

ně známo, jsou triazeny - na rozdíl od diazoniových solí - látky dokonale stálé i za dosti nepříznivých podmínek, například působení světla, zvýšení teploty i vzdušné vlhkosti. Navíc proužky, jejichž indikační zóna obsahuje místo diazoniové soli shora definovaný triazen, dávají v biologických kapalinách například moči, podstatně slabší tak zvané nespecifické reakce; v důsledku tohoto není reakce proužků dle předloženého vynálezu nepříznivě ovlivňována vznikem nespecifického, rušivého žlutého až oranžového zabarvení.

P ř í k l a d 1

Filtrační papír o plošné hmotnosti 180 g/m^2 byl postupně naimpregnován následujícími roztoky tak, že po každé impregnaci byl dokonale vysušen v proudu vzduchu o teplotě okolo 60°C .

Impregnační roztok I:

1,0 g kyselina metafosforečná
0,19 g citronová kyselina
0,19 g šťavelová kyselina
0,33 g dvojsodná sůl naftalendisulfonové kyseliny
0,1 ml 25%ního vodného roztoku sodné soli sek-heptadecylsulfátu
0,18 g tetrafluoroboritan sodný
ad 10 ml destilovaná voda.

Impregnační roztok II:

0,05 g 3-methyl-3-sulfoethyl-1-(2,6-dichlorfenyl) triazen
2,0 ml dimethylsulfoxid
15 ml toluen.

Po namočení do moče obsahující alespoň 0,1 mg bilirubinu ve 100 ml se tento papír barví během 10 až 20 s růžově až temně karmínově, přičemž intenzita tohoto zabarvení je přímo úměrná koncentraci bilirubinu. Po namočení do moče neobsahující bilirubin však papír zůstane smetanově bílý a toto zbarvení se nezmění po dobu nejméně 5 minut.

P ř í k l a d 2

Papírky se připravují stejným způsobem, však s použitím těchto impregnačních roztoků:

Impregnační roztok I:

1,0 g metafosforečná kyselina
0,4 g hydrogensíran draselný
0,1 ml 25%ního vodného roztoku sodné soli sek-heptadecylsulfátu
ad 10 ml H_2O dest.

Impregnační roztok II:

0,05 g 3-methyl-3-karboxymethyl-1-(2,4-dichlorfenyl) triazen
2,0 ml dimethylsulfoxid
5,0 ml aceton

10,0 ml octan ethylnatý

Vlastnosti těchto papírků jsou prakticky stejné, jako papírků připravených dle předchozího příkladu, zbarvení při pozitivní reakci je však fialové a v močích bez bilirubinu se barví po cca 5 min. světle žlutě. Obdobné papírky připravené s 2,4-dichlorfonyldiazonium-tetrafluoroborátem, se za stejných podmínek barví v močích bez bilirubinu intenzivně oranžově.

P ř í k l a d 3

Papírky připraveny s použitím následujících impregnačních roztoků:

Impregnační roztok I:

- 1,0 g metafosforečná kyselina
- 0,2 g amidosulfonová kyselina
- 0,4 g citronová kyselina
- 0,7 ml 25%ního vodného roztoku sodné soli sek-heptadecylsulfátu
- ad 10 ml H₂O dest.

Impregnační roztok II:

- 0,05 g 3-(2-karboxy-5-sulfofenyl)-1-(2,5-dichlorfenyl)-triazen draselná sůl
- 2,0 ml dimethylsulfoxid
- 5,0 ml octan ethylnatý
- 10,0 ml benzen

Takto připravené papírky dávají s bilirubinem fialově červené zbarvení a v močích bez bilirubinu se barví jen světle žlutavě. Obdobné papírky, jejichž indikační zóna obsahuje příslušnou diazoniovou sůl se v močích bez bilirubinu barví téměř okamžitě sytě žlutě.

P ř í k l a d 4

Papírky připraveny s použitím těchto impregnačních roztoků:

Impregnační roztok I:

- 1,0 g metafosforečná kyselina
- 0,4 g citronová kyselina
- 0,18 g šťavelová kyselina
- 0,06 ml 25%ního vodného roztoku sodné soli sek-heptadecylsulfátu
- ad 10,0 ml H₂O dest.

Impregnační roztok II:

- 0,05 g sodné soli 3-methyl-3-sulfoethyl-1-(4-benzyloxyfenyl)-triazenu
- 2,0 ml dimethylsulfoxid
- 15,0 ml toluen.

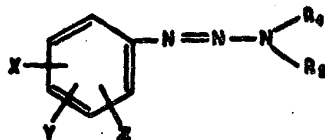
Po namočení do moče, obsahující urobilinogen se proužky barví karminově červeně, přičemž intenzita tohoto zbarvení je přímo úměrná koncentraci urobilinogenu a může být semikvantitativně vyhodnocena. Ve srovnání s obdobnými proužky obsahujícími příslušnou diazoniovou sůl, jsou proužky dle vynálezu dokonale stálé za normálních podmínek a nemění své vlast-

nosti ani po delší expozici na světlo.

Obdobné proužky, v nichž byla sodná sůl 3-methyl-3-sulfoethyl-1-(4-benzyloxyfenyl) triazen nahrazena stejným hmotovým množstvím vápenaté soli 3-methyl-3-karboxymethyl-1-(4-methoxy-fenyl)-triazenu vykazovaly naprosto stejné funkční vlastnosti.

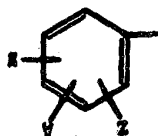
PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Diagnostický proužek ke stanovení azokopulovatelných látek v biologických kapalinách, zejména v moči, vyznačený tím, že jeho indikační zóna sestávající z nasákového nosiče, obsahuje kyselé reagující látku, například kyselinu citronovou, šťavelovou, amidosulfonovou, metafosforečnou, hydrogensíran draselný nebo arylsulfonovou kyselinu o počtu uhlíků 6 až 12 a s 1 až 3 sulfonovými skupinami nebo jejich směs a triazen obecného vzorce I



(I).

v němž substituenty X, Y a Z značí stejné nebo rozdílné atomy nebo skupiny, například vodík, halogen, nitroskupina, alkylový zbytek nebo alkoxylový zbytek s 1 až 3 atomy uhlíku, nebo aralkoxylový zbytek se 7 až 8 atomy uhlíku, hydroxylovou skupinu, nebo aminoskupinu popřípadě dále acetylovanou nebo benzoylovanou nebo skupiny $-COR$ nebo SO_2R , v nichž R značí hydroxylovou skupinu, alkylovou skupinu s jedním až dvěma atomy uhlíku nebo aminoskupinu a symboly R_1 a R_2 značí nezávisle na sobě vodík, alkylový zbytek o počtu atomů uhlíku 1 až 4, hydroxyalkylový zbytek o počtu atomů uhlíku 1 až 4, karboxyalkylový zbytek o počtu atomů uhlíku 1 až 4 nebo sulfoalkylový zbytek s 1 až 4 atomy uhlíku nebo jeden ze symbolů R_1 nebo R_2 představuje aromatický zbytek obecného vzorce II



(II).

v němž substituenty X, Y a Z mají shora uvedený význam, přičemž alespoň jeden z nich je karboxylová skupina nebo sulfoskupina.

2. Diagnostický proužek podle bodu 1, vyznačený tím, že obsahuje triazen ve formě soli s ionty alkalických kovů nebo alkalických zemin, například s ionty lithia, draslíku, sodíku, vápníku, barya nebo stroncia.
3. Diagnostický proužek podle bodu 1 a 2, vyznačený tím, že jeho indikační zóna obsahuje stabilizátor, například kyselinu tetrafluoroboritou nebo její alkalická sůl, například tetrafluoroboritan sodný nebo draselný nebo kyseliny arylsulfonové, například kyselinu

p-toluensulfonovou nebo kyselinu 1,5-naftalendisulfonovou nebo 2,7-naftalendisulfonovou.

4. Diagnostický proužek podle bodu 1 nebo 2 nebo 3 vyznačený tím, že jeho indikační zóna obsahuje aktivátory azokopulační reakce, například estery kyseliny fosforečné, například dioktylfosfát nebo difenylfosfát nebo anionaktivní smáčedla, například laurylsulfát, dodecylbenzensulfát nebo dioktylester kyseliny sulfojantarové.
5. Diagnostický proužek podle bodu 1 nebo 2 nebo 3 nebo 4 vyznačený tím, že jeho indikační zóna obsahuje organické polymerní filmotvorné látky, například škrob, želatinu, karboxymethylcelulosu, polyvinylalkohol nebo polyvinylpyrrolidon.