

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 801799 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **801799**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12Q

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **04.06.1980**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **04.06.1980**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **01.01.1981**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

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

13.07.1979 US 057525

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Seralen Diagnostics IWL. VA, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Huang, Cleo Le-O, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Lipaasin määrittämenetelmä ja reagenssi.

Bestämningmetod för lipas och reagens.

The Dow Chemical Company, 2030 Abbott Road, Midland, Michigan,
Yhdysvallat.

Lipaasin määritysmenetelmä ja reagenssi - Bestämningmetod
för lipas och reagens

Tämä keksintö koskee parannusta lipaasin määritysmenetelmän ja reagenssin suhteen, jonka Kurooka et al., U.S. patentti n:o 3 986 930 ja kurooka et al., J. Biochem. 81,361-369 (1977) sekä Kurooka, Japanese Patent Application n:o 5ho. 51-68343 ovat esittäneet. Tässä menetelmässä ja reagenssissa S-asyyli-yhdiste, kuten on kuvattu ylläesitettyissä viitteissä, on substraattina. Lipaasi, jota on biologisessa nestenäytteessä kuten seerumissa tai plasmassa, katalysoi S-asyyli-yhdisteen hydrolyysin vapauttaen sulfhydriyli-ryhmiä. Vapautuneet sulfhydriyli-ryhmät reagoivat väriä synnyttävän sulfhydriylireagenssin, kuten esim. 5,5'-di-tiobis(2-nitrobensoehapon) kanssa /"DTNB" Kurookan et al. lyhennämänä/, ja syntyvä väri mitataan, jolloin saadaan lipaasin aktiivisuus mitatuksi. Kurooka et al. ja Ellman, U.S. Patent n:o 3 119 668 ovat julkaisseet sopivia väriä antavia sulfhydriyli-reagensseja.

Kurooka-menetelmällä ja -reagenssilla on monia tavoiteltu-

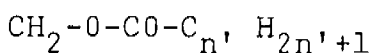
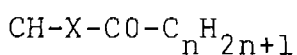
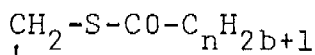
ja ominaisuuksia. Kuitenkin, kuten on tuotu esiin