



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

260408
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
G 01 N 33/49

(22) Přihlášeno 18 03 85
(21) (PV 1852-85)

(40) Zveřejněno 16 05 88

(45) Vydáno 15 04 89

(75)

Autor vynálezu

SVOBODA VLASTIMIL ing., HRBOTICKÁ EVA RNDr.,
SEDLINSKÁ BOŽENA RNDr., BRNO

(54) Diagnostické proužky ke stanovení peroxidu vodíku

1

2

Předmětem řešení jsou diagnostické proužky ke stanovení peroxidu vodíku nebo látek, které peroxid vodíku v průběhu vhodné pomocné reakce generují, obsahující chromogenní systém sestávající z aktivní kopulační komponenty 4-aminoantipyridinu a/nebo 3-methyl-2-benzthiazolinonhydrazonu a pasivní komponenty, vyznačené tím, že jako pasivní komponentu obsahují substituovaný pyrazolon. Barevné vlastnosti tohoto nového chromogenního systému lze v poměrně širokém rozmezí modifikovat.

Předmětem vynálezu je složení chromogenního systému diagnostických proužků pro stanovení součástí biologických kapalin, které v průběhu vhodných pomocných reakcí generují peroxid vodíku.

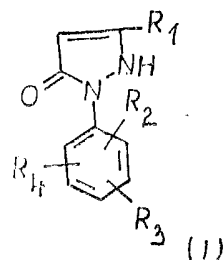
Při vyšetřování tělních kapalin jako séra, moče nebo likvoru se některé stanovované součásti převádějí pomocnými reakcemi na oxidační produkty za současného vzniku peroxidu vodíku. Typickým příkladem je stanovení glukózy, která se za přítomnosti enzymu glukosooxidázy oxiduje vzdušným kyslíkem na kyselinu glukonovou za současného vzniku ekvivalentního množství peroxidu vodíku. Podobným způsobem je možné stanovit pomocí specifických enzymů i další součásti například séra, jako jsou například kyselina močová, cholesterol nebo triglyceridy.

Ke stanovení tohoto peroxidu vodíku byla v minulosti navržena celá řada speciálních chromogenů nebo chromogenních systémů. Druh a vlastnosti tohoto chromogenu nebo chromogenního systému je zvláště důležitý u tzv. diagnostických proužků, v nichž všechna činidla, potřebná pro průběh pomocných reakcí i koncové barevné reakce chromogenu se vzniklým peroxidem vodíku, jsou obsažena na vhodném nosiči v pevné bázi. U těchto proužků se v poslední době užívá ponejvíce chromogenních systémů založených na tzv. Trinderově reakci, spočívající v oxidační kopulaci vhodné nukleofilní organické sloučeniny jako aktivní kopulační komponenty s vhodnou pasivní komponentou. Jako aktivní komponenty jsou používány převážně 4-aminoantipyrin nebo heterocyklické hydrazony. Jako pasivní kopulační složky byly použity různé aromatické aminy, nebo fenoly popřípadě naftoly nebo substituovaný 8-hydroxychinolin, obecně známý pod názvem primachin — difosfát.

Všechny tyto známé systémy však mají společný nedostatek v tom, že vlastnosti chinonimiových, případně diazamerocyaninových barviv, vzniklých z těchto komponent, nedovolují stanovení peroxidu vodíku, a tím látek, které tento peroxid v průběhu pomocných reakcí generují, v dostatečně širokém koncentračním rozmezí, tak jak je při vyšetření některých tělních kapalin potřebné. V důsledku toho nelze tyto známé systémy použít například pro vyšetření moče na obsah glukózy, která se v této tělní kapalině může pohybovat v extrémně širokém koncentračním rozmezí od mírně zvýšených hodnot 0,35–0,50 g/l po neobyčejně vysoké patologické hodnoty dosahující až 150 g/l.

Tyto nedostatky odstraňuje předložený vynález, jehož předmětem jsou diagnostické proužky ke stanovení peroxidu vodíku nebo látek, které peroxid vodíku v průběhu pomocné reakce generují, obsahující chromogenní systém sestávající z aktivní kopulační komponenty 4-aminoantipyrinu a/nebo 3-methyl-2-benzthiazolinon-hydrazon a pasiv-

ní komponenty, vyznačené tím, že jako pasivní komponentu obsahují substituovaný pyrazolon obecného vzorce I



v němž R_1 je vodík nebo karboxyl nebo alkyl o počtu uhlíků 1 až 16 nebo alkoxy o počtu uhlíků 1 až 4 nebo acylovaná aminoskupina $-\text{NHCOX}$, kde X je alkyl o počtu uhlíků 1 až 4 nebo fenyl, a R_2 až R_3 jsou stejné nebo různé substituenty jako vodík, halogen, nitroskupina, sulfoskupina nebo fenoxyskupina. Tyto proužky mohou s výhodou obsahovat ještě další chromogen benzidínového typu jako například o-tolidin, o-dianisidin, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidín nebo 2,7-diaminofluoren.

