

(19) DANMARK



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 144443 B



- (21) Ansøgning nr. 1032/76 (51) Int.Cl.³ G 01 N 33/68
(22) Indleveringsdag 10. mar. 1976 // C 09 B 11/08
(24) Løbedag 10. mar. 1976
(41) Alm. tilgængelig 13. sep. 1976
(44) Fremlagt 8. mar. 1982
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. -
(30) Prioritet 12. mar. 1975, 2510633, DE

(71) Ansøger BOEHRINGER MANNHEIM GMBH, Mannheim-Waldhof, DE.

(72) Opfinder Walter Rittersdorf, DE: Werner Guethlein, DE: Wolfgang
Werner, DE: Hans-Georg Rey, DE: Peter Rieckmann, DE.

(74) Fuldmægtig Firmaet Chas. Hude.

(54) Diagnostisk middel til påvisning

af æggehvide i legemsvæsker og
fremgangsmåde til fremstilling
af midlet.

Påvisningen af æggehvide i legemsvæsker, specielt i urin, indtager en fremtrædende plads i diagnostikken af nyrelidelser. Hurtigdiagnostica til påvisning og til bestemmelse af æggehvidestoffer i urin har derfor allerede været udviklet i længere tid. Det drejer sig herved for det meste om testpapir, som er imprægneret med et pufferstof og en såkaldt æggehvidefejlindikator. Æggehvidefejlindikatorer er pH-indikatorer, hvis pK-værdi forskydes ved nærværelse af æggehvide. Alt efter, i hvilken retning pK-værdien forskydes ved hjælp af æggehvide, skal pufferen indstille en pH-værdi, som ligger over eller under pK-værdien, fortrinsvis netop uden for indikatorens farveomslagsinterval. Sådanne indikatorer, som ved neddykning i æggehvidefri urin foreligger i den mindst farvede form, foretrækkes, således at nærværelsen af æggehvide fører til et mere eller mindre fuldstændigt omslag af indikatoren til den stærkere farvede form, og således fører til et følsomt farveomslag. De kendteste af disse æggehvidefejlindikatorer er tetrabromphenolphthaleinethylester og tetrabromphenolblå (octabrom=

DK 144443 B

phenolsulfophthalein). I litteraturen er der beskrevet en hel række af sådanne æggehvide testpapir, som for det meste kun adskiller sig med hensyn til anvendelsen af tilsætningsstoffer, som anioniske befugtningsmidler, farvestoffer, uorganiske sulfater og lignende og i almindelighed tillader en følsom æggehvidepåvisning.

Alle kendte testpapir har dog den tungtvejende ulempe, at de reagerer med metabolitterne af hyppigt i urinen forekommende lægemidler, som f.eks. kinin, chinidin, resorcin og andre nitrogenholdige forbindelser på samme måde som med æggehvide.

Formålet med denne opfindelse var derfor at fremstille testpapir, ved hvilke forstyrrelsen på grund af disse nitrogenholdige forbindelser ikke forekommer eller er ubetydelig, uden at følsomheden med hensyn til påvisning af æggehvide er forringet i sammenligning med kendte testpapirer.

Opgaven løses ved hjælp af et diagnostisk middel til påvisning af æggehvide i legemsvæsker bestående af en sugedygtig bærer, der er imprægneret med en pH-indikator med æggehvidefejl og et egnet pufferstof, kendetegnet ved, at indikatoren er valgt fra octahalogensulfophthaleingruppen og indeholder mindst én med vand ikke blandbar lineær eller forgrenet polypropylenglycol, som også yderligere kan indeholde andre lavere oxyalkylengrupper.

Som sugedygtige bærere kommer specielt filterpapir, men også uvævet materiale, asbest og lignende på tale.

Polypropylenglycoler af den nævnte art er frem for alt de lineære polypropylenglycoler, desuden blokpolymerisater af propylenoxid og ethylenoxid samt forgrenede forbindelser, hvorved propylenoxid er polymeriseret til polyvalente alkoholer, som f.eks. trimethylolpropanglycerol eller pentaerythrit, og som eventuelt yderligere er modificeret med ethylenoxid. Disse polypropylenglycoler skal have en molekylvægt på ca. 500-10.000.

Polypropylenglycoler af denne art kendes i og for sig og anvendes på en række forskellige måder i teknikken, f.eks. som smøremiddel, hydrauliske væsker, opløsningsmiddel, råstoffer for polyurethaner, befugtningsmidler og meget andet.

Deres virkning ifølge opfindelsen kunne ikke forudses og er også højst overraskende, thi de vandopløselige eksempler fra denne gruppe, som f.eks. polypropylenglycol med molekylvægt på ca. 400 eller rene polyethylenglycoler, virker ikke på den ønskede måde.

Det er bemærkelsesværdigt, at testpapir med de ønskede egenskaber ved hjælp af polypropylenglycolerne ifølge opfindelsen kun kan fremstilles med æggehvidefejlindikatorer af gruppen octahalogensulfophthaleiner. Med andre ellers anvendelige æggehvidefejlindikatorer, f.eks. med tetrabromphenolphthaleinethylester, fås testpapir, som ganske vist ikke reagerer med nitrogenbaser, men hvormed reaktionen med æggehvide er afsvækket lige så kraftigt. Som indikator kommer følgende på tale:

Octabromphenolsulfophthalein (tetrabromphenolblåt), octachlorphenolsulfophthalein (tetrachlorphenolblåt) samt de blandet halogenerede eksempler, f.eks. 3', 3'', 5', 5''-tetrabromphenol-3,4,5,6-tetrachlor-sulfophthalein, 3', 3'', 5', 5''-tetrachlorphenol-3,4,5,6-tetrabrom-sulfophthalein og 3', 3''-dichlor-5', 5''-dibromphenol-3,4,5,6-tetrachlorsulfophthalein.

Medens de første tre forbindelser kendes i litteraturen, er de øvrige indikatorer nye. De kan dog fremstilles ifølge kendte metoder, f.eks. ved omsætning af de kendte tetrahalogenbenzensulfocarbonanhydrider med phenol eller 2-halogenphenoler i nærværelse af Lewis-syre, f.eks. tin-IV-chlorid, og chlorering eller bromering af de resulterende phenolsulfophthaleiner i inaktive opløsningsmidler, henholdsvis med chlor eller brom i iseddike.

Særligt foretrukne er indikatorerne, som har fire chloratomer i 3', 3'', 5', 5''-stillingen, da forstyrrelsen af nitrogenbaser herved er endnu svagere end ved de tilsvarende bromerede forbindelser.

Æggehvidetestpapir behøver en stærk puffer, som holder pH-værdien konstant også ved neddykning i legemsvæsken, som muligvis har en anden pH-værdi, således at et indikatoromslag entydigt beror på en pK-værdiforskydning på grund af æggehvide og ikke på en pH-værdiændring. I almindelighed bliver ved sulfophthaleinindikatorer pufferen indstillet på en pH-værdi, som ligger noget under indikatorens pH-omslagsinterval, således at indikatoren foreligger fuldstændig i den

mindre farvede sure form. Bedre følsomhed over for meget små æggehvidekoncentrationer får man imidlertid, når man lægger pufferens pH-værdi i indikatorens omslagsinterval. Dette medfører imidlertid, at efter neddykning i urin er en del af indikatoren allerede slået om, og den negative farvning kan vanskeligere skelnes fra en ringe æggehvidefarvning.

Det er nu en yderligere uventet egenskab hos polypropylenglycolerne ifølge opfindelsen, at de trænger dette begyndende indikatoromslag tilbage, uden at følsomheden over for æggehvide påvirkes væsentligt.

Med en indikator "omslagsinterval" forstås i almindelighed pH-området mellem en enhed over og en enhed under pK-værdien i rent vand. Til æggehvidetestpapir ifølge opfindelsen vælges hensigtsmæssigt pH-værdier, som ligger ca. 1,0 enheder under indtil ca. 0,5 enheder over de anvendte indikatorers pK-værdi. Da disse ligger i nærheden af 3,5-4,0, ligger det anvendelige pH-område fra ca. pH 2,5 til ca. pH 4,5. Ved lavere værdier indtræder i almindelighed en afsvækkelse af æggehvide-reaktionen, ved højere en forstærkelse af reaktionen med nitrogenbaserne og med normalurin. Den foretrukne pH-værdi afhænger ud over af indikatoren af arten af propylenglycolerne ifølge opfindelsen og de øvrige reagenser og kan let bestemmes ved hjælp af simple forsøgsrækker, hvorved pH-værdi og puffermængde varieres således, at indikatoren efter neddykning i æggehvidefri urin netop endnu udviser den rene "sure" farve.

Som puffer kommer alle sådanne på tale, som i nævnte område besidder en god pufferkapacitet, altså f.eks. blandinger af citronsyre, æblesyre, vinsyre og andre med deres alkali- eller ammoniumsalte.

Selv om polypropylenglycolerne ifølge opfindelsen f.eks. har overfladeaktive egenskaber, kan det dog være hensigtsmæssigt på grund af den bedre fordeling at tilsætte yderligere sædvanlige tensider. Her kommer frem for alt på tale ikke-ionogene befugtningsmidler, specielt ethoxylerede fedtalkoholer og phenoler med 1-4 oxyethylengrupper. Anioniske befugtningsmidler forstærker reaktionen med nitrogenbaserne, medens kationiske tensider bevirker en kraftig, falsk positiv indikatorreaktion, såfremt der ikke arbejdes med meget sure puffere, som hæmmer æggehvidereaktionen. Disse to tensidklasser er derfor uegnede.

Man kan naturligvis også tilføje opkvædningsmidler eller fortykkesmidler, som kan forhale udtrækningen af reagenserne fra det befugtede testpapir, hvorved man i givet fald må prøve, om disse kan forliges med pufferstofferne. F.eks. hydroxyethyl- og hydroxypropylcellulose har vist sig anvendelige.

Desuden kan reagenserne tilsættes yderligere kompleksdannende stoffer, specielt magnesiumsulfat.

Polypropylenglycolerne ifølge opfindelsen samt de øvrige bestanddele anvendes i følgende mængder beregnet på 100 ml opløsning til imprægnering:

0,5 - 5 g, fortrinsvis 1 - 2 g polypropylenglycoler ifølge opfindelsen,

10 - 30 g, fortrinsvis 15 - 20 g puffer,

0,02 - 0,2 g, fortrinsvis 0,05 - 0,1 g indikator,

0,0 - 1,0 g, fortrinsvis 0,2 - 0,5 g overfladeaktivt hjælpemiddel.

Som opløsningsmiddel for bestanddelene kommer blandinger af vand og lavere alkoholer på tale, hvori alle bestanddelene er opløselige. Man kan imidlertid også først forimprægnere pufferen fra vand og derpå efterimprægnere de øvrige bestanddele fra organisk opløsning.

Det færdige testpapir kan anvendes som sådant eller fastgjort på i og for sig kendt måde til greb eller fortrinsvis fastgjort mellem formstoffer og finmasket netværk. Fremstillingen af hidtil ukendte udgangsforbindelser til brug for den foreliggende opfindelse belyses i de efterfølgende fremstillingspunkter 1-4.

Opfindelsen skal nærmere belyses i de følgende eksempler, hvorved effektiviteten over for indvirkningen af nitrogenbaser illustreres derved, at den mængde kinin angives, hvis farvning tilsyneladende tyder på et indhold af 5 mg % albumin (øvre grænse for den normale udskilning). Jo større altså denne mængde er, desto mindre bliver testen forstyrret på grund af kinin. Forstyrrelsen på grund af andre nitrogenbaser, som f.eks. chinidin, resorcin, benzylamin og andre er af samme størrelsesorden som for kinin.

Fremstillingsmetode 1.3',3"-dichlorphenol-3,4,5,6-tetrachlorsulfophthalein

25,7 g (0,2 mol) o-chlorphenol blandes med 45 g (0,14 mol) tetrachloro-sulfobenzoesyreanhydrid, tilsættes 9 ml = 20,4 g tin-IV-chlorid og opvarmes under omrøring på oliebad til 120 - 130°C. Overskud af chlorphenol fjernes derpå med vanddamp, og resten renses ved opløsning flere gange i 4 N natriumcarbonatopløsning og udfældning med saltsyre og omkrystalliseres til slut fra iseddike. Der fås 5,3 g = 47% rosa-farvet 3',3"-dichlorphenol-3,4,5,6-tetrachlorsulfophthalein, som indeholder 1 mol eddikesyre, smeltepunkt 244 - 245°C (molvægt: $C_{19}H_8Cl_6O_5S$, $C_2H_4O_2 = 621,13$).

På samme måde fås ved anvendelse af o-bromphenol 3',3"-dibromphenol-3,4,5,6-tetrachlorsulfophthalein, som efter omkrystallisation fra iseddike ligeledes krystalliserer med 1 mol eddikesyre, smeltepunkt 172 - 173°C.

Fremstillingsmetode 2.3',3"-dibromphenol-3,4,5,6-tetrachlorsulfophthalein.

4,9 g (0,01 mol) phenol-3,4,5,6-tetrachlorsulfophthalein opløses i 50 ml iseddike, og ved 20°C tildryppes under omrøring en opløsning af 1,1 ml = 3,37 g brom (0,04 g atom) i 50 ml iseddike. Der efterrøres i 3 timer, de dannede krystaller suges fra og omkrystalliseres fra iseddike. Der fås 3,9 g = 55% 3',3"-dibromphenol-3,4,5,6-tetrachlor-sulfophthalein, smeltepunkt 173 - 174°C. Forbindelsen indeholder 1 mol krystaleddikesyre (molvægt: $C_{19}H_8Br_2Cl_4O_5S$, $C_2H_4O_2 = 710,05$).

Fremstillingsmetode 3.3',3"-dibrom-5',5"-dichlorphenol-3,4,5,6-tetrachlorsulfophthalein.

3,55 g (0,005 mol) 3',3"-dibromphenol-3,4,5,6-tetrachlorsulfophthalein suspenderes i 50 ml iseddike. Hertil sættes langsomt under omrøring en opløsning af 0,94 g (0,025 g-atom) chlor i 50 ml iseddike. Efter flere timers omrøring fås 3,8 g = 90,5% farveløse krystaller af 3',3"-

dibrom-5',5"-dichlorphenol-3,4,5,6-tetrachlorsulfophthalein, smeltepunkt 265 - 268°C. Forbindelsen krystalliserer med 2 mol eddikesyre (molvægt: $C_{19}H_6Br_2Cl_6O_5S$, $2 C_2H_4O_2 = 839,01$).

Det samme stof kan også fremstilles ved bromering af 3',3"-dichlorphenol-3,4,5,6-tetrachlorsulfophthalein (opnået ved chlorering af phenol-3,4,5,6-tetrachlorsulfophthalein (udbytte 60%).

Fremstillingsmetode 4.

3',3",5',5"-tetrachlorphenol-3,4,5,6-tetrabromsulfophthalein.

13,8 g (0,02 mol) phenol-3,4,5,6-tetrabromsulfophthalein suspenderes i 100 ml iseddike, og under omrøring tildryppes en opløsning af 3,6 g chlor (0,1 g-atom) i 30 ml iseddike ved stuetemperatur. Der efterrøres i flere timer, og de dannede beigefarvede krystaller suges fra. Efter omkrystallisation fra eddikesyre/vand 9:1 fås 11 g = 58,3% 3',3",5',5"-tetrachlorphenol-3,4,5,6-tetrabromsulfophthalein, farveløse krystaller, smeltepunkt 203 - 204°C (dekomponering).

Forbindelsen krystalliserer med 2 mol eddikesyre og 1 mol H_2O (molvægt: $C_{19}H_6Br_4Cl_4O_5S$, $2 CH_3COOH$, $H_2O = 945,9$).

På analog måde fås af phenol-3,4,5,6-tetrachlorsulfophthalein ved chlorering i iseddike 3',3",5',5"-tetrachlorphenol-3,4,5,6-tetrachlorsulfophthalein, smeltepunkt 277-278°C. Forbindelsen krystalliserer med 1 mol eddikesyre (molvægt: $C_{19}H_6Cl_8O_5S$, $C_2H_4O_2 = 690$).

Eksempel 1

Filtrerpapir (Schleicher & Schüll 2316) imprægneres efter hinanden med følgende 2 opløsninger og tørres hver gang ved 60°C:

Opløsning 1

Citronsyre, monohydrat	20 g
Ammoniak, 25%ig vandig opløsning	ca. 10 ml
Vand, destilleret	til 100 ml

Opløsningen indstilles på en pH-værdi på 4,1.

Opløsning 2

3',3'',5',5''-tetrachlorphenol-3,4,5,6-tetrabrom= sulfophthalein (pK = 3,9)	50 mg
Polypropylenglycol, gennemsnitlig molekylvægt 1200 (polyglycol P 1200 (R))	2 g
Methanol	til 100 ml

Testpapiret reagerer gult med normalurin og med albuminholdig urin med grønne til blågrønne farvninger af voksende intensitet.

Urin med et kininindhold på ca. 100 mg % giver den samme grønfarvning som urin med 5 mg % albumin.

Et testpapir med den samme sammensætning men uden polypropylenglycol reagerer grønt med normalurin. Grønfarvningen af 5 mg % albumin kan ikke adskilles sikkert fra denne negativfarvning. Derfor sammenlignes med reaktionen af 25 mg % albumin: allerede ca. 25 mg % kinin tyder på denne æggehvidemængde.

Ved sædvanlige i handelen værende hurtigttests tyder 2-5 mg % kinin tilsyneladende allerede på nærværelsen af 5 mg % albumin.

Eksempel 2

Filtrerpapir (Schleicher & Schüll 2316) gennemvædes efter hinanden med følgende to opløsninger og tørres ved 60°C.

Opløsning 1

Citronsyre, monohydrat	20 g
Ammoniak, 25%ig vandig opløsning	ca. 6 ml
Vand, destilleret	til 100 ml

Opløsningens pH-værdi indstilles på 3,1.

Opløsning 2

3',3'',5',5'',3,4,5,6-octabromphenolsulfophthalein (tetrabromphenolblå, pK = 3,6)	50 mg
Polypropylenglycol, gennemsnitlig molekylvægt 2000 (polyglycol P 2000 (R))	1 g
Nonylphenol, forethret med 1-2 oxyethylenrester (Antarox CO 210 (R))	0,4 g
Methanol	til 100 ml

Man kan også anvende disse to opløsninger med den halve mængde opløsningsmiddel og blande før imprægneringen.

Testpapiret reagerer gult med normalurin og med albuminholdig urin med grønne farvninger af voksende intensitet.

Urin med et kininindhold på ca. 50 mg % giver den samme grønlig farvning som urin med 5 mg % albumin.

Et testpapir med den samme sammensætning, men uden polypropylenglycol, reagerer svagt grønlig med normalurin.

Ca. 10 mg % kinin tyder ved dette testpapir tilsyneladende på 5 mg % albumin.

Anvendes der i stedet for "nonylphenol, forethret med 1-2 oxyethylenrester (Antarox CO 210)" 0,4 g kokosalkohol, forethret med 2 oxyethylenrester (Genapol C 020 (R)) eller 0,2 g tributylphenol, forethret med 4 oxyethylenrester (Sapogenat T 040 (R)), fås praktisk taget identisk testpapir.

Eksempel 3

Filtrerpapir (Schleicher & Schüll 2316) forimprægneres med en 15%ig vandig opløsning af natriumdihydrogencitrat (pH-værdi 3,5) og tørres ved 60°C. Derefter efterimprægneres med opløsninger af følgende sammensætning, hvorefter der i hvert tilfælde blev tørret ved 60°C:

Tabel 1

Handelsnavn	Kemisk sammensætning (ifølge fabrikantens deklaration)	Gennemsnitlig molvægt	Hydroxyltal
Polyglycol P 4000 (R)	lineær polypropylenglycol	4000	
Desmophen 7200 (R)	forgrenet polypropylenglycol modificeret med ethylenoxid	3800	ca. 42
Desmophen 7100 (R)	forgrenet polypropylenglycol modificeret med ethylenoxid	3100	ca. 49
Desmophen 3800 (R)	del.forgrenet polypropylenglycol	3500	ca. 46
Desmophen 3400 (R)	forgrenet polypropylenglycol modificeret med ethylenoxid	3000	ca. 56
Pluracol TPE 6542 (R)	forgrenet polypropylenglycol på basis af trimethylolpropan modificeret med ethylenoxid	6300	ca. 27
Pluracol TP 2540 (R)	forgrenet polypropylenglycol på basis af trimethylolpropan	2600	ca. 64
Pluracol MK 73 (R)	forgrenet polypropylenglycol på basis af glycerol	3800	ca. 29
Pluracol MK 92 (R)	forgrenet polypropylenglycol på basis af trimethylolpropan	4500	ca. 37
Pluronic L 101 (R)	lineær polypropylenglycol, modificeret indtil 10% med ethylenoxid	3800	

- a) 3',3'',5',5'',3,4,5,6-octachlorphenolsulfophthalein 50 mg
 Polypropylenglycol ifølge tabel 1 1 g
 Methanol til 100 ml

Dette testpapirs egenskaber svarer i det væsentlige til det i eksempel 1 anførte.

- b) 3',3''-dibrom-5',5''-dichlorphenol-3,4,5,6-tetra-
 chlorsulfophthalein 50 mg
 Desmophen 7200 (R) 1 g
 Methanol til 100 ml

Dette testpapirs egenskaber svarer i det væsentlige til de i eksempel 2 anførte.

- c) 3',3'',5',5''-tetrabromphenol-3,4,5,6-tetra-
 chlorsulfophthalein 50 mg
 Desmophen 7200 (R) 1 g
 Methanol til 100 ml

Dette testpapirs egenskaber svarer i det væsentlige til det i eksempel 2 anførte.

Eksempel 4.

Filtrerpapir (Schleicher & Schüll 2316) imprægneres efter hinanden med følgende to opløsninger og tørres ved 60°C:

Opløsning 1

Æblesyre	15 g
6 N natriumhydroxid	ca. 16 ml
Hydroxyethylcellulose (Natrosol 250 G [®])	2 g
Vand, destilleret	til 100 ml

Opløsningens pH-værdi indstilles på 3,5.

Opløsning 2

Tetrabromphenolblåt	0,6 g
Polyglycol P 1200 [®]	3 g
Chloroform	til 100 ml

Dette testpapirs egenskaber svarer i det væsentlige til det i eksempel 2 anførte.

P a t e n t k r a v .

1. Diagnostisk middel til påvisning af æggehvide i legemsvæsker bestående af en sugedygtig bærer, der er imprægneret med en pH-indikator med æggehvidefejl og et egnet pufferstof, k e n d e t e g n e t ved, at indikatoren er valgt fra octahalogensulfophthaleingruppen og indeholder mindst én med vand ikke blandbar lineær eller forgrenet polypropylenglycol, som også yderligere kan indeholde andre lavere oxyalkylengrupper.
2. Diagnostisk middel ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at der heri desuden indgår egnede befugtningsmidler, kompleksdannende midler, opkvædningsmidler og/eller fortykkelsesmidler.
3. Fremgangsmåde til fremstilling af diagnostiske midler ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at den sugedygtige bærer først forimprægneres med pufferstoffet fra vand og derpå efterimprægneres med de øvrige substanser fra et organisk opløsningsmiddel.

Fremdragne publikationer:
