

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 143453 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

- (21) Ansøgning nr. 4472/70 (51) Int.Cl.³ C 12 Q 1/40
(22) Indleveringsdag 31. aug. 1970 // G 01 N 33/52
(24) Løbedag 19. jan. 1967
(41) Alm. tilgængelig 31. aug. 1970
(44) Fremlagt 24. aug. 1981
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. 317/67
(30) Prioritet 20. jan. 1966, 521814, US

(71) Ansøger WARNER-LAMBERT PHARMACEUTICAL COMPANY, Morris Plains, US.

(72) Opfinder Arthur Lawrence Babson, US.

(74) Fuldmægtig Ingeniørfirmaet Hofman-Bang & Boutard.

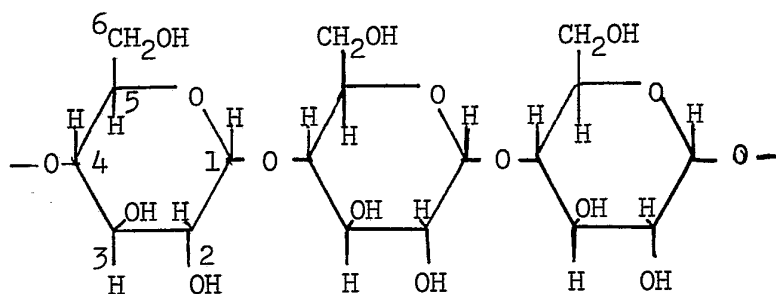
- (54) Fremgangsmåde til bestemmelse af
amylasekoncentrationen i et flui=
dum.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde af den i kravets indledning angivne art til bestemmelse af amylasekoncentrationen i forskellige medier. Amylasekoncentrationen kan bestemmes f.eks. i legemsvæsker og i planteekstrakter. Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i kravets kendetegnende del anførte.

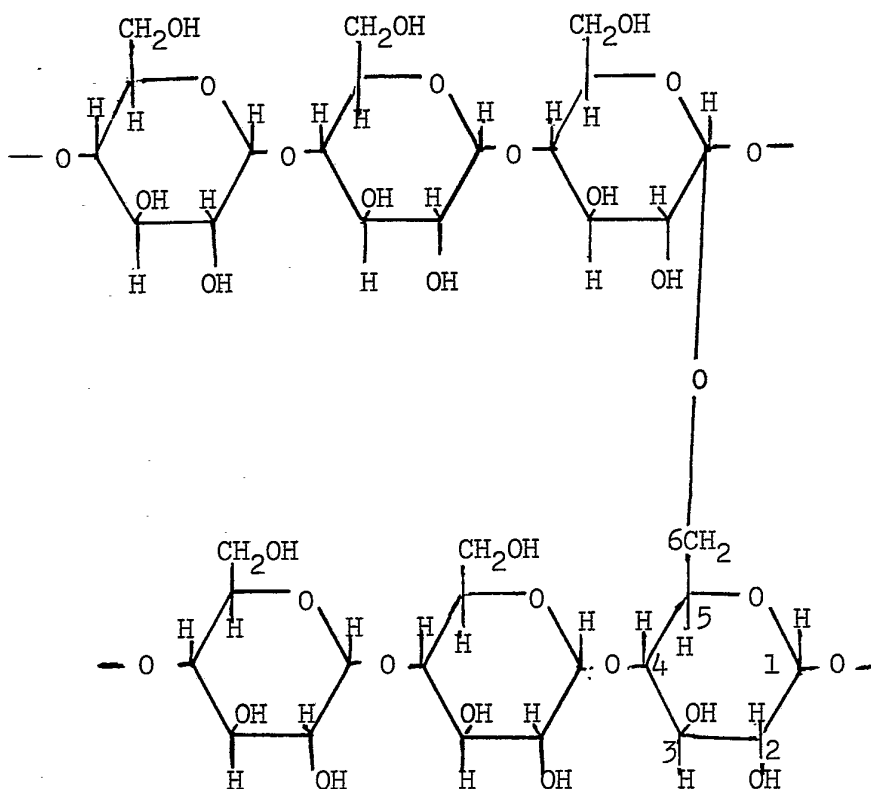
Det anvendte substrat indeholder således farvet stivelse, farvet amylose og/eller farvet amylopectin.

