



Erfolgspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑪

628 737

②1 Gesuchsnummer: 5558/77

⑦3 Inhaber:
F. Hoffmann-La Roche & Co. Aktiengesellschaft,
Basel

②2 Anmeldungsdatum: 04.05.1977

③0 Priorität(en): 26.05.1976 US 690123

②4 Patent erteilt: 15.03.1982

⑦2 Erfinder:
Antonino Focella, Clifton/NJ (US)
John Edward Heveran, Fairfield/NJ (US)
Sidney Teitel, Clifton/NJ (US)
Manfred Weigle, North Caldwell/NJ (US)

④5 Patentschrift
veröffentlicht: 15.03.1982

⑤4 Immunologisches Testsystem.

⑤7 Es wird ein immunologisches Testsystem zur Bestimmung von Barbituraten beschrieben. Dieses besteht aus einem wasserunlöslichen Reagens mit diskreten Teilchen eines Latexpolymeren, welches Carboxylgruppen aufweist, die über eine Amidbindung an den Aminorest eines Aminoarylesters oder Amino-niederalkylamids eines mit einer Carboxylgruppe substituierten Barbiturats kovalent gebunden sind. Weiterhin besteht das Testsystem aus einem Antiserum gegen Barbiturate. Als carboxyliertes Barbiturat kommt insbesondere 5-Isopropyl-5-(2-carboxy-1-methyl-äthyl)barbitursäure in Betracht. Als Latexpolymeren eignen sich insbesondere carboxylierte Styrolbutadiencopolymere.

PATENTANSPRÜCHE

1. Immunologisches Testsystem, dadurch gekennzeichnet, dass es als wasserunlösliches Diagnosereagens diskrete Teilchen eines Latexpolymeren, welches Carboxylreste aufweist, die über eine Amidbindung an den Aminorest eines Aminoarylestes oder Amino-niederalkylamids eines mit einer Carboxylgruppe substituierten Barbiturats kovalent gebunden sind und Antiserum gegen Barbiturate enthält.

2. Testsystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Barbiturat 5-Isoproyl-5-(2-carboxy-1-methyl-äthyl) barbitursäure ist.

3. Testsystem nach einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Latexpolymer ein carboxyliertes Styrol-Butadien-Plymeres mit einem spezifischen Gewicht von etwa demjenigen von Wasser und einer Teilchengröße von 0,1 bis 0,3 Mikron ist.

Die Erfindung betrifft ein immunologisches Testsystem, welches zur Feststellung der Anwesenheit von Barbituraten in Körperflüssigkeiten brauchbar ist.

Die strake Zunahme der Einnahme von therapeutischen Mitteln, insbesondere von Barbituraten durch die allgemeine Bevölkerung und das Militär hat die praktische Notwendigkeit zur Verbesserung der analytischen Arbeitsweisen zur Bestimmung solcher Mittel in biologischen Flüssigkeiten mit sich gebracht. In zahlreichen Fällen sind die Stellen für eine medizinische Behandlung mit der Notwendigkeit konfrontiert, sofort die Identität eines Barbiturates zu bestimmen, das von einem Patienten eingenommen wurde, der nicht bereit ist, oder – weil er sich in einem Komazustand befindet – nicht in der Lage ist, dem behandelnden Arzt eine Information zukommen zu lassen. Frühere Arbeitsweisen umfassten die Identifizierung von Barbituraten durch Extraktion und dünnenschichtchromatographische, gaschromatographische und spektrophotometrische Methoden. Diese Arbeitsweisen sind jedoch relativ zeitraubend, arbeitsaufwendig und ohne grosse Empfindlichkeit. In neuerer Zeit wurde eine rasche und empfindliche immunologische Untersuchungsmethode beschrieben, welche die Reaktion zwischen Antikörpern und Barbituratantigenen einschliesst, siehe US-PS 3 766 162 und den Artikel von S. Spector und E.J. Flynn in Science, 174, 1037 (1971). Diese Arbeitsweise erfordert jedoch eine komplizierte und teure Ausrüstung wie Scintillationszähler. Daher wäre es vorteilhaft, eine rasche und hochempfindliche Untersuchungsmethode zur Feststellung der Anwesenheit von Barbituraten in biologischen Flüssigkeiten zu haben, welche keine komplizierte Ausrüstung erfordert und in einfacher Weise durch Laborpersonal mit einem Minimum an Ausbildung durchgeführt werden könnte.

Das erfindungsgemäße immunologische Testsystem ist dadurch gekennzeichnet, dass es als wasserunlösliches Diagnosereagens diskrete Teilchen eines Latexpolymeren, welches Carboxylreste aufweist, die über eine Amidbindung an den Aminorest eines Aminoarylestes oder Aminoniederalkylamids eines mit einer Carboxylgruppe substituierten Barbiturats kovalent gebunden sind und Antiserum gegen Barbiturate enthält.

Die kovalent über eine Amidbindung an ein carboxyliertes Latexpolymeres gekuppelten Aminoarylester und Amino-niederalkylamide von mit einer Carboxylgruppe substituierten Barbitursäuren sind eine neue Klasse von Barbitursäurederivaten. Sie werden – an das Latexpolymeres mittels dieser Brückengruppe gebunden – als Reagens in einem empfindlichen, diagnostischen Test auf Anwesenheit von Barbituraten in biologischen Flüssigkeiten verwendet. Diese Bestimmungsmethode ist von der an sich bekannten Bindung von Antigenen an hierfür spezifische Antikörper abhängig, wobei diese durch eine Insolubilisierung oder Agglutination, gefolgt von einer Ausflockung,

sichtbar gemacht wird. Wenn entweder das Antigen oder der Antikörper an ein geeignetes Polymeres wie ein Latexpolymeres, wie dies noch im folgenden beschrieben wird, gebunden ist, wird der Nachweis der Antigen-Antikörperbindung mittels Agglutination mit Hilfe des Latexpolymeres signifikant erhöht, so dass eine solche Agglutinationsreaktion leicht mit dem blossen Auge beobachtet werden kann.

Die allgemeine Arbeitsweise der Verwendung von Latexteilchen als Träger für Antigene oder Antikörper für eine leichtere Sichtbarmachung der Antigen-Antikörperreaktion ist bereits in der Literatur beschrieben worden, z.B. in der US-PS 3 857 931.

Die neuen Barbitursäurederivate, welche zur Herstellung der Latexreagentien verwendet werden, sind somit Aminoarylester und Amino-nieder-alkylamide von mit einer Carboxylgruppe substituierten Barbitursäuren. Der in der Beschreibung verwendete Ausdruck «niederes Alkyl» umfasst geradkettige und verzweigtkettige, gesättigte Kohlenwasserstoffreste mit 2 bis 8 Kohlenstoffatomen, z.B. Äthyl, Propyl, n-Butyl oder i-Butyl. Der Ausdruck «Aryl» umfasst einen aromatischen Rest, welcher sich von einem unsubstituierten oder substituierten Aren ableitet, wie beispielsweise Phenyl, Naphthyl, Halophenyl, Tolyl, Anisyl, Nitrophenyl oder Hydrophenyl. Der Ausdruck «Halogenid» umfasst Iodid, Bromid und Chlorid.

Die zur Bindung an Latexpolymeren brauchbaren Barbiturate sind solche, welche freie Carboxylgruppen besitzen. Besonders bevorzugt sind Aminoarylester und Amino-nieder-alkylamide der Carboxylgruppe der 5-Allyl-5-(1-carboxy-isopropyl) barbitursäure, weil letztere die Carboxylgruppe in der Seitenkette enthält und leicht zugänglich ist, jedoch ist bei der Untersuchung unter Verwendung des erfindungsgemäßen Testsystems der Nachweis von Barbituraten möglich, welche entweder freie oder Funktionen tragende Carboxylgruppen besitzen, wie z.B. Barbital, Phenobarbital, Amobarbital, Butobarbital oder Pentobarbital.

Die neuen Aminoarylester und Amino-niederalkylamide, wie sie zuvor beschrieben wurden, werden vorteilhafterweise aus mit einer Carboxylgruppe substituierten Barbitursäuren hergestellt. Unter Verwendung von z.B. 5-Allyl-5-(1-carboxy-isopropyl) barbitursäure kann man den erforderlichen Aminoaryl- oder Amino-nieder-alkylrest nach einer Anzahl von Arbeitsweisen einführen, die an sich bekannt sind. So kann z.B. zur Herstellung von Aminoarylestern 5-Allyl-5-(1-carboxy-isopropyl) barbitursäure mit z.B. p-Nitrophenol verestert werden, um 5-Allyl-5-[1-methyl-2-(p-nitrophenyloxy-carbonyl)äthyl]barbitursäure zu liefern, welche anschliessend zu 5-Propyl-5-[1-methyl-2-(p-amino-phenyloxy-carbonyl)äthyl] barbitursäure reduziert wird.

Die Veresterung wird vorzugsweise in Anwesenheit eines in einem inerten organischen Lösungsmittel gelösten Kondensationsmittels durchgeführt. Geeignete Kondensationsmittel sind Carbodiimide wie N,N'-Diphenylcarbodiimid und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid.

Geeignete inerte organische Lösungsmittel umfassen polare, aprotische Lösungsmittel wie N,N-Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid und Hexamethylphosphorsäureamid allein oder in Mischung mit nicht polaren aprotischen Lösungsmitteln wie Aceton, Acetonitril und Äthylacetat. Ein besonders bevorzugtes Kondensationsmittel ist N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid und ein besonders bevorzugtes Lösungsmittelsystem ist N,N'-Dimethylformamid-Äthylacetat.

Auf die Einhaltung einer bestimmten Veresterungstemperatur kommt es nicht an. Die Reaktion kann zwischen etwa 0 °C und etwa +50 °C, besonders bevorzugt bei etwa 0 °C bis 25 °C, durchgeführt werden.

Die Reduktion wird durchgeführt, indem man den erhaltenen Nitroarylester in einem geeigneten, inerten organischen Lösungsmittel, vorzugsweise einem Alkanol wie Methanol, Ätha-

nol oder 2-Propanol, löst und mit Wasserstoff in Anwesenheit eines geeigneten Hydrierungskatalysators behandelt bis kein Wasserstoff mehr angenommen wird. Geeignete Hydrierungskatalysatoren umfassen Platin, Palladium, Rhodium, Ruthenium und Nickel, das gegebenenfalls auf Trägermaterial wie Kohle, Kieselsäure oder Aluminiumoxyd aufgetragen ist. Ein besonders bevorzugter Hydrierungskatalysator ist 10% Palladium auf Kohle. Obwohl die Temperatur und der Druck bei Durchführung der Hydrierung nicht kritisch sind, erfolgt die Reaktion mit Vorteil bei Raumtemperatur und unter Atmosphärendruck.

Zur Herstellung der Amino-niederalkylamiden wird 5-Allyl-5-(1-carboxyl-isopropyl)barbitursäure mit z.B. 1,4-Diaminobutan aminiert, um 5-Allyl-5-[1-methyl-2-(4-aminobutylcarbamoyl)-äthyl] barbitursäure zu liefern.

Die Aminierung wird in Anwesenheit eines in einem inerten, organischen Lösungsmittel gelösten Kondensationsmittels durchgeführt. Geeignete Kondensationsmittel sind Carbodiimide wie N,N'-Diphenylcarbodiimid und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid und Carboxyldiimidazole wie 1,1'-Carboxyldiimidazol. Geeignete inerte organische Lösungsmittel sind ätherische Lösungsmittel wie Diäthylen-glykolmonomethyläther, Diäthylenglykoldimethyläther, Dioxan und Tetrahydrofuran. Ein besonders bevorzugtes Kondensationsmittel ist 1,1'-Carboxyldimidazol. Ein besonders bevorzugtes inertes organisches Lösungsmittel ist Tetrahydrofuran.

Die Temperatur der Aminierung ist nicht besonders kritisch. Die Reaktion kann bei einer Temperatur zwischen etwa 0 °C und dem Siedepunkt des Lösungsmittels, besonders bevorzugt bei etwa 25 °C, durchgeführt werden.

Die Ausgangscarbonsäuren können auf für den Fachmann übliche Weise hergestellt werden, z.B. durch reduktive Alkylierung von Barbitursäure mit einem Aldehyd- oder Ketoester, gefolgt von einer Alkylierung und Verseifung der erhaltenen 5,5-disubstituierten Barbitursäure.

Die reduktive Alkylierung wird durchgeführt, indem man Barbitursäure und einen Aldehyd- oder Ketoester wie Äthylformylacetat, Äthylacetacetat oder Äthyllaevulinat mit Wasserstoff in Gegenwart eines metallischen Hydrierungskatalysators behandelt, um eine 5-monosubstituierte Barbitursäure zu erhalten. Geeignete metallische Katalysatoren sind Nickel und Edelmetalle wie Platin, Palladium, Rhodium, Ruthenium usw. In der Regel werden die Katalysatoren in fein zerteilter Form benutzt und können entweder frei oder auf einem geeigneten inertem Träger wie Kohle, Aluminiumoxyd, Kieselsäure oder Calciumcarbonat, aufgetragen sein. Ein besonders bevorzugter Katalysator ist 10% Palladium auf Kohle.

Als Lösungsmittel für die reduktive Alkylierung können Alkohole wie Methanol, Äthanol oder 2-Propanol sowie Ester wie Äthylacetat erwähnt werden.

Obwohl die reduktive Alkylierung innerhalb eines breiten Bereichs an Temperaturen und Drucken, von ungefähr Raumtemperatur bis ungefähr 150 °C und ungefähr Atmosphärendruck bis ungefähr 670 bar, durchgeführt werden kann, werden vorzugsweise eine Reaktionstemperatur zwischen ungefähr 90 und 100 °C und ein Druck von ungefähr 47 bar verwendet.

Der Alkylierungsschritt wird durchgeführt, indem man die mono-substituierte Barbitursäure mit einem Alkylierungsmittel wie Methylhalogenid, Propylhalogenid, Allylhalogenid, Hexylhalogenid, Cyclohexenylhalogenid und dergleichen in einem geeigneten inertem Lösungsmittel in Anwesenheit einer Base behandelt, um eine 5,5-disubstituierte Barbitursäure zu erhalten. Geeignete Lösungsmittel umfassen unter anderem Alkohole wie Methanol, Äthanol oder 2-Propanol, Wasser und Mischungen von Wasser und Alkoholen. Geeignete Basen sind Alkalimetall- und Erdalkalimetallhydroxide, wie Natrium-, Kalium- und Calciumhydroxid, und Alkalimetallalkoxide wie Natriummethoxid, Kaliumäthoxid und Kalium-tert.-butoxid. Eine be-

sonders bevorzugte Base ist eine 20%-ige wässrige Lösung von Natriumhydroxid. Die Alkylierung kann in einem Temperaturbereich von ungefähr 10 °C bis ungefähr 80 °C durchgeführt werden und erfolgt vorzugsweise zwischen 25 °C und 60 °C.

Der Verseifungsschritt wird durchgeführt, indem man die disubstituierte Barbitursäure mit einer wässrigen Säure wie Chlorwasserstoffsäure, Bromwasserstoffsäure oder verdünnter Schwefelsäure bei erhöhter Temperatur behandelt. Diese Umsetzung wird vorzugsweise mit einer normalen wässrigen Chlorwasserstoffsäure durchgeführt, wobei die Temperatur mit Vorteil die Rückflusstemperatur des Reaktionsgemisches ist.

Um das Diagnosereagens für das erfindungsgemäße immunologische Testsystem herzustellen, werden die Aminoarylester und die Amino-niederalkyl-amide von mit einer Carboxylgruppe substituierten Barbituraten kovalent mittels einer Amidbindung an ein Latexpolymeres, welches Carboxylreste enthält, gebunden.

Vorteilhafte Latexpolymeres für diesen Zweck sind carboxylierte Styrolbutadiene, carboxylierte Polystyrole, Acrylsäurepolymere und dergleichen. Unter den handelsüblichen Latexpolymeren, welche von den zuvor genannten Klassen umfasst werden, sind die Produkte mit den folgenden Warenbezeichnungen zu nennen:

Dow 421, Dow 816, Dow 620, Fluka 241, und Dow 241. Dow 1721, ein Latexpolymeres vom Polystyroltyp mit einer Teilchengröße von ungefähr 0,2 bis ungefähr 0,3 Mikron, mit etwa 8 bis 12% an Feststoffen und einem spezifischen Gewicht von etwa 1,02, kann ebenfalls verwendet werden.

Besonders bevorzugte Polymere sind carboxylierte Sytrolbutadiencopolymeren, vorzugsweise die Produkte mit der Warenbezeichnung Fluka 241 oder Dow 241. Geeignete Latexträgerteilchen werden im allgemeinen im Handel in Form einer wässrigen Latexsuspension angeliefert, üblicherweise in Konzentration von etwa 5 bis 60% Feststoffen. Diese Polymere sind in Wasser unlöslich, besitzen Teilchengrößen im Bereich von etwa 0,01 bis etwa 0,9 Mikron, vorzugsweise zwischen 0,1 und 0,3 Mikron, und haben ein spezifisches Gewicht in der Nähe von Wasser, so dass sie in wässriger Suspension bleiben können. Die Teilchen sollten eine ausreichende Oberflächenladungsdichte besitzen, so dass beim Kuppeln an die Aminoarylester und Amino-niederalkylamide ihre Abstossungskräfte ausreichend sind, um ein Zusammenklumpen oder eine Aggregation zu verhindern.

Die Aminoarylester und Amino-niederalkylamide werden mit den carboxylierten Latexpolymeren über eine Amidbindung gekuppelt, wobei dies durch die Anwesenheit eines in Wasser löslichen Carbodiimidkondensationsmittels initiiert wird. Der Kupplungsgrad hängt von der Dichte der reaktionsfähigen Gruppen in dem Polymeren ab. Die Dichte der reaktionsfähigen Gruppen ist nicht von Bedeutung, sofern eine ausreichende Anzahl von reaktionsfähigen Gruppen vorliegt, um das Kuppeln einer ausreichenden Menge von Barbiturateinheiten zu ermöglichen, die in einem diagnostischen Test brauchbar sind. Jedoch sollte eine geeignete Dichte im Bereich von etwa 1 bis 5 Gew.-% und vorzugsweise bei etwa 3 Gew.-% liegen. Die Kupplungsreaktion mit Carbodiimiden ist im einzelnen in der US-PS 3 857 931 beschrieben.

Wenn das an Latex gekuppelte Produkt einmal gebildet ist, kann es in spezifischen, diagnostischen Untersuchungen zum Nachweis von Barbituraten verwendet werden. Es kann in jeder beliebigen, geeigneten Konzentration in Abhängigkeit von dem spezifischen Test und den spezifischen, hierzu verwendeten Proben benutzt werden. Jedoch sind Konzentrationen von etwa 0,1 bis 2 Gew.-% an Latexfeststoffen vorteilhaft, und die bevorzugten Konzentrationen betragen von etwa 0,3 bis etwa 1,5 Gew.-%.

Bei einem typischen Test wird eine abgemessene Menge von Antiserum gegen Barbiturate mit einer von Barbituraten freien Körperflüssigkeit, z.B. mit Serum, Speichel oder Urin, ver-

mischt. Dann wird eine gemessene Menge des mit Aminoaryl- oder Amino-nieder-alkylbarbiturat gekuppelten Latex hinzugesetzt, und das Gemisch wird bei einer leicht erhöhten Temperatur, z.B. 37 °C, weiter für eine Zeitspanne, z.B. von etwa 1 bis etwa 3 Stunden, vorzugsweise für etwa 2 Stunden, inkubiert. Der pH-Wert des Testgemisches liegt vorteilhafterweise im Bereich von etwa pH = 5,0 bis 8,0 und besonders bevorzugt von etwa 6,5 bis 7,5. Nach dem Inkubieren wird das Ausflocken oder die Agglutination der Latexteilchen beobachtet. Die Konzentration und Menge sowohl des Antiserums als auch des Latexkomplexes werden eingestellt, um eine starke Ausflockung herbeizuführen, und die minimalen Konzentrationen an beiden Reagentien, welche eine starke Ausflockung herbeiführen, werden bestimmt. Die Mischung des Antiserums gegen Barbiturate mit einer von Barbituraten freien Körperflüssigkeit kann bei leicht erhöhter Temperatur, z.B. 37 °C, vor Zusatz des mit Aminoaryl- oder Amino-niederalkylbarbiturat gekuppelten Latex inkubiert werden.

Die Antiseren, welche bei dem diagnostischen Test verwendet werden können, sind Antiseren, welche für Barbiturate wie Secobarbital und Pentobarbital spezifisch sind. Die Herstellung solcher Antiseren ist in der US-PS 3 766 162 und in Science 174, 1037 (1971) beschrieben.

Nachdem das Kontrollsysteem, wie zuvor beschrieben, angesetzt wurde, werden verschiedene Mengen an Barbituraten, z.B. Secobarbital, Pentobarbital, Butabarbital, Amobarbital, Phenobarbital und Barbital, in einer von Barbituraten freien Körperflüssigkeit aufgelöst. Die minimale Menge an Barbiturat, welche zur Inhibierung der Ausflockung erforderlich ist, wird aufgezeichnet. Diese Menge hängt sowohl von der Konzentration als auch von der Menge an zugesetzter Körperflüssigkeit ab, fernerhin von der Konzentration und der Stärke des bei diesem Test verwendeten Antiserums.

Bei einem bevorzugten Test werden die Mengen und Konzentrationen derart eingestellt, dass annähernd 400 bis 500 µl Serum oder Urin, welche zwischen etwa 100 und 200 ng (Nanogramm) Barbiturat pro ml (Gesamtmenge zwischen 20 und 40 ng Barbiturat) enthalten, gerade ausreichen, um die Ausflockung zu inhibieren. Sobald der Test einmal mit einer Art von Körperflüssigkeit standardisiert wurde, z.B. mit Urin, kann eine andere Art von Körperflüssigkeit, z.B. Serum, hierfür nicht genommen werden, und hierzu muss ein getrennter Test angesetzt werden.

Da das Auftreten eines Agglutinates leicht mit dem blassen Auge beobachtet wird, dient der Test unter Anwendung des erfundungsgemäßen Testsystems als eine extrem empfindliche Untersuchungsmethode zum Nachweis von Barbituraten, wie Secobarbital, Pentobarbital, Butabarbital, Amobarbital, Phenobarbital und Barbital. Falls daher der Test einmal, wie zuvor beschrieben, standardisiert wurde, kann die Anwesenheit von Nanogramm-Mengen von diesen Barbituraten in Körperflüssigkeiten in einfacher Weise durch Feststellung der Inhibierung der Ausflockung, welche durch die Anwesenheit solcher Barbiturate in der Körperflüssigkeit hervorgerufen wird, nachgewiesen werden, im Vergleich zu der Ausflockung, welche sich ergibt, wenn eine an Barbiturat freie Körperflüssigkeit eingesetzt wird.

Der Test kann so standardisiert werden, dass ein medizinisch und statistisch einwandfreier Grenzpunkt erhalten wird. So bewirken Mengen an Barbituraten in einer Körperflüssigkeit, die grösser als diese Menge ist, eine Inhibierung der Ausflockung (ein positiver Test für die Anwesenheit einer solchen Droge in der Körperflüssigkeit). Mengen, die geringer als diese Menge sind, inhibieren die Ausflockung nicht (negativer Test).

Die oben beschriebenen Reagentien können in geeigneter Weise für kommerzielle Zwecke abgepackt werden, z.B. in einem diagnostischen Reagensatz, welcher zwei getrennte Behälter enthält, davon einer mit dem Antiserum gegen Barbiturate und der andere mit den Aminoarylestern oder den Amino-nie-

deralkylamiden von mit einer Carboxylgruppe substituierten Barbituraten, wobei diese über eine Amidbindung an Carboxylreste aufweisende Latexteilchen gebunden sind; letztere besonders bevorzugt in wässriger Suspension.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Vorschriften und Beispiele näher erläutert.

Vorschrift 1

a) Eine Mischung von 200 g Barbitursäure, 215 g Äthylacetatoacetat, 10 g 10% Pd-C und 400 ml Methanol wird in einem 2 l-Reaktionskolben aus Glas eingeführt und bei 90 bis 100 °C und 48 Atmosphären während 20 Stunden hydriert. Nach Zugabe von 2 l Wasser wird die Suspension erhitzt, bis alles in Lösung gegangen ist. Der Katalysator wird abfiltriert und das Filtrat über Nacht abgekühlt. Die Kristalle werden gesammelt und ergeben 209 g 5-(1-Methyl-2-äthoxycarbonyl-äthyl)barbitursäure vom Fp. 160–162 °C. Die Mutterlauge wird im Vakuum eingedampft und der Rückstand wird unter Röhren in einem kleinen Volumen kochendem Äthylacetat suspendiert. Die Lösung wird auf Raumtemperatur abgekühlt und die nicht umgesetzte Barbitursäure wird gesammelt. Aus dem Filtrat erhält man zusätzlich 65,2 g Ester vom Fp. 160–162 °C. (Gesamte Ausbeute 87,6%).

b) In einem 1 l-Dreihalskolben mit Rührer, Rückfluss- und Tropftrichter werden 100 g 5-(1-Methyl-2-äthoxy-carbonyl-äthyl)barbitursäure, 100 mg Calciumsulfat, 50 mg Kupferstaub und 500 ml Wasser eingegeben. Die Mischung wird während 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, und 53,6 g Allylbromid werden in einer Portion zugegeben. Anschliessend werden tropfenweise 125 ml einer 20%-igen Lösung von Natriumhydroxid während 45 Minuten bei 50 bis 55 °C zugesetzt. Nach Röhren bei 50 bis 55 °C während 3 Stunden wird das Reaktionsgemisch auf 30 °C abgekühlt, und es werden zusätzlich 26,8 g Allylbromid in einer Portion zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wird während 90 Minuten unter Röhren erhitzt und eine 20%-ige Lösung (65–70 ml) von Natriumhydroxid wird so zugegeben, dass das Reaktionsgemisch immer leicht alkalisch ist. Die Mischung wird auf Raumtemperatur abgekühlt. Der pH-Wert der Mischung wird durch Zusatz von 20%-iger Natronlauge auf ungefähr 9 eingestellt, und die Mischung wird mit viermal 250 ml Äthylacetat extrahiert. Die kombinierten Äthylacetatextrakte werden mit viermal 300 ml einer 1%-igen Natriumhydroxidlösung nochmals extrahiert und die wässrigen Extrakte werden einer Mischung von 500 g Eis und 300 ml 6N HCl zugegeben. Man lässt über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Der gebildete Niederschlag wird gesammelt und ergibt 91,0 g (78%) 5-Allyl-5-(1-methyl-2-äthoxycarbonyl-äthyl)barbitursäure vom Fp. 112–114 °C.

c) Eine Mischung von 50 g 5-Allyl-5-(1-methyl-2-äthoxycarbonyl-äthyl)barbitursäure und 400 ml 1N HCl wird während 4 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wird über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Der gebildete Niederschlag wird gesammelt und ergibt 42,5 g (94%) 5-Allyl-5-(1-methyl-2-carboxy-äthyl)barbitursäure vom Fp. 202–203 °C.

d) Eine Lösung von 2,19 g Chlorameisensäureäthylester in 90 ml Chloroform wird einer Lösung von 5,08 g 5-Allyl-5-(1-methyl-2-carboxy-äthyl)barbitursäure und 2,02 g Triäthylamin in 100 ml Dichlormethan (auf 0 bis 5 °C abgekühlt) zugegeben.

Die Mischung wird während 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. 3,06 g p-Nitrophenol werden zugesetzt und die Mischung wird während 14 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit einer gesättigten Natriumcarbonatlösung (3 × 25 ml) und Wasser bis zur Neutralität gewaschen, über wasserfreiem Calciumsulfat getrocknet und filtriert. Die Eindampfung des Filtrates unter reduziertem Druck ergibt 4,7 g eines Öls. Die Kristallisation aus einer Mischung von Äther und Heptan (1:1) liefert 2,2 g 5-Allyl-5-[1-methyl-2-(p-

nitrophenyloxy-carbonyl)-äthyl] barbitursäure vom Fp. 140–141 °C.

e) Eine Lösung von 750 g 5-Allyl-5-[1-methyl-2-(p-nitrophenyloxycarbonyl)-äthyl] barbitursäure in 15 ml Äthanol enthaltend 100 mg 10% Palladium auf Kohle als Katalysator wird bei Raumtemperatur und Atmosphärendruck einer Hydrierung unterworfen. Nach 1 Stunde ist die erforderliche Menge (180 ml) Wasserstoff aufgenommen worden. Das Reaktionsgemisch wird über Celit filtriert und das Filtrat zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird über 13 g Silicagel mit Äthylacetat als Elutionsmittel chromatographiert. Die Fraktionen, welche das gewünschte Produkt enthalten, werden eingedampft. Der zurückbleibende Feststoff wird in Chloroform/Äther umkristallisiert und ergibt 620 mg (89%) 5-Propyl-5-[1-methyl-2-(p-aminophenyloxycarbonyl)-äthyl] barbitursäure vom Fp. 212–215 °C.

Vorschrift 2

Eine Mischung von 2,5 g 5-Allyl-5-[1-methyl-2-carboxy-äthyl]barbitursäure, 1,95 g 1,1'-Carbonyldiimidazol und 100 ml Tetrahydrofuran wird unter Stickstoff bei Raumtemperatur während 3 Stunden gerührt. Der Lösung werden 4,5 g 1,4-Diaminobutan zugegeben und die Mischung wird über Nacht gerührt. Die gummiartigen Feststoffe werden dekantiert und in heissem Tetrahydrofuran suspendiert. Das kristalline Material wird gesammelt und ergibt 5-Allyl-5-[1-methyl-2-(4-aminobutyl-aminocarbonyl)-äthyl] barbitursäure vom Fp. 160–165 °C. Eine in Äthanol umkristallisierte Probe schmilzt bei 170 °C.

5-Allyl-5-[1-methyl-2-(3-aminopropyl-aminocarbonyl)-äthyl] barbitursäure wird analog aus 2,5 g 5-Allyl-5-(1-methyl-2-carboxy-äthyl)barbitursäure, 2 g 1,1'-Carbonyldiimidazol, 100 ml Tetrahydrofuran und 4 g 1,3-Diaminopropan hergestellt. Das Produkt schmilzt bei 202–203 °C.

Beispiel 1

5-Allyl-5-[1-methyl-2-(4-aminobutylaminocarbonyl)-äthyl] barbitursäure wird mit einer Latexsuspension in Anwesenheit von 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholino-äthyl)-carbodiimid-metho-p-toluolsulfonat oder 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid umgesetzt. Der erhaltene Komplex wird durch wiederholte Sedimentation der festen Latexteilchen durch Zentrifugieren und erneutes Suspendieren in einem geeigneten Puffer gewaschen, bis keine freie Aminobutylbarbitursäure in der wässrigen Phase der Suspension übrigbleibt. Die Aminobutylbarbitursäure wird in einer Konzentration von 1 mg pro ml in destilliertem Wasser eingesetzt. Die Lösung wird auf pH = 5,0 eingestellt. Die Latexsuspension ist ein carboxyliertes Styrol-Butadien-Copolymeres (Warenbezeichnung Fluka, Nr. 241), welche gewaschen und dann in Wasser verdünnt wurde, so dass sie etwa 8% Latexfeststoffe enthält. Die Konzentration des verwendeten Carbodiimids beträgt 1 Gew.-%/Vol.-% in destilliertem Wasser. Das Reaktionsgemisch besteht aus dem folgenden Verhältnis von Reaktionsteilnehmern: 1 Volumen von 1%igem Carbodiimid, 1 Volumen von Aminobutylbarbitursäure und 3 Volumina von Latexpolymerensuspension. Die Reaktion wird bei Zimmertemperatur für 2 bis 16 Stunden unter dauerndem Rühren ablaufen gelassen. Der feste Polymerkomplex wird dann durch Zentrifugieren sedimentiert, mit Wasser gewaschen und erneut in 0,1 M Trissalzlösungspuffer mit pH = 7,3 bis zu einer Endkonzentration von 4 mg Feststoffe/ml suspendiert. In

der Kupplungsreaktion können Dow 816, Dow 421 und Dow 1721 an Stelle von Fluka 241, als Latex und Acetonitril als Lösungsmittel eingesetzt werden, wenn 5-Propyl-5-[1-methyl-2-(p-aminophenyloxycarbonyl)-äthyl] barbitursäure als Barbitursäurederivat verwendet wird.

Beispiel 2

Herstellung des Antiserums für den Test

Kaninchen-Antiserum gegen Barbiturate, welches entsprechend der Arbeitsweise in der US-PS 3 766 162 hergestellt wurde, wird in einem geeigneten Puffersystem verdünnt. Dieses Verdünnungsmittel besteht aus folgenden Stoffen in wässriger Lösung bei pH = 7,3:

- 15 1. 0,01% Thimersol
2. 1% Rinderalbuminserum
3. 0,01% EDTA (Äthylendiamintetraacetat in der Dinitratiumform)
4. Tris [0,1 molares Tris (hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid]
5. 0,85% Natriumchlorid

Testmethode

2 ml des verdünnten, wie oben hergestellten Antiserums wird in kleinen Reagensgläsern von 10 × 75 mm eingefüllt. Zu dieser Menge werden 400–500 µl von an Barbitursäure freiem Urin zugesetzt. Die beiden Flüssigkeiten werden miteinander vermischt und bei 37 °C für 10 Minuten inkubieren gelassen. Dann werden 10 µl von verdünnter, wässriger 5-Allyl-5-[1-methyl-2-(4-aminobutylaminocarbonyl)-äthyl] barbitursäure-Latexsuspension, welche annähernd 0,3 Gew.-% Latexfeststoffe enthält, hinzugesetzt und mit dem Antiserum und dem Urin vermischt. Die Reagenzgläser werden dann in ein Wasserbad oder einen Heizblock von 37 °C eingesetzt, so dass etwa 1,5 cm ³⁵ der Flüssigkeitssäule im Reagenzglas sich unter Wasser oder innerhalb des Metallblockes befindet. Das Aussehen der Flüssigkeit in den Röhrchen ist durchscheinend, trübe oder schwach milchig. Für negative Proben sind während der ersten Stunde feine Flocken in dem Reagenzglas sichtbar. Grosse, leicht sichtbare Flocken werden während der zweiten Inkubationsstunde sichtbar, und sie neigen zum Absetzen, wodurch die Flüssigkeit zunehmend klarer und transparenter wird.

Die Verdünnung eines besonderen Antiserums, welches für das Testsystem ausgewählt wird, ist so, dass die höchste Verdünnung dennoch ein starkes Ausflocken nach 2 Stunden, wie zuvor beschrieben, ergibt. Wenn unterschiedliche Mengen an Barbitursäure in einem von Barbitursäure freien, normalen Urin aufgelöst werden, und anstelle des von Barbitursäure freien Urins in den Testsystemen verwendet werden, tritt keine Ausflockung ⁴⁵ auf. Die erforderliche Barbitursäuremenge zur Hemmung der Ausflockung variiert üblicherweise von 100 ng pro ml oder grösser, in Abhängigkeit von der angewandten Antiserumkonzentration und der Stärke des in dem Spendertier erzeugten Antiserums. Ebenfalls ist sie von der Menge an zugesetzter Körperfüssigkeit abhängig. So reichen für das oben beschriebene System 400–500 µl Urin, welche 200–300 ng Barbiturat/ml enthalten, gerade aus, um das Ausflocken zu verhindern. 100 µl Urin, welche 800–1000 ng/ml enthalten, oder 50 µl Urin, welche 1600–2000 ng/ml enthalten, zeigen dasselbe Verhalten.