Tento nový chromogenní systém vyniká proti dříve známým systémům zejména tím, že podle druhu prováděného vyšetření lze jeho barevné vlastnosti v poměrně širokém rozmezí modifikovat. Tak například na proužcích pro vyšetřování moče na glykosurii lze kombinací 4-aminoantipyrinu a 3-methyl-2-benztriazolon-hydrazonu jako dvou aktivních komponent a 1-fenyl-3-methyl-5-pyrazolonu jako komponenty pasivní dosáhnout široké barevné škály od čistě žluté pro normální koncentraci glukózy v moči do 0,20 g/l přes žlutooranžovou až oranžovou při mírně zvýšeném vylučování glukózy v rozmezí 0,5 až 1,0 g/l, oranžově červenou do temně červené při poměrně silných glykosuriích nad 3,0 g/l glukózy. Tuto barevnou škálu uvedeného chromogenního systému lze pak ještě dále rozšířit přidáním vhodného množství o-dianisidinu do červenohněda, hněda nebo zcela černa pro extrémní koncentrace glukózy nad 10 až 30 gramů na litr, jak se vyskytují při těžkém, nekompensovaném diabetu. Pro stanovení glukózy v krvi lze pak použitím pouze 4-aminoantipyrinu a vhodně substituovaného pyrazolonu naopak barevný rozsah chromogenního systému zúžit tak, že až do koncentrace glukózy okolo 1 g/l zůstane proužek světle žlutý a poskytne pak zřetelně odstupňovanou škálu barevných odstínů z růžové do tmavě červené v rozmezí koncentrace glukózy 1 až 8 g/l.

Je samozřejmé, že vedle uvedeného chromogenního systému obsahují proužky podle vynálezu řadu dalších činidel a látek, potřebných pro žádoucí průběh celé indikační reakce. U proužků pro stanovení glu-

kózy, kyseliny močové, cholesterolu nebo triglyceridů jsou to v první řadě specifické enzymy, při nichž je stanovovaná složka — analyt oxidována kyslíkem za současného vzniku peroxidu vodíku. Při stanovení glukózy a kyseliny močové jsou to pouze příslušné oxidázy — glukosooxidáza nebo urikasa. Pro stanovení cholesterolu nebo triglyceridů však proužky obsahují ještě další enzymy, potřebné pro transformaci analytu na produkt přístupný konečné enzymové oxidázové reakci. Tyto enzymové systémy jsou obecně známé a již poměrně dlouhou dobu používané v oboru klinické biochemie.

Vlastní oxidační kopulace obou komponent samotným peroxidem vodíku za vzniku příslušného chinoniminového nebo diazamerocyaninového barviva probíhá značně pomalu. Urychlení této reakce je možné obecně dosáhnout celou řadou vhodných katalyzátorů. V praxi se však nejlépe osvědčil enzym peroxidáza, který také tvoří nezbytnou součást proužků podle vynálezu.

Vedle těchto hlavních složek mohou proužky podle vynálezu s výhodou obsahovat řadu dalších pomocných látek vytvářejících vhodné podmínky pro optimální průběh všech reakcí, které v průběhu stanovení analytu na proužky probíhají.

V první řadě je to tlumič, jehož úkolem je nejen vytvářet optimální pH pro všechny výše popsané enzymové reakce, ale i pro vlastní koncovou barevnou reakci, tj. oxidační kopulaci 4-aminoantipyrinu a/nebo 3-methyl-2-benzthiazolon-hydrazonu s výše definovaným pyrazolonem I. Pro tento účel je možné použít jakýkoliv z obecně známých a běžně užívaných tlumičů o pH 4,0 až 9,0, jako jsou například tlumiče citrátové, fosfátové, tlumiče na bázi tris-(hydroxymethyl)-aminomethanu apod.

Další účinnou složkou proužků podle vynálezu mohou být s výhodou tzv. „zahušťovadla“, což jsou přirozené nebo syntetické polymerní látky, jako například želatina, karagenan, alginát, polyvinylpyrrolidon, polyvinylalkohol a podobně. Tato zahušťovadla celý indikační systém proužků mírně stabilizují a vedle toho mají pozitivní vliv na egalizaci a zvýraznění vybarvení proužků při pozitivní reakci.

Vedle toho je výhodné, jestliže proužky obsahují i vhodná smáčedla, jako například polyethylenglykol, které zvyšují smáčivost proužků a usnadňují tak proniknutí vyšetřované kapaliny k činidlům a tím urychlují průběh celé reakce. Navíc však přispívají i ke zvýšení čistoty a bilance zabarvení, vzniklého při pozitivní reakci proužků.

V některých případech je i výhodné, jestliže proužky obsahují ještě také vhodné indiferentní barvivo, které koriguje barevný odstín proužků při pozitivní reakci a zvýrazňuje rozdíly v intenzitě zbarvení proužků při reakci a zvýrazňuje rozdíly v intenzitě zbarvení proužků při reakci s rozdílnými koncentracemi analytu. I když principi-

álně lze pro tento účel použít nejrůznější barviva, ve většině případů se nejlépe osvědčují žlutá barviva jako například tartrazin, fluorescein nebo kyselina pikrová.

Diagnostické proužky podle tohoto vynálezu se připravují o sobě známým a pro přípravu diagnostických proužků obecně používaným způsobem, spočívajícím v tom, že všechny výše uvedené složky se rozpustí ve vhodných rozpouštědlech, jako například ve vodě, alkoholu, acetonu, a tento tzv. impregnační roztok se nanese na vhodnou nasákovou podložku, jako je například filtrační papír nebo rouno ze syntetických vláken, a vysuší. V některých případech je pak výhodné část uvedených součástí rozpustit v jednom roztoku a část pak odděleně ve druhém impregnačním roztoku a tyto roztoky nanést na nasákový nosič postupně, přičemž po každé této impregnaci se nosič důkladně vysuší například proudem teplého vzduchu. Popis takovéto přípravy diagnostických proužků vysvětluje z níže uvedených příkladů. Je možné však také všechny výše uvedené složky inkorporovat do vhodné polymerní vrstvy, která se pak formou tenkého filmu nanese na podložku z plastické hmoty. Tuto polymerní vrstvu s chromogenním systémem lze vedle toho použít i jako reakční vrstvu v tzv. integrálním analytickém elementu.

Proti dříve známým řešením proužky podle tohoto vynálezu se vyznačují nejen vysokou citlivostí vůči obsahu analytu ve vyšetřovaných biologických kapalinách a možností použití pro poměrně široké rozsahy koncentrace tohoto analytu, ale poskytují při pozitivních reakcích i výrazné a jasné zabarvení od oranžové přes různé odstíny červené případně až do temně hnědé, což umožňuje velmi přesné semikvantitativní vizuální i fotometrické vyhodnocení výsledků testů.

Příklady provedení

Příklad 1

Impregnační roztok A:

Citrátový tlumič, pH = 5,3	94,0 ml
Želatina, 1 %-ní vodný roztok	50,0 ml
Glukosooxidáza	2,5 g
Peroxidáza, 1 %-ní vodný roztok	14,0 ml

Impregnační roztok B:

Methylalkohol	53,0 ml
1-fenyl-3-methyl-5-pyrazolon	2,15 g
4-aminoantipyrin	0,95 g
o-dianisidin . 2 HCl, 2,5 %-ní vodný roztok	47,0 ml
Polyvinylpyrrolidon, 5 %-ní vodný roztok	30,0 ml
Laurylsulfát sodný	0,6 g
Tartrazin, 1 %-ní vodný roztok	3,6 ml

Oba impregnační roztoky se připraví odděleně smícháním, popřípadě rozpuštěním všech složek ve výše uvedeném pořadí. Na filtrační papír o plošné hmotnosti 180 g/m² se nanese impregnační roztok A a papír se dokonale vysuší proudem teplého vzduchu. Na tento papír se pak nanese impregnační roztok B a vysuší se stejným způsobem. Vysušený papír se rozřeže na čtverečky 6 × 6 milimetrů a nalepí — například pomocí oboustranné samolepící pásky — na podložku z bílé plastické hmoty.

V močích, obsahujících různá množství glukózy tyto proužky nabývají po 1 až 2 minutách po namočení zbarvení uvedená v následující tabulce:

koncentrace glukózy (g/l)	zbarvení proužků
0,00— 0,2	žluté
0,35— 1,0	oranžově červené
1,0 — 2,5	červené
2,5 — 5,0	sytě červené
10,0 —20,0	temně červené
—30,0	tmavě červené

Příklad 2

Připraví se proužky přesně podle příkladu 1, avšak 1-fenyl-3-methyl-5-pyrazolon se nahradí 2,82 g 1-(4-sulfofenyl)-3-hexadecyl-5-pyrazolonem. Tyto proužky reagují na přítomnost peroxidu vodíku popřípadě glukózy obdobnou barevnou změnou, avšak vznik zabarvení je pomalejší a jeho intenzita podstatně nižší. Tyto proužky lze s výhodou použít pro stanovení extrémně vysokých koncentrací glukózy v rozmezí 30 až 150 g na litr.

Příklad 3

Impregnační roztok A:

Voda destilovaná	57,0 ml
kyselina citrónová	0,96 g
Dihydrogencitrán sodný	4,41 g
Kyselina ethylendiamin- -tetraoctová	3,95 g
Čtyřsodná sůl	
Glukosooxidáza	1,2 g
Peroxidáza 0,5 %-ní vodný roztok	26,4 ml
Polyvinylpyrrolidon 10 %-ní vodný roztok	3,5 ml

Impregnační roztok B:

1-sulfofenyl-3-methyl-5-pyrazolon	1,48 g
4-aminoantipyrin	0,56 g
Metanol	40,0 ml
o-dianisidin . 2 HCl	1,40 g
voda destilovaná	50,0 ml
Polyvinylpyrrolidon 10 %-ní vodný roztok	10,0 ml
Laurylsulfát	0,4 g

3-methyl-2-benzthiazolon-hydrazon .

. 2 HCl 0,1 g

Oba impregnační roztoky se připraví odděleně postupným rozpuštěním, příp. smícháním jednotlivých složek v uvedeném pořadí. Tyto impregnační roztoky se nanesou postupně na papír o plošné hmotnosti 180 gramů na m², který se dále zpracuje na hotové proužky způsobem popsáným v příkladě 1.

Tyto proužky, určené k semikvantitativnímu stanovení glukózy v moči, indikují nižší nadfyziologické koncentrace glukózy, tj. 0,4 až 2,5 g/l, jasně oranžovým zbarvením, které při stoupajících koncentracích glukózy v rozmezí 3 až 30 g/l přechází přes zářivě červenou a temně vínově červenou do čistě hnědé až černé.

Příklad 4

Proužky pro stanovení glukózy v séru

Impregnační roztok I:

Želatina 1,5 %-ní vodný roztok	38 ml
Glukosooxidáza	1,7 g
Peroxidáza	90 mg
Citrátový tlumič, pH 5,3	60 ml

Impregnační roztok II:

Metanol	32,5 ml
1-(2-chlor-4-sulfofenyl)- -3-karboxy-5-pyrazolon	1,95 g
4-aminoantipyrin	0,8 g
Methylhydroxypropylcelulóza 4 %-ní roztok ve směsi metanol—voda 1 : 1	47,0 ml
Dioktysulfojantaran sodný 3 %-ní roztok v etanolu	8,0 ml
Tartrazin 1 %-ní vodný roztok	2,4 ml
Karaginan 0,5 %-ní vodný roztok	10,0 ml

Oba roztoky byly nanесeny na papír o plošné hmotnosti 120 g/m², který byl dále zpracován na hotové proužky způsobem uvedeným v příkladě 1.

Po nanесení 30 μl séra se stoupajícím obsahem glukózy se proužky zbarvily světle až tmavě červeně. Pomocí reflexního densitometru byly s použitím červeného filtru naměřeny pro jednotlivé koncentrace glukózy hodnoty reflexní density D uvedené v následující tabulce

koncentrace glukózy (mmol/l)	D
4,0	0,21
8,0	0,37
10,0	0,43
14,0	0,50
22,0	0,60
44,0	0,76

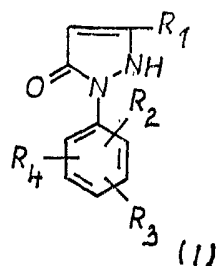
Vizuálně bylo možné vzniklá zbarvení velmi přesně přiřadit k jednotlivým barevným polím zkusmo zhotovené barevné srovnávací stupnice.

Prakticky stejné vlastnosti mají i proužky

ky, u nichž se v impregnačním roztoku II nahradí 1-(2-chlor-4-sulfofenyl)-3-karboxy-5-pyrazolon stejným hmotovým množstvím 1-(2,5-dichlor-4-sulfofenyl)-3-acetamino-5-pyrazolonem.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Diagnostické proužky ke stanovení peroxidu vodíku popřípadě látek, které tento peroxid vodíku generují, obsahující chromogenní systém sestávající z aktivní kopulační komponenty 4-aminoantipyrinu a/nebo 3-methyl-2-benzothiazolinon-hydrazonu a pasivní kopulační komponenty, vyznačující se tím, že jako pasivní kopulační komponentu obsahují substituovaný pyrazolon obecného vzorce I



kde R₁ je vodík nebo karboxylová skupina nebo alkyl o počtu uhlíků 1 až 16 nebo alkoxyl o počtu uhlíků 1 až 4 nebo acylovaná aminoskupina —NHCOX, v níž X je alkyl o počtu uhlíků 1 až 4 nebo fenyl, a R₂ až R₄ jsou stejné nebo rozdílné substituenty jako vodík nebo halogen nebo nitroskupina nebo sulfoskupina nebo fenoxykupina, popřípadě obsahují další chromogen benzidinového typu, jako například o-tolidin, o-dianisidin, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin nebo 2,7-diaminofluoren.