

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 771547 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 771547

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07D

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 16.05.1977

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 16.05.1977

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 27.11.1977

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

26.05.1976 US 690123

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • F. Hoffmann-La Roche, Grenzachersstrasse 124-184, 4002 Basel, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Focella, Antonio, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Haveran, John Edward, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 • Teitel, Sidney, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

4 • Weigele, Mandred, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Barbituraattien määrittäminen

Bestämning av barbiturat

Barbituraattien määrittäminen - Bestämning av barbiturat

Keksinnön kohteena on reagensseja, jotka ovat käyttökelpoisia herkässä, diagnostisessa testissä barbituraattien läsnäolon toteamiseksi kehon nesteissä.

Terapeuttisten aineiden, erityisesti barbituraattien, syönnin voimakas lisääntyminen tavallisen kansan ja armeijan piirissä on tuonut mukanaan käytännön välttämättömyyden analyttisten työtapojen parantamiseksi tällaisten aineiden määrittämiseksi biologisissa nesteissä. Lukuisissa tapauksissa on lääkehoitoa varten välttämätöntä heti määrittää barbituraatinlaji, jota potilas on nauttinut, kun potilas ei ole halukas tai ei koomatilan takia kykene antamaan hoitavalle lääkärille tietoja. Aikaisemmat työtavat käsittivät barbituraattien tunnistamisen uuttamalla ja ohutlevykromatografisilla, kaasukromatografisilla ja spektrofotometrisillä menetelmillä. Näillä työtavoilla on kuitenkin se haitta, että ne ovat suhteellisen aikaa-vieviä, työläitä ja vähemmän herkkiä. Sittemmin selostettiin nopea ja herkkä immunologinen tutkimismenetelmä, joka käsittää vasta-aineiden ja barbituraattiantigeenien välillä, ks. US-patentti 3 766 162

ja S.Spector'in ja E.J.Flynn'in kirjoitus julkaisussa Science, 174, 1037 (1971). Tämä työtapaa vaatii kuitenkin monimutkaisen ja kalliin laitteiston, kuten tuikelaskimia. Senthden olisi edullista, että olisi käytettävissä nopea ja erittäin herkkä tutkimusmenetelmä barbituraattien läsnäolon toteamiseksi biologisissa nesteissä, niin että menetelmä ei vaadi monimutkaista laitteistoa ja että vähimmäiskoulutuksen saanut laboratorionhenkilökunta voi sen yksinkertaisesti suorittaa.

Tämän keksinnön kohteena on uusi barbituraatti-johdannaisten luokka, nimittäinkarboksyyliryhmällä substituoitujen barbituraattien aminoaryyliesterit ja amino-alempi-alkyylamidit. Nämä esterit ja amidit voidaan kovalenttisesti amidi-sidoksen kautta liittää karboksyloituun lateksipolymeeriin. Tällä tavalla lateksipolymeeriin tämän siltaryhmän avulla sidottua barbituraattia voidaan sitten käyttää reagenssina herkässä, diagnostisessa testissä barbituraattien läsnäolon toteamiseksi biologisissa nesteissä. Tämä määritysmenetelmä on riippuvainen antigeenien sinänsä tunnetusta sitoutumisesta tätä varten spesifisiin vasta-aineisiin, jolloin tämä tehdään näkyväksi liukenemattomaksi tekemällä tai agglutinoimalla, mitä seuraa höytä-lesaostus. Kun joko antigeeni tai vasta-aine on sitoutunut sopivaan polymeeriin, kuten lateksipolymeeriin, jollaista seuraavassa kuvataan, paranee antigeeni-vasta-ainesitoutumisen osoittaminen agglutinoimalla lateksipolymeerin avulla merkittävästi, niin että tällainen agglutinoimisreaktio helposti voidaan paljaalla silmällä havaita. Yleinen työskentelytapaa lateksiosasia kantimena käyttäen antigeeneja tai vasta-aineita varten antigeeni-vasta-ainereaktion helposti näkyväksi tekemiseksi on jo kuvattu kirjallisuudessa, esim. US-patentissa n:o 3 857 931.

Lähtöaineet, joita käytetään keksinnön mukaisten lateksireagenssien valmistukseen, ovat karboksyyliryhmällä substituoitujen barbituraattien aminoaryyliesterit ja amino-alempi-alkyylamidit. Selityksessä käytetty ilmaus "alempi alkyyl" käsittää suoraketjuisia ja haaraketjuisia, tyydytettyjä hiilivetytähhteitä, joissa on 2-8 hiiliatomia, kuten esim. etyylin, propyylin, n-butyylin, i-butyylin janiiden kaltaisia. Käsite "aryyli" käsittää aromaattisen tähhteen, joka on peräisin substituomattomasta tai substituoidusta areenista, kuten esim. fenyylin, naftyylin, halo-fenyylin, tolyylin, anisyylin, nitrofenyylin, hydrofenyylin ja niiden kaltaisia. Käsite "halogenidi" käsittää jodidin, bromidin ja kloridin.

Lateksipolymeereihin sidottavat käyttökelpoiset barbituraatit ovat sellaisia, joissa on vapaita karboksyyli-ryhmiä. Erityisen edullinen barbituraatti keksintöä toteutettaessa on 5-allyyli-5-(1-karboksi-isopropyyli)-barbituurihappi (allonaali-karboksyylihappo), koska se sisältää karboksyyli-ryhmän sivuketjussa ja on helposti luoksepäästävä. Sehtähden ovat erityisen edullisia reagensseja allonaalikarboksyylihapon karboksyyli-ryhmän aminoaryyliesterit ja amino-alempi-alkyyliamidit. Kuitenkin on keksinnön mukaisessa tutkimuksessa, kuten sitä seuraavassa valaistetaan, barbituraattien osoittaminen mahdollista, jotka sisältävät joko vapaita tai ryhmiä sisältäviä karboksyyli-ryhmiä, kuten barbistaali, fenobarbistaali, amobarbistaali butabarbistaali, pentobarbistaali jne.

Karboksyyli-ryhmällä substituotujen barbituraattien aminoaryyli-estereitä ja amino-alempi-alkyyliamideja, jollaisia edellä kuvattiin, valmistetaan edullisesti karboksyyli-ryhmällä substituoiduista barbituraateista. Käytettäessä esim. allonaalikarboksyylihappoa voidaan vaadittava aminoaryyli- tai amino-alempi-alkyyli-ryhmä viedä sisään lukuisilla eri työtavoilla, jotka sinänsä ovat tunnettuja. Niinpä voidaan esim. karboksyyli-ryhmällä substituotujen barbituraattien aminoaryyli-estereiden valmistamiseksi allonaalikarboksyylihappo esteröidä esim. p-nitrofenolilla 5-allyyli-5-(1-p-nitrofenyylioksidikarbonyyli-isopropyyli)-barbituurihapon saamiseksi, joka lopuksi pelkistetään 5-propyyli-5-(p-aminofenyylioksidikarbonyyli-isopropyyli)-barbituurihapoksi.

Esteröinti suoritetaan edullisesti inerttiin orgaaniseen liuottimeen liuotetun kondensoimisaineen läsnäollessa. Sopivia kondensoimisaineita ovat karbodi-imidit, kuten N,N'-difenylikarbodi-imidit ja N,N'-disykloheksyylikarbodi-imidit.

Sopivia inerttejä orgaanisia liuottimia ovat polaariset, aproottiset liuottimet, kuten N,N-dimetyyli-formamidi, dimetyylisulfoksiidi ja heksametyyli-fosforihappoamidi yksinään tai seoksessa ei-polaaristen aproottisten liuottimien, kuten asetonin, asetonitriilin ja etyyli-asetaatinkanssa. Eräs erityisen edullinen kondensoimisaine on N,N-disykloheksyylikarbodi-imidi ja erityisen edullinen liuotinsysteemi on N,N-dimetyyli-formamidi-etyyliasetatti.

Esteröintilämpötila ei ole erityisen ratkaiseva. Reaktio voidaan saattaa tapahtumaan lämpötilassa väliltä n. 0 - n. +50°C, erityisen edullisesti välillä n. 0 - 25°C.

Pelkistäminen suoritetaan liuottamalla saatu nitroesteri sopivaan, inerttiin, orgaaniseen liuottimeen, edullisesti alkanoliin, kuten metanoliin, etanoliin tai 2-propanoliin ja käsittelemällä vedyllä sopivan hydrauskatalyytin läsnäollessa kunnes vedyn vastaanottoa ei enää tapahdu. Sopivia hydrauskatalyyttejä ovat platina, palladium, rodium, rutenium ja nikkeli, joka mahdollisesti sivellään kannina-aineen, kuten hiilen, piihapon, aluminiumoksidin jne. pintaan. Eräs erityisen edullinen hydrauskatalyytti on 10-%:nen palladiumhiilellä. Vaikkakaan lämpötila ja paine hydrauksessa eivät ole ratkaisevia tapahtuu reaktio edullisesti huoneen lämpötilassa ja ilmakehän paineessa.

Karboksyyliryhmällä substituoitujen barbituraattien amino-alempialkyyliamidien valmistamiseksi voidaan allonaalikarboksyylihappo aminoida esim. 1,4-diaminobutaanilla 5-allyyli-5-[1-(4-aminobutyylikarbamoyyli)]-isopropyyli/barbituurihapon saamiseksi.

Aminointi suoritetaan inerttiin, orgaaniseen liuottimeen liuotetun kondensoimisaineen läsnäollessa. Sopivia kondensoimisaineita ovat karbodiimidit, kuten N,N'-difenyylkarbodiimidit ja N,N'-disykloheksyylikarbodiimidit ja karbonyyli-imidiatsolit, kuten 1,1'-karbonyylidi-imidiatsolit. Sopivia inerttejä orgaanisia liuottimia ovat eetteriset liuottimet, kuten monoglyymi, diglyymi, dioksaani ja tetrahydrofuraani. Eräs erityisen edullinen kondensoimisaine on 1,1'-karbonyyli-imidiatsoli. Eräs erityisen edullinen inertti orgaaninen liuotin on tetrahydrofuraani.

Aminointilämpötila ei ole erityisen ratkaiseva. Reaktio voidaan saattaa tapahtumaan lämpötilassa väliltä n. 0°C:esta liuottimen kiehumapisteeseen, erityisen edullisesti n. 25°C:ssa.

Karboksyyliryhmällä substituoituja barbituraatteja voidaan valmistaa ammattimiehen tuntemilla tavallisilla tavoilla. Niinpä voidaan karboksyyliryhmällä substituoituja barbituraatteja saada helposti esim. alkyloimalla pelkistävästi barbituurihappoa aldehydi- tai ketoesterillä, mitä seuraa saadun 5,5-disubstituoidun barbituurihapon alkylointi ja saippuointi.

Pelkistävä alkylointi suoritetaan käsittelemällä barbituurihappoa ja aldehydi- tai ketoesteriä kutenetyyliformyyliasetaattia, etyyliasetoasetaattia tai etyylilevulinaattia vedyllä metallisen hydrauskatalyytin läsnäollessa 5-monosubstituoidun barbituurihappojohdannaisen saamiseksi. Sopivia metallisia katalyyttejä ovat nikkeli ja jalometallit, kuten platina, palladium, rodium, rutenium jne. Yleensä käytetään katalyyttejä hienojakoisessa muodossa ja ne voivat

olla joko vapaina tai siveltyinä sopivien inerttien kantimien, kuten hiilen aluminiumoksidin, piihapon, kalsiumkarbonaatin jne. pintaan. Eräs edullinen katalyytti on 10-%:nen palladium hiilellä.

Liuottimina pelkistävää alkylointia varten voidaan mainita alkoholit, kuten metanoli, etanoli, 2-propanoli jne. sekä esterit, kuten etyyliasetaatti jne.

Vaikkakin pelkistävä alkylointi voidaan suorittaa laajalla lämpötila- ja paine-alueella n. huoneen lämpötilasta n. 150°C :seen asti ja n. ilmakehän paineesta n. 680 ilmekehään asti, käytetään edullisesti reaktiolämpötilaa väliltä n. $90-100^{\circ}\text{C}$ ja painetta n. 48 ilmakehää.

Alkyloimisvaihe suoritetaan käsittelemällä monosubstituoitua barbituurihappojohdannaista alkyloimisaineella, kuten metyylihalogenidilla, propyylihalogenidilla, allyylihalogenidilla, heksyylihalogenidilla, sykloheksenylihalogenidilla jne. sopivassa inertissä liuottimessa emäksen läsnäollessa 5,5-disubstituoidun barbituurihappojohdannaisten saamiseksi. Sopivia liuottimia ovat mm. alkoholit, kuten metanoli, etanoli, 2-propanoli jne. vesi, veden ja alkoholien seokset. Sopivia emäksiä ovat alkalimetalli- ja maa-alkalimetallihydroksidit, kuten natrium-, kalium- ja kalsiumhydroksidi, sekä alkalimetallialkoksidit, kuten natriummetoksidi, kaliummetoksidi ja kaliumtert.butoksidi. Eräs erityisen edullinen emäs on 2-%:nen natriumhydroksidin vesiliuos. Alkylointi voidaan suorittaa lämpötila-alueella välillä n. $10 - n. 80^{\circ}\text{C}$, edullisesti välillä $25-60^{\circ}\text{C}$.

Saippuoimisvaihe suoritetaan käsittelemällä korotetussa lämpötilassa disubstituoitua barbituurihappojohdannaista vesipitoisella hapolla, kuten kloorivetyhapolla, bromivetyhapolla, laimennetulla rikkihapolla jne. Reaktio saatetaan edullisesti tapahtumaan normaalilla vesipitoisella kloorivetyhapolla, jolloin lämpötila edullisesti on reaktioseoksen palautusjäähdytyslämpötila.

Diagnostisen reagenssin valmistamiseksi, joka on käyttökelpoinen keksinnön mukaisen määritysmenetelmän suorittamiseen, sidotaan kovalenttisesti karboksyyli-ryhmällä substituoitujen barbituraattien amjnoaryyliesterit ja amino-alempialkyyliamidit amidi-sidoksen avulla lateksipolymeeriin, joka sisältää karboksyyli-ähteitä.

Edullisia lateksipolymeerejä tätä tarkoitusta varten ovat karboksyloidut styrolibutadieenit, karboksyloidut polystyrolit, akryylihappopolymeerit jne. Kaupallisesti saatavista lateksipolymeereistä, jotka kuuluvat edellämainittuihin ryhmiin, on mainittava tuotteet, joilla on seuraavat tavaramerkit.

Dow 421, Dow 816, Dow 620, Fluka 241 ja Dow 241. Samoin voidaan käyttää Dow 1721, polystyrol^{ee}i-tyyppistä lateksipolymeeriä, jonka hiukkaskoko on n. 0,2 - n. 0,3 mikronia ja jossa on n. 8-12 % kuiva-ainetta ja jonka ominaispaino on n. 1,02.

Erityisen edullisia polymeerejä ovat karboksyloidut styrolibu^{ee}-tadieenisekapolymeerit, edullisesti tuotteet, joilla on tavaramerkki Fluka 241 tai Dow 241. Sopivia lateksikanninosasia toimitetaan kaupallisesti tavallisesti vesipitoisen lateksisuspension muodossa, tavallisesti väkevyyksissä väliltä n. 5-60 %kuiva-aineita. Nämä polymeerit ovat veteen liukenemattomia, niiden hiukkaskoot ovat väliltä n. 0,01- n. 0,9 mikronia, edullisesti väliltä n. 0,1-0,3 mikronia ja niiden ominaispaino on lähellä veden ominaispainoa, niin että ne pysyvät vesisuspensiossa. Osasilla tulisi olla riittävä pintavarauksen tiheys, niin että liitettäessä karboksyyli^{ee}ryhmällä substituoitujen barbituraattien aminoaryyli^{ee}liesteri^{ee}ihin ja amino-alempi-alkyyliamideihin niiden työntövoimat ovat riittäviä estämään yhteenpaakkuuntumista tai kasautumista.

Karboksyyli^{ee}ryhmällä substituoitujen barbituraattien aminoaryyli^{ee}esterit ja amino-alempi-alkyyliamidit yhdistetään karboksyloituihin lateksipolymeereihin amidi-sidoksella, jolloin tämä pannaan alulle veteen liukenevan karbodi-imidi-kondensoimisaineen läsnäollessa. Kytkeytymisaste riippuu polymeerissä olevien reaktiokykyisten ryhmien tiheydestä. Reaktiokykyisten ryhmien tiheys ei ole keksinnön toteutettavuudelle ratkaisevaa, mikäli reaktiokykyisiä ryhmiä on läsnä riittävä määrä riittävän määrän barbituraatti-yksiköitä, jotka ovat diagnostisessa testissä käyttökelpoisia, tekemiseksi mahdolliseksi. Sopivan tiheyden tulisi kuitenkin olla alueella n. 1 - n. 5 paino-% ja edullisesti n. 3 paino-%. Kytkemisreaktio karbodi-imidien kanssa on yksityiskohtaisesti selostettu US-patentissa n:o 3 857 931.

Kun lateksiin yhdistetty tuote kerran on muodostettu, voidaan sitä käyttää spesifisissä, diagnostisissa tutkimuksissa barbituraattien osoittamiseksi. Sitä voidaan käyttää missä tahansa sopivassa väkevyydessä riippuen spesifisestä testistä ja spesifisistä, tähän käytetyistä kokeista. Kuitenkin ovat väkevyydet väliltä n.0,1-2 paino-% lateksikiintoaineita edullisia ja erityisen edullisia ovat väkevyydet väliltä n. 0,3 - n. 1,5 paino-%.

Eräässä tyyppillisessä testissä sekoitetaan mitattu määrä vasta-seerumia barbituraatteja vastaan barbituraatteja sisältämättömän

kehon nesteeseen, esim. seerumin, syljen tai virtsan kanssa. Sitten lisätään mitattu määrä aminoaryyli- tai amino-alempi-alkyylibarbituraattiin yhdistettyä lateksia ja seosta inkuboidaan vielä korotetussa lämpötilassa, esim. 37°C:ssa, edelleen tietty aika, esim. n. 1 - n. 3 tuntia, edullisesti 2 tuntia. Testiseoksen pH-arvo on edullisesti alueella n. pH = 5,0 - 8,0 ja erityisen edullisesti välillä n. 6,5 - 7,5. Inkuboinnin jälkeen tarkkaillaan lateksiosasten höytälesaostumista tai yhteenliimaantumista. Sekä vastaseerumin että myös lateksikompleksin pitoisuus ja määrä asetetaan voimakkaan höytälesaostuksen aikaansaamiseksi ja kummankin reagenssin vähimmäisväkevyys, joka saa aikaanvoimakkaan höytälesaostumisen, määritetään. Vastaseerumin barbituraatteja vastaan seosta barbituraatteja sisältämättömän kehon nesteeseen voidaan inkuboida lievästi korotetussa lämpötilassa, esim. 37°C:ssa, ennen aminoaryyli- tai amino-alempi-alkyylibarbituraatin kanssa yhdistetyn lateksin lisäämistä.

Vastaseerumit, joita voidaan käyttää keksinnön mukaisessa diagnostisessa testissä, ovat vastaseerumeita, jotka ovat spesifisiä barbituraateille, kuten sekobarbitaalille ja bentobarbitaalille. Tällaisten vastaseerumien valmistus on kuvattu US-patentissa 3 766 162 ja julkaisussa Science 174, 1037 (1971).

Senjälkeen kun tarkkailujärjestelmä, kuten edellä kuvattiin, on muodostettu, liuotetaan eri määriä barbituraatteja esim. sekoobarbitaalia, pentobarbitaalia, butabarbitaalia, amobarbitaalia, fenobarbitaalia ja barnitaalia barbituraatteja sisältämättömään kehon nesteeseen. Vähimmäismäärä barbituraattia, joka vaaditaan estämään höytälesaostuminen, merkitään muistiin. Tämä määrä riippuu sekä väkevyydestä että myös kehon nesteeseen lisäystä määrästä, edelleen tässä testissä käytetyn vastaseerumin pitoisuudesta ja voimakkuudesta.

Eräässä edullisessa testissä asetetaan määrät ja pitoisuudet niin, että lähes 400-500 μ l seerumia tai virtsaa, jotka sisältävät barbituraattia n. 100 - 200 μ g (nanogrammaa)ml (kokonaismäärä väliltä 20 - 40 ng barbituraattia) suoraan riittävät estämään höytälesaostumisen. Heti kun testi kerran on jonkin lajin kehon nesteellä standardoitu, esim. virtsalla, ei toisenlaatuista kehon nestettä, esim. seerumia, voida käyttää tätä varten, ja tätä varten on suoritettava erillinen testi.

Koska yhteenliimautumisen tapahtuminen helposti voidaan havaita pelkällä silmällä, toimii keksinnön mukainen testi äärimmäisen herkkänä tukimusmenetelmänä barbituraattien, kuten sekobarbitaalin, pentobarbitaalin, butabarbitaalin, amobarbitaalin, fenobarbitaalin ja barnitaalin osoittamiseksi. Mikäli sentähden testi kerran, kuten edellä kuvattiin, on standardoitu, voidaan nanogramma-määrien näitä barbituraatteja läsnäolo kehon nesteissä yksinkertaisella tavalla osoittaa toteamalla höytälesaostumisen, mikä aiheutuu tällaisten barbituraattien läsnäolosta kehon nesteissä, estyminen verrattuna höytälesaostumiseen, jota esiintyy, kun käytetään barbituraatteja sisältämätöntä kehon nestettä.

Testi voidaan standardoida niin, että saadaan lääketieteellisesti ja tilastollisesti luotettava rajapiste. Niinpä aikaansaavat kehon nesteessä barbituraattimäärät, jotka ovat suurempia kuin tämä määrä, höytälesaostumisen estymisen (positiivinen testi tällaisen rohdoksen läsnäololle kehon nesteessä). Määrät, jotka ovat pienempiä kuin tämä määrä, eivät estä höytälesaostumista (negatiivinen testi).

Edellä kuvatut reagenssit voidaan sopivalla tavalla pakata kaupallisia tarkoituksia varten, esim. diagnostiseksi reagenssisarjaksi, joka sisältää kaksi erillistä säiliötä, joista toisessa on vastaseerumia barbituraatteja vastaan ja toisessa karboksyyli-ryhmällä substituoitujen barbituraattien aminoaryyli-estereitä tai amino-alempi-alkyyliamideja, jolloin nämä ovat amidisidoksella sidottuja karboksyyli-ähteitä sisältäviin lateksiosasiin, jälkimmäinen erityisen edullisesti vesisuspensiossa.

Karboksyyli-ryhmällä substituoitujen barbituraattien aminoaryyli-esterit ja amino-alempi-alkyyliamidit voivat samoin olla sidottuja immunogeenisiin kanninaineisiin, kuten proteiineihin tai polypeptideihin amidi-sidoksen avulla antaakseen antigeenejä jotka ovat käyttökelpoisia barbituraateille spesifisten vasta-aineiden löytämiseksi. Sitomismenetelmä immunogeenisiin kanninaineisiin samoin kuin vasta-aineiden saaminen löytyviksi on aivan yleisesti kuvattu US-patentissa 3 766 162.

Keksintöä valaistaan lähemmin seuraavilla esimerkeillä.

Esimerkki 1

Seos, jossa on 200 g barbituurihappoa, 215 g etyyliasetoasetaattia, 10 g 10-%:sta Pd-C ja 400 ml metanolia, pannaan 2 l:n lasiseen reaktioastiaan ja hydrataan 90-100°C:ssa ja 48 ilmakehän paineessa 20 tunnin ajan. Senjälkeen kun on lisätty 2 l vettä kuumennetaan

suspensiota kunnes kaikki on liuennut. Karalyytti suodatetaan pois ja suodosta jäädytetään yli yön. Kiteet kootaan ja saadaan 209 g 5-(1-etoksikarbonyyli-isopropyyli)barbituurihappoa, jonka sulamispiste on 160 - 162°C. Emäliuos haihdutetaan tyhjössä ja jäännös suspendoidaan sekoittaen pieneen tilavuusmäärään kiehuvaa etyyliasettaattia. Liuos jäädytetään huoneen lämpötilaan ja reagoimaton barbituurihappo kootaan. Suodoksesta saadaan lisäksi 65,2 g esterää, jonka sulamispiste on 160 - 162°C. (Kokonaissaalis 87,6 % laskettuna takaisinsaadusta barbituurihaposta).

Esimerkki 2

1 l:n kolmikaupulloon, joka on varustettu sekoittimella, palatusjäädytys- ja tiputussuppilolla, pannaan 100 g 5-(1-etoksikarbonyyli-isopropyyli)barbituurihappoa, 100 mg kalsiumsulfaattia, 50 mg kuparipölyä ja 500 ml vettä. Seosta sekoitetaan 15 minuutin ajan huoneen lämpötilassa ja lisätään 53,6 g allyylibromidia yhtenä annoksena. Senjälkeen lisätään tiputtaen 125 ml natriumhydroksidin 20-%:sta liuosta 45 minuutin aikana 50-55°C:ssa. 3 tunnin sekoittamisen jälkeen 50-55°C:ssa jäädytetään reaktioseos 30°C:seen ja lisätään vielä 26,8 g allyylibromidia yhtenä annoksena. Reaktioseosta kuumennetaan 90 minuutin ajan sekoittaen ja lisätään 20-%:sen natriumhydroksidin liuosta (65-70 ml) niin, että reaktioseos koko ajan on lievästi emäksinen. Seos jäädytetään huoneen lämpötilaan. Seoksen pH-arvo asetetaan lisäämällä 20-%:sta natriumhydroksidia n. 9:ään ja seosta uutetaan 4 kertaa 250 ml:lla etyyliasettaattia. Yhdistetyt etyyliasettaatti-uutteet uutetaan vielä 4 kertaa 300 ml:lla 1-%:sta natriumhydroksidi-liuosta ja vesipitoiset uutteet lisätään seokseen, jossa on 500 g jäätä ja 300 ml 6N HCl. Annetaan seistä huoneen lämpötilassa yli yön. Muodostunut sakka kootaan ja saadaan 91,0 g (78 %) 5-allyyli-5-(1-~~p-nitrofenyyli~~^{et}oksikarbonyyli-isopropyyli)barbituurihappoa, jonka sulamispiste on 112-114°C.

Esimerkki 3

Seosta, jossa on 50 g 5-allyyli-5-(1-etoksikarbonyyli-isopropyyli)-barbituurihappoa ja 400 ml 1N HCl kuumennetaan palautusjäädyttään 4 tuntia. Liuoksen annetaan seistä huoneen lämpötilassa yli yön. Muodostunut sakka kootaan ja saadaan 42,5 g (94 %) 5-allyyli-5-(1-karboksi-isopropyyli)barbituurihappoa, jonka sulamispiste on 202-203°C.

Esimerkki 4

Liuos, jossa on 2,19 g kloorimuurahaishappoetyyliesteriä 90 ml:ssa kloroformia, lisätään liuokseen, jossa on 5,08 g "allonaalikaarbonihappoa" /5-allyyli-5-(1-karboksi-isopropyyli)barbituurihappo/ ja 2,02 g trietyyliamiinia 100 ml:ssa dikloorimetaania (0-5°C:seen jäähdytettynä). Seosta sekoitetaan 5 tuntia huoneen lämpötilassa. Lisätään 3,06 g p-nitrofenolia ja seosta sekoitetaan huoneen lämpötilassa 14 tunnin ajan. Reaktioseos pestään kyllästetyllä natriumkarbonaattiliuoksella (3 kertaa 25 ml) ja vedellä neutraliksi, kuivataan vedettömällä natriumsulfaattilla ja suodatetaan. Haihduttamalla suodos alennetussa paineessa saadaan 4,7 g öljyä. Kiteyttäminen eetterin ja heptaanin seoksesta (1:1) antaa 2,2 g 5-allyyli-5-(1-p-nitrofenyylioksikarbonyyli)barbituurihappoa, jonka sulamispiste on 140-141°C.

Esimerkki 5

Liuosta, jossa on 750 g 5-allyyli-5-(p-aminofenyylioksikarbonyyliisopropyyli)barbituurihappoa 15 ml:ssa etanolia, joka sisältää 100 mg 10-%:sta palladium/hiiltä katalyyttinä, hydrataan huoneen lämpötilassa ja ilmakehän paineessa. 1 tunnin kuluttua on vaadittava määrä (180 ml) vetyä otettu vastaan. Reaktioseos suodatetaan seliitin läpi ja suodos haihdutetaan kuiviin. Jäännös kromatografoidaan 13 g:lla piihappogeeliä käyttäen etyyliasetaatia eluoimisaineena. Jakeet, jotka sisältävät halutun tuotteen, haihdutetaan. Jäljellejäävä kiinteä aine kiteytetään uudelleen kloroformi/eetteristä ja saadaan 620 mg (89 %) 5-propyyli-5-(p-aminofenyylioksikarbonyyli-isopropyyli)-barbituurihappoa, jonka sulamispiste on 212-215°C.

Esimerkki 6

Seosta, jossa on 2,5 g 5-allyyli-5-(1-karboksi-isopropyyli)-barbituurihappoa, 1,95 g 1,1'-karbonyylidi-imidiatsolia ja 100 ml tetrahydrofuraania, sekoitetaan tyypiatmosfäärissä huoneen lämpötilassa 3 tunnin ajan. Liuokseen lisätään 4,5 g 1,4-diaminobutaania ja seosta sekoitetaan yli yön. Kumimaiset kiintoaineet dekantoidaan ja suspendoidaan kuumaan tetrahydrofuraaniin. Kiteinen aine kootaan ja saadaan 5-allyyli-5-(4-aminobutylikarbonyyli)-isopropyyli/barbituurihappoa, jonka sulamispiste on 160-165°C. Etanolista uudelleenkiteytetty näyte sulaa 170°C:ssa.

5-allyyli-5-(1-(4-aminopropyylikarbonyyli)-isopropyyli)barbituurihappoa valmistetaan edellä esitetyn menetelmän mukaisesti 2,5 g:sta

5-allyyli-5-(1-karboksi-isopropyyli)barbituurihappoa, 2 g:sta 1,1'-karbonyylidi-imidatsolia, 100 ml:sta tetrahydrofuraania ja 4 g:sta 1,3-diaminopropaania. Tuote sulaa 202-203°C:ssa.

Esimerkki 7

5-allyyli-5-(1-(4-aminobutyylikarbamoyyli)-isopropyyli)barbituurihappo saatetaan reagoimaan lateksisuspension kanssa 1-sykloheksyyli-3-(2-morfoliini-etyyli)-karbodi-imidi-meto-p-toluolisulfo-naatin tai 1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyyli)karbodi-imidi-hydrokloridin läsnäollessa. Saatua kompleksia pestään toistuvalla kiinteiden lateksiosasten sedimentoinnilla linkoamalla ja toistuvalla suspendoinnilla sopivaan puskuriin, kunnes suspension vesipitoiseen faasiin ei enää jää vapaata aminobutyylibarbituurihappoa. Amino-butyylibarbituurihappoa käytetään väkevyydessä 1 mg/ml tislatussa vedessä. Liuos asetetaan pH = 5,0:aan. Lateksisuspensio on karboksyloitu styroli-butadieeni-sekapolymeeri (tavaramerkki Fluka, n:o 241), joka pestiin ja sitten laimennettiin vedellä, niin että se sisältää n. 8 % lateksi-kiintoaineita. Käytetyn karbodi-imidin väkevyys on 1 paino-%/tilav.-% tislatussa vedessä. Reaktioseos koostuu reaktioon osaaottavista aineista seuraavissa suhteissa: 1 tilavuusosa 1-%:sta karbodi-imidiä, 1 tilavuusosa aminobutyylibarbituurihappoa ja 3 tilavuusosaa lateksipolymeerisuspensiota. Reaktion annetaan tapahtua huoneen lämpötilassa 2-16 tunnin ajan jatkuvan sekoituksen alaisena. Jähmeä polymeerikompleksi sedimentoidaan sitten linkoamalla, pestään vedellä ja uudellen 0,1 M trissuolaliuospuskurilla, jonka pH on 7,3, loppuväkevyyteen 4 mg kiintoainetta/ml suspendoitua. Kytkemisreaktiossa voidaan käyttää Dow 816, Dow 421 ja Dow 1721 Fluka 241:n asemesta lateksina ja asetmitriiliä liuottimena, kun barbituurihappojohdannaisena käytetään 5-propyyli-5-(1-p-aminofenyylioksikarbonyyli-isopropyyli)barbituurihappoa.

Esimerkki 8

Vastaseerumin valmistus testiä varten

Kaniinin vastaseerumia barbituraatteja vastaan, joka on valmistettu US-patentin 3 766 162 työskentelytapaa vastaavasti, laimennetaan sopivassa puskurijärjestelmässä. Tämä ohennusaine koostuu seuraavista aineista vesipitoisessa liuoksessa pH = 7,3:ssa:

1. 0,01 % Thimersol
2. 1 % naudan albumiiniseerumia
3. 0,01 % EDTA (etyleenidiamiinitetra-asetatti dinatriummuodossa)
4. Tris[0,1 molaarinen tris (hydroksimetyyli)aminometaanihydrokloridi]
5. 0,85 % natriumkloridia.

Esimerkki 9

Testimenetelmä

2 ml ohennettua, esimerkin 8 mukaisesti valmistettua vastaseerumia täytetään pieniin koeputkiin kooltaan 10 x 75 mm. Tähän määrään sekoitetaan 400 - 500 μ l barbituurihappoa sisältämätöntä virtsaa. Nämä molemmat nesteet sekoitetaan keskenään ja inkuboidaan 37°C:ssa 10 minuuttia. Sitten lisätään 10 μ l laimennettua, vesipitoista 5-allyyli-5-(1-(4-aminobutylikarbamoyyli)-isopropyyli)barbituurihappo-lateksisuspensiota, joka sisältää n. 0,3 paino-% lateksi-kiintoaineita, ja sekoitetaan vastaseerumin ja virtsan kanssa. Koeputket pannaan sitten vesihauteeseen tai kuumennuslaitteeseen 37°C:seen niin että n. 1,5 cm nestepylvästä koeputkessa on veden pinnan alapuolella tai lämmityslaitteen metallin sisällä. Nesteen ulkonäkö putkissa on läpinäkyvä, samea tai heikosti maitomainen. Negatiivisilla kokeilla näkyy ensimmäisen tunnin aikana hienoja höytäleitä koeputkessa. Suuria, helposti näkyviä höytäleitä tulee toisen inkuboimistunnin aikana näkyviin ja ne pyrkivät laskeutumaan, minkä johdosta nesteessä tulee yhä kirkkaampi ja läpinäkyvämpi.

Erään erikoisen vastaseerumin, joka valitaan testisysteemiä varten, laimennus on sellainen, että suurin laimennus vielä kahden tunnin jälkeen antaa voimakkaan höytälesaostuksen, kuten edellä kuvattiin. Kun erilaisia määriä barbituurihappoa liuotetaan barbituurihappoa sisältämättömään, normaaliin virtsaan ja barbituurihappoa sisältämättömän virtsan asemesta käytetään testijärjestelmässä, ei höytälesaostumisen estämiseksi vaihtelee tavallisesti 100 ng/ml:sta tai suuremmasta riippuen käytetystä vastaseerumisväkevyydestä ja luovuttajaeläimessä tuotetun vastaseerumin voimakkuudesta. Samoin se on riippuvainen lisätyn kehon nesteen määrästä. Niinpä riittää edellä kuvattua järjestelmää varten 400-500 μ l virtsaa, joka sisältää 200-300 ng barbituraatteja/ml, suoraan höytälesaostumisen estämiseen. 100 μ l virtsaa, joka sisältää 800-1000 ng/ml tai 50 μ l virtsaa, joka sisältää 1600-2000 ng/ml käyttäytyvät samalla tavalla.

Patenttivaatimukset:

1. Karboksyyli-ryhmällä substituoitujen barbituraattien amino-aryyliesteri tai amino-alempi-alkyyliamidi.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että barbituraatti on 5-propyyli-5-(1-karboksi-isopropyyli) barbituurihappo.
3. Patenttivaatimuksen 1 ja 2 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että aminoaryyliesteri on aminofenyyliesteri.
4. Patenttivaatimuksen 1 ja 2 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että amino-alempi-alkyyliamidi on aminobutyyliamidi.
5. Patenttivaatimuksen 1 ja 2 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että amino-alempi-alkyyliamidi on aminopropyyliamidi.
6. 5-propyyli-5-(1-p-aminofenyyliloksikarbonyyli-isopropyyli) barbituurihappo.
7. 5-allyyli-5-(1-(4-aminobutyyli)karbamoyyli-isopropyyli) barbituurihappo.
8. 5-allyyli-5-(1-(4-aminopropyyli)karbamoyli-propyyli) barbituurihappo.
9. Menetelmä jonkun patenttivaatimuksien 1-8 mukaisen yhdisteen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että esteröidään tai amidoidaan allonaalikarboksyylihappo.
10. Immunologinen diagnosoireagenssi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää lateksipolymeerin erillisiä osasia, jolloin lateksipolymeerissä on karboksyyli-tähteitä, jotka amidi-sidoksella ovat sidottuja karboksyyli-ryhmällä substituoidun barbituraatin aminoaryyliesterin tai amino-alempi-alkyyliamidin amino-tähteeseen.
11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen reagenssi, t u n n e t t u siitä, että barbituraatti on 5-isopropyyli-5-(1-karboksi-isopropyyli) barbituurihappo.
12. Patenttivaatimuksen 10 ja 11 mukainen reagenssi, t u n n e t t u siitä, että lateksipolymeeri on karboksyloitu styrolibutadieeni-polymeeri, jonka ominaispaino on suunnilleen sama kuin vedellä ja jonka hiukkaskoko on n. 0,1 - n. 0,3 mikronia.
13. Menetelmä jonkun patenttivaatimuksien 10-12 mukaisen reagenssin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että karboksyyli-ryhmällä substituoidun barbituraatin aminoaryyliesteri tai amino-

alempi-alkyyliamidi saatetaan reagoimaan karboksyloidun lateksipolymeerin kanssa kytkemisaineen läsnäollessa.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kytkemisaine on vesiliukoinen karbodi-imidi.

15. Menetelmä barbituraattien läsnäolon osoittamiseksi jossakin kehon nesteessä, t u n n e t t u siitä, että tarkkaillaan höytälesaostumisen, joka tätä kehon nestettä varten aikaansaadaan, verrattuna tunnetun, barbituraatteja sisältämättömän, kehon nesteen kanssa, estymistä, kun ensimmäistä kehon nestettä inkuboidaan vastaseerumilla barbituraatteja vastaan ja sitten reagenssin kanssa, joka sisältää lateksipolymeerin erillisiä osasia, jolloin lateksipolymeeri sisältää karboksyyliähteitä, jotka ovat kovalenttisesti sidottuja karboksyyli-ryhmällä substituoidun barbituraatin aminoaryylesterin tai amino-alempi-alkyyliamidin aminotähteeseen amidi-sidoksella.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että osoitettu barbituraatti on sekobarbitaali, pentobarbitaali, butobarbitaali, amobarbitaali, fenobarbitaali tai barbitaali.

17. Patenttivaatimuksen 15 tai 16 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vastaseerumin ja reagenssin pitoisuudet asetetaan niin, että n. 200-400 ng sekobarbitaalia riittää suoraan esittämään höytälesaostumisen.

18. Jonkun patenttivaatimuksen 15-17 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kehon nesteinä käytetään virtsaa.

19. Jonkun patenttivaatimuksien 15-17 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kehon nesteinä käytetään seerumia.

20. Jonkun patenttivaatimuksien 15-17 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kehon nesteinä käytetään sylkeä.

21. Jonkun patenttivaatimuksien 15-20 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että seos, joka sisältää barbituraattia sisältämättömä kehon nestettä ja barbituraatille spesifistä vastaseerumia, inkuboidaan ennen inkubointia lateksipolymeerin kanssa.

22. Jonkun patenttivaatimuksien 10-12 mukaisen reagenssin käyttö barbituraattien määrittämiseksi kehon nesteissä.

Patentkrav:

1. Aminoarylester eller amino-lägre-alkylamid av ett med en karboxylgrupp substituerat barbiturat.
2. Förening enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att barbituratet är 5-propyl-5-(1-karboxi-isopropyl)barbitursyr
3. Förening enligt patentkraven 1 och 2, k ä n n e t e c k - n a d därav, att aminoarylestern är en aminofenylester.
4. Förening enligt patentkraven 1 och 2, k ä n n e t e c k - n a d därav, att amino-lägre-alkylamiden är en aminobutylamid.
5. Förening enligt något av patentkraven 1-2, k ä n n e - t e c k n a d därav, att amino-lägre-alkylamiden är en aminopropylamid.
6. 5-propyl-5-(1-p-aminofenyloxikarbonyl-isopropyl)barbitursyr
7. 5-allyl-5-/1-(4-aminobutyl)karbamoyl-isopropyl/barbitursyra.
8. 5-allyl-5-/1-(4-aminopropyl)karbamoylpropyl/barbitursyra.
9. Förfarande för framställning av en förening enligt något av patentkraven 1-8, k ä n n e t e c k n a t därav, att man för- estrar eller amidierar allonalkarboxylsyra.
10. Immunologisk diagnosreagens, k ä n n e t e c k n a d där- av, att den innehåller diskreta partiklar av en latexpolymer, som uppvisar karboxylrester, vilka kovalent är bundna genom en amid- bindning till aminoresten av en aminoarylester eller amino-lägre- alkylamid av ett med en karboxylgrupp substituerat barbiturat.
11. Reagens enligt patentkravet 10, k ä n n e t e c k n a d därav, att barbituratet är 5-isopropyl-5-(1-karboxi-isopropyl)- barbitursyra.
12. Reagens enligt patentkraven 10 och 11, k ä n n e t e c k - n a d därav, att latexpolymeren är en karboxylerad styrol-butadien- polymer med en specifik vikt av ungefär lika som vattnets specifika vikt och med en partikelstorlek av ca. 0,1 - ca. 0,3 mikroner.
13. Förfarande för framställning av en reagens enligt något av patentkraven 10-12, k ä n n e t e c k n a t därav, att man reagerar en aminoarylester eller en amino-lägre-alkylamid av ett med en karb- oxyylgrupp substituerat barbiturat med en karboxylerad latexpolymer i närvaro av ett kopplingsmedel.

14. Förfarande enligt patentkravet 13, k ä n n e t e c k -
n a t därav, att kopplingsmedlet är en vattenlöslig karbodiimid.

15. Förfarande för påvisning av närvaro av barbiturat i en
kroppsvätska, k ä n n e t e c k n a t därav, att inhiberingen av
utflockningen has under observation, vilken för denna kroppsvätska
jämförd med en känd, barbiturat-fri kroppsvätska framkallas, då den
första kroppsvätskan inkuberas med ett antiserum mot barbiturat och
sedan med en reagens, vilken innehåller diskreta partiklar av en
latexpolymer, som uppvisar karboxylrester, vilka genom en amid-
bindning är kovalent bundna till aminoresten av en aminoarylester eller
amino-lägre-alkylamid av ett med en karboxylgrupp substituerat bar-
biturat.

16. Förfarande enligt patentkravet 15, k ä n n e t e c k n a t
därav, att det påvisade barbituratet är secobarbital, pentobarbital,
butabarbital, amobarbital, fenobarbital eller barbital.

17. Förfarande enligt patentkravet 15 eller 16, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att koncentrationen av antiserumet och rea-
gensen ställs så, att mellan ca. 200 och 400 ng secobarbital direkt
räcker till inhibering av utflockningen.

18. Förfarande enligt något av patentkraven 15-17, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att som kroppsvätska används urin.

19. Förfarande enligt något av patentkraven 15-17, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att som kroppsvätska används serum.

20. Förfarande enligt något av patentkraven 15-17, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att som kroppsvätska används saliv.

21. Förfarande enligt något av patentkraven 15-20, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att blandningen innehållande barbiturat-fri
kroppsvätska och mot barbiturat specifikt antiserum inkuberas före
inkubationen med latexpolymeren.

22. Användning av en reagens enligt något av patentkraven 10-12
för bestämning av barbiturat i kroppsvätskor.