Stivelse, hvis empiriske formel er $(C_6H_{10}O_5)_n$, er et polymert materiale hovedsageligt bestående af en amylosefraktion med den almene formel:

DK 143453 B



og en amylopectinfraktion med den almene formel:



Amylaser er enzymer, som katalyserer hydrolysen af stivelse. Amylasen forekommer i to former, nemlig α -amylase, som kan hydrolysere både α -1,4 og α -1,6-bindingerne i henholdsvis amylose og amylopectin og derfor kan hydrolysere stivelse fuldstændigt, og β -amylase, der kun kan hydrolysere α -1,4-bindingen i stivelse, og således efterlader α -1,6-bindingen i amylopectin uforandret. Virkningen af α -amylasen er således en tilfældig hydrolyse af både

amylose og amylopectin, der efterhånden fører til mindre og mindre polysaccharidfragmenter, indtil der kun er maltose og måske noget glucose tilbage. α -amylase aktiveres af chloridioner og udviser optimal aktivitet ved pH ca. 7.

Amylaserne af animalsk oprindelse er af α -amylasetypen. Deres tilstedeværelse er påvist i mange væv, men de produceres primært af pancreas og spytkirtlerne. Funktionen af det amylase, der er tilstede i secreterne fra disse kirtelvæv, er at bidrage ved fordøjelsen af stivelse ved hydrolyse eller spaltning af stivelsen til mindre molekyler, der derpå kan absorberes og assimileres. Amylase kan også findes i planter, såsom hampefrø og maltet byg.

Den der tilstedeværende amylase er effektiv ved udøvelsen af den samme katalytiske funktion ved omdannelsen af polysaccharider til glucose ved hydrolyse.

Mens man i over 100 år har vidst, at der var amylase tilstede i blodbanerne, har man ikke kunnet fastslå den eksakte legemskilde til dette enzym i normalt serum. Kilden er tilsyneladende hverken pancreas eller spytkirtlerne, eftersom fjernelse af disse kirtler har en ubetydelig virkning på de normale serumamylase-niveauer. Man har bemærket, at serum-amylase-niveauet forhøjes ved et antal patologiske tilstande, men den mest iøjnefaldende stigning i serum-amylase-niveauet forkommer ved akut pancreatitis, hvor pludselige stigninger til 30 - 40 gange det normale niveau ikke er ualmindelige. Ved kronisk pancreatitis er stigningen mere moderat, og et væsentligt antal patienter kan faktisk have normale amylase-niveauer. Mekanismen, der forårsager denne stigning i serum-amylase-niveauet under disse betingelser, synes at være en hindring af sekretionsstrømmen i forbindelse med sprængning af acinus-cellerne. Den moderate forhøjelse af amylase i serum, der forekommer ved perforerede peptiske sår og ved tarmforstoppelser, forårsages sandsynligvis af udsivning af enzymet fra tarmsystemet til bughulen og genabsorbering fra bughulen til det almindelige kredsløb. Moderate forhøjelser ses også ved fåresyge, nyreinsufficiens og pancreascancer. Lever-galde-sygdomme er karakteriseret ved lave serum-amylaseniveauer.

Amylaseaktiviteten i serumprøver kan måles ved observering af omfanget af tabet af visse af stivelsens egenskaber, som dette enzym

kan indvirke på, når stivelse hydrolyseres (amyloklastiske metoder) eller ved udvikling af reducerende stoffer (saccharogene metoder). Ved de amyloklastiske metoder måles den nedgang i viskositet (viscosimetri) eller uklarhed (turbidimetri), der forekommer, når stivelsessuspensionen forklister af enzymet. Ofte anvendes den observerede aftagen af den blå farve, der er opnået ved reaktionen mellem stivelse og iod efter en arbitrær inkubationsperiode som et mål for den amyloklastiske aktivitet.

Der er foreslået mange modifikationer af den grundlæggende iodometriske fremgangsmåde indført i 1908 af Wohlgemuth. I nogle tilfælde anvendes en fast inkubationstid og farvens aftagen bestemmes fotometrisk, medens inkubationen i andre tilfælde fortsættes, indtil der ikke længere opnås blå farve. Metoder med fast inkubationstid har den ulempe, at den opnåede optiske tæthed ikke står i et lineært forhold til omfanget af den enzymatiske hydrolyse. Grunden hertil er, at stivelse-iod-farvereaktionen gennemgår en række farveændringer fra blå til violet til ravgult til rødt til farveløst efterhånden som stivelsesmolekylet formindskes. Metoder med variabel inkubationstid kræver udtagelse af adskillige lige store mængder af enzym-stivelses-inkubationsblandingen til forskellige tider til prøvning med iod. Dette er meget besværligt, når der skal testes mange prøver. Alle de iodometriske metoder lider af den ulempe, at der skal anvendes suboptimum-substrat-koncentrationer, eftersom analysernes endepunkt er destruktion af substratet. Det har vist sig, at den tilsyneladende amylaseaktivitet kan variere adskillige gange afhængig af stivelseskilden. Man har konstateret, at serumproteiner kan gribe ind i stivelse-iod-farvereaktionen og give en falsk høj indikation af amylaseaktivitet. (Clin. Chem. Acta 8: 918, 1963). Det har også vist sig, at opvarmning af serum fortyndet med saltvand i betydelig grad forøger den tilsyneladende amyloklastiske aktivitet, som den bestemmes ved iodometriske metoder, mens den samme behandling ødelægger den tilsyneladende saccharogene aktivitet. (Clin. Chem. Acta 9: 515, 1964).

Den originale saccharogene metode efter Somogyi (J. Biol. Chem. 25:399) anvendes endnu i vidtstrakt grad, selv om den er blevet forbedret af Somogyi og af Henry og Chuamori. Den sidste metode anbefales. Ved denne fremgangsmåde inkuberes 1 ml serum eller andre passende prøver, som indeholder en ukendt koncentration af amylase,

ved 40°C i 30 minutter med 7 ml pufret substrat, som indeholder 75 mg opløst stivelse. Reaktionen tilendebringes med wolframsyre og reducerende sukkerarter bestemmes på det resulterende filtrat. Enheden for amylaseaktiviteten, som også kaldes Somogyi-enheden, defineres som mængden af reducerende stoffer i den inkuberede prøve i forhold til en ikke-inkuberet kontrolprøve på 1 mg glucose. Den normale amylasemængde i blodet er ca. 40 - 140 enheder/100 ml.

Selv med disse modificerede fremgangsmåder er amylaseprøven stadig tidsrøvende og kompliceret og lider endvidere af den mangel, at man må bestemme en stor og variabel blindmængde af forud dannede eller i serum tilstedeværende reducerende sukkerarter. Yderligere forårsager ikke-hydrolyseret stivelse i prøven ofte uklarheder og griber derfor ind i bestemmelsen af det reducerende sukker. Der er således et stort behov for en enkel, hurtig og pålidelig metode til bestemmelse af amylase.

Det er desuden kendt at bestemme enzymkoncentrationer ved inkubering af en væskeprøve med overskud af en opløselig forbindelse mellem et substrat for det pågældende enzym og et farvestof, hvorefter det udløste farvestofs optiske tæthed måles som udtryk for enzymaktiviteten i prøven, jvf. USA patentskrift nr. 2.999.793, der omhandler phosphatasebestemmelse, og dansk patentskrift nr. 103.536, der omhandler bestemmelse af glutaminsyre-oxaleddikesyre-transaminase. Endvidere beskriver Fernley, Biochem. J. of Great Britain, 87, p. 90-95 (1963) en enzymatisk bestemmelse af cellodextrinase ved anvendelse af en i fosfat-citronsyre-puffer opløst forbindelse af cellodextrin og et reaktivt farvestof, ved hvilken fremgangsmåde man fraskiller det meste overskud af farvestofforbindelsen med en pufferopløsning indstillet til pH 9 inden optisk måling af den frigjorte mængde af farvestoffet.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til bestemmelse af amylase, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved det i kravets kendetegnende del anførte, adskiller sig fra den således kendte analoge fremgangsmåde til bestemmelse af cellodextrinase ved anvendelsen af en fuldstændig vandopløselig farvestofforbindelse som substrat for amylasen samt ved, at overskud af substratet fjernes fuldstændigt med et over for overskud af substratet specifikt fældningsmiddel, inden den optiske måling.

Det er således unødvendigt at anvende en særlig puffer til opløseliggørelse af substratet, om end en puffer kan anvendes af hensyn til opnåelse af reproducerbar farvning.

Ved anvendelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen opnås en særdeles enkel og pålidelig fremgangsmåde til bestemmelse af amylase, som er hurtig at udføre og følsom over for selv små mængder af amylase, hvilket betyder, at der kun skal anvendes en lille mængde af prøvefluidum.

Anvendelsen af et opløseligt farvet substrat er særpræget for amylasebestemmelse, idet man hidtil kun har anvendt uopløselige substrater. Det farvede stivelsesprodukt, der anvendes ved amylasebestemmelsen ifølge opfindelsen er et vandopløseligt polysaccharid, hvorfra alt frit farvestof er fuldstændigt fjernet. Produktet skal være opløseligt for at opnå den forbedrede følsomhed, der er en af de vigtige fordele ved den omhandlede amylasebestemmelse.

Det forhold, at det farvede substrat ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen skal være vandopløseligt, medfører visse vanskeligheder. Konventionelle procedurer til udvaskning af opløseligt uomsat farvestof fra uopløselige farvede produkter f.eks. som beskrevet i U.S.A. patentskrift nr. 3.304.297 kan ikke anvendes, eftersom det farvede produkt, der anvendes som substrat ifølge opfindelsen, selv er vandopløseligt. Fældning med mineralsyrer og udvaskning med vand er heller ikke anvendelig, eftersom det anvendte produkt er opløseligt ikke blot i vand, men også i mineralsyre. De fra tekstilområdet kendte metoder til fjernelse af overskud af farvestof, såsom fældning med alkohol, har vist sig at have en nedsættende virkning på det farvede substrats vandopløselighed, hvorfor både farvestof og substrat kan blive udfældet.

Komplekse rensningssystemer, såsom gelfiltrering og dialyse kan teoretisk set anvendes, men det er ikke muligt med sikkerhed at bestemme, om alt uomsat farvestof er fuldstændigt fjernet under rensningen, med mindre der anvendes et selektivt fældningsmiddel for det farvede substrat.

Den ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendte alkoholiske garve-

syre opfylder dette krav. Rensningsprocedurerne kan fastlægges ved, at man bestemmer tilstedeværelsen af frit farvestof i successive fraktioner af en rensset opløsning af farvet substrat ved at udfælde det vandopløselige farvede substrat med det alkoholiske garvesyre-fældningsmiddel og observerer tilstedeværelsen af farvestof i overvæskan. Tilstedeværelsen af farvestof indikerer naturligvis, at rensningen er ufuldstændig.

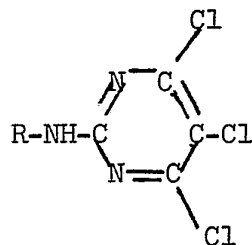
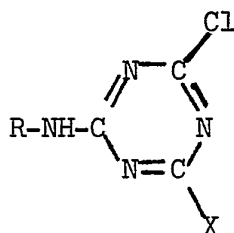
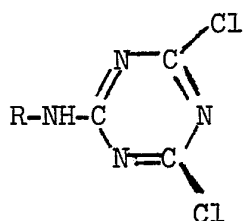
Det omhandlede opløselige farvede substrats overlegenhed over for et i handelen værende uopløseligt farvet substrat til bestemmelse af amylaseaktiviteten er påvist ved sammenligningsforsøg. Det vandopløselige substrat viste sig at være mere end 8 gange så følsomt som det uopløselige farvede substrat, og den udviklede farve er direkte proportional med enzymkoncentrationen gennem et bredt koncentrationsområde. Ved anvendelse af det relativt ufølsomme uopløselige farvede substrat er det derimod meget sandsynligt, at man vil opnå unøjagtige målinger af amylaseaktiviteten i grænseområderne med unormale amylaseniveauer i blodserum.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen bestemmes amylaseaktivitetsniveauet i en prøve, som kan være en legemsvæske, såsom blodserum, som angivet i kravet ved inkubering af prøven med et substrat indeholdende en vandopløselig stivelse eller stivelsesfraktion såsom amylose eller amylopectin, som forud er farvet med en af de velkendte reaktive farvestoffer for polysaccharidmaterialer, idet substratet udgør en stabil kemisk forbindelse mellem polysaccharidet og farvestoffet, og påfølgende observering af opløsningens farve efter bundfældning af uomsat substrat med et passende reagens. De reaktive farvestoffer, der kan anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er velkendte indenfor cellulosestekstil-farvningen og er f.eks. azofarvestoffer, komplekse metal-azofarvestoffer, anthraquinon-, phthalocyanin-, dioxazin- og formazyl-farvestoffer, som specielt også kan indeholde en sulfogruppe.

De reaktive grupper i disse farvestoffer indeholder i det mindste en substituent, som under bestemte betingelser fraspaltes som en anion. Den reaktive gruppe kan f.eks. bestå af radikalet fra et cyclisk carbimidhalogenid, som indeholder mindst et ustabilt halogenatom, som er bundet til et ringatom, der er nabostillet til et tertiært ringnitrogenatom. Den reaktive gruppe kan især bestå af en azinring af aromatisk karakter, som i det mindste indeholder to ter-

tiære ringnitrogenatomer og mindst et mobilt halogenatom bundet til et ringatom, som er nabostillet et sådant nitrogenatom. Halogenatomet kan f.eks. være chlor eller brom. Eksempler på sådanne reaktive grupper er mono-, di- eller tri-halogendiazinyl-grupper eller mono- eller di-halogentriazinylgrupper.

Disse reaktive farvestoffer har følgende almene strukturformler:



hvor R er en chromophor afledt af de forskellige farvestofklasser, såsom azo-, anthraquinon-, formazyl- og phthalocyanin-farvestoffer, og X er halogen eller kan være et inaktivt radikal, som indeholder en solubiliserende gruppe. Eksempler på sådanne reaktive farvestoffer er f.eks. nævnt i U.S.A. patentskrift nr. 2.820.785, 2.889.316, 2.891.941, 2.892.828, 2.979.498, 3.054.795, 3.036.058, 3.149.100 og 3.127.232.

Disse farvestoffer sælges f.eks. af Ciba Co., Inc. under handelsnavnet "CIBACRON[®]", af Imperial Chemical Industries Limited under handelsnavnet "PROCION[®]", af Hoechst under handelsnavnet "REMAZOL[®]",

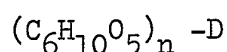
af Sandoz under handelsnavnet "DRIMAREN[®]" og af Geigy under handelsnavnet "REACTON[®]".

Som omtalt kan substraterne, der anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, bestå af farvet stivelse, farvet amylose eller farvet amylopectin. Ved passende forbehandling og ved anvendelse af opløsningsmidler kan efter sædvanlige metoder stivelse spaltes i amylose- og amylopectinfraktioner. Når f.eks. fortyndede stivelsespastaer, som indeholder mellem 2 og 3% stivelse, autoklaveres, og den varme stivelsesopløsning mættes med en alkohol, f.eks. butanol eller pentanol, bundfældes en fraktion, som væsentligst består af amylose eller en ligekædet stivelsesfraktion. Amylosefraktionen giver en intens blå farve med iod. Størstedelen af den tilstedeværende stivelse separeres ikke fra ved denne butanol-behandling. Denne del er amylopectin eller forgrenede stivelsesfraktioner og giver en rød farve med iod.

Disse højt rensede stivelsesfraktioner kan f.eks. fås under handelsnavnet "NAPOL L" amylose og "NAPOL B" amylopectin fra A. E. Staley Mfg. Co., Decatur, Illinois. Disse er fuldstændigt beskrevet i litteraturen indenfor kulhydrat-kemien og i detaljerede tekniske bulletiner, f.eks. TDS, No. 126 fra A.E. Staley Mfg. Co.

Den farvede stivelse, den farvede amylose eller den farvede amylopectin, der anvendes som substrat ved udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen, fremstilles ved omsætning af en basisk opløsning af stivelse, amylose eller amylopectin, i ca. 24 timer med et reaktivt farvestof fra en af de ovennævnte klasser ved temperaturer på 20 - 30°C. Den resulterende reaktionsblanding neutraliseres med en vandig opløsning af en syre, som f.eks. saltsyre. Methanol tilsættes derefter til udfældning af den farvede stivelse, amylose eller amylopectin. Bundfaldet separeres fra og opløses i en phosphatpuffer, og ethvert uopløst bundfald centrifugeres fra. Tilbageværende uomsat farvestof fjernes derefter f.eks. ved dialyse eller ved gelfiltrering. Det således fremstillede farvede produkt er anvendeligt uden yderligere behandling som substrat til bestemmelse af et produkts amylaseaktivitet, eller det kan lyophiliseres til et stabilt produkt, som efter at det er ført tilbage til opløst tilstand, er anvendeligt endog efter meget lang tids lagring.

Den nøjagtige kemiske struktur af de resulterende farvede produkter er ikke kendt, men det menes, at farvestoffet bindes til de frie hydroxylgrupper i den anvendte stivelse, amylose eller amylopectin på samme måde som reaktive farvestoffer kobler med alkalibehandlet cellulose, jvf. U.S.A. patentskrift 1.886.480, 3.044.843 og 3.029.123. Der er angivet en empirisk formel for disse hidtil ukendte substrater, nemlig



hvor n er et helt tal, og hvor $(C_6H_{10}O_5)_n$ repræsenterer stivelse, amylose eller amylopectin, medens D er resten fra det reaktive farvestof.

Selvom stivelse, selv i den form den opnås fra kartofler, majs, ris, maranta eller andre kilder, kan farves og anvendes som substrat ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, foretrækkes anvendelse af en amylose- eller amylopectin-fraktion. Disse fås i handelen i form af omhyggeligt standardiserede fraktioner og opnås ud fra stivelse på den beskrevne måde.

Ved udførelse af en analyse af amylaseaktiviteten foretrækkes det at pufre den farvede amylose eller det farvede amylopectin eller den farvede stivelse med et passende puffersystem, såsom en phosphatpuffer, til opnåelse af en pH-værdi på ca. 7, hvorved der fås en farvet opløsning, hvis farve afhænger af det anvendte reaktive farvestof. En lille mængde (0,1 - 0,2 ml) af en prøve, hvis amylaseaktivitet skal måles, som f.eks. en patients legemsvæske, f. eks. urin, serum, spytt, mavevæske eller spinalvæske, inkuberes med substratet, fortrinsvis ved 37°C i ca. 10 minutter. Ved afslutningen af inkubationsperioden tilsættes et passende protein- og stivelses-fældningsmiddel, der ifølge opfindelsen er garvesyre i alkohol eller alkohol alene for at separere ikke-hydrolyseret substrat og uønsket protein fra den inkuberede prøve. Bundfaldet fjernes derefter fuldstændigt ved centrifugering eller filtrering. Remanensen kasseres, og overvæsken eller filtratet bevares. Overvæsken eller filtratet indeholder de farvede alkoholopløselige hydrolysefraktioner, og den optiske tæthed af dette fluidum bestemmes derefter ved absorptionsmaksimet for det specielt anvendte farvestof. Den optiske tæthed er proportional med amy-

lasens koncentration i den undersøgte legemsvæske, og ved passende kalibrering kan amylasekoncentrationen aflæses direkte. Andre substrater, som indeholder amylase, såsom planteekstrakter eller enzympreparater kan analyseres på analog måde.

Opfindelsen illustreres nærmere ved nedenstående eksempler.

EKSEMPEL 1

Fremstilling af farvet amylopectin

10 g amylopectin opløses i 200 ml 1N natriumhydroxidopløsning. Til den resulterende opløsning sættes 2 g af et farvestof, såsom "Geigy Reactone[®] Red 2B" under omrøring. Farvestofblandingen inkuberes ved 20 - 30°C i ca. 24 timer. Ved slutningen af denne inkubationstid neutraliseres reaktionsblandingen med 3N saltsyre og den neutraliserede opløsning ledes derefter igennem et passende gelfiltreringsmiddel, såsom "Sephadex[®] G-25" til fjernelse af alt ikke-omsat farvestof. En forudgående fældning i 50% vandig methanol er ofte fordelagtig til fjernelse af størstedelen af ikke-omsat farvestof før gelfiltreringen. Den således opnåede opløsning pufres derefter med en passende puffer, f.eks. en fosfatpuffer, til opnåelse af en pH-værdi på ca. 7. Den pufrede opløsning kan anvendes direkte som beskrevet nedenfor eller kan lyophiliseres, således at produktet lettere kan tåle lagring.

EKSEMPEL 2

Bestemmelse af amylase i blodserum

0,2 ml af en blodserum inkuberes med 1 ml af det pufrede substrat, der er fremstillet i eksempel 1, i 10 minutter ved 37°C. Ved slutningen af denne inkubationsperiode tilsættes 5 ml af en 1% garvesyreopløsning i 50% methanol. Den resulterende alkoholopløsning centrifugeres ved ca. 2000 o/minut til fjernelse af ethvert bundfældet materiale. Den optiske tæthed af overvæsken bestemmes derpå ved en bølgelængde på 500 nm. Til sammenligning underkastes en standardserum, som indeholder en kendt koncentration af amylase,

samme prøve. Eftersom mængden af farvestof i den resulterende opløsning dannet ved hydrolyse af substratet forårsaget af den tilstedeværende amylase er proportional med enzymkoncentrationen, og mængden af amylase, der er tilstede i prøven kan derfor let beregnes.

EKSEMPEL 3

I stedet for substratet beskrevet i eksempel 1 anvendes et substrat af farvet amylose fremstillet analogt med eksempel 1, og de opnåede resultater ved analysen er lige så tilfredsstillende som de, der opnås i eksempel 2.

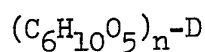
EKSEMPEL 4

I stedet for substratet beskrevet i eksempel 1 anvendes et substrat af farvet majsstivelse fremstillet på analog måde, og det opnåede resultat ved analysen er ligeså tilfredsstillende som det, der er opnået i eksempel 2.

P a t e n t k r a v:

Fremgangsmåde til bestemmelse af amylasekoncentrationen i et fluidum ved inkubering af en prøve af fluidet med et farvet substrat for amylasen og måling af den fremkaldte farve, k e n d e t e g n e t ved,

(A) at man inkuberer en blanding af fluidum-prøven og en vandig opløsning af et vandopløseligt farvet substrat i det væsentlige fri for frit farvestof og med den almene formel



hvor n er et stort helt tal, $(C_6H_{10}O_5)_n$ er et naturligt forekommende polysaccharid valgt blandt stivelse, amylose og amylopectin, og D er resten af et reaktivt farvestof, som er kovalent bundet til dannelsen af en stabil kemisk forbindelse med polysaccharidet, samt eventuelt en puffer, i et bestemt, forud fastlagt tidsrum og ved fastlagt temperatur,

(B) at man tilsætter et fældningsmiddel for den del af substratet, der ikke er hydrolyseret af amylasen, bestående af alkohol eller en alkoholisk opløsning af garvesyre, der er opvarmet til ca. 20 - 30°C,

(C) at man fjerner det dannede bundfæld til opnåelse af overvæsken som et klart fluidum indeholdende reaktionsprodukterne fra amylaseaktiviteten, og

(D) at man måler overvæskens optiske tæthed.

Fremdragne publikationer:

Dansk patent nr. 103536

USA patent nr. 2999793

Fernley, Biochemical J. of Great Britain, 87 (1963), s. 90-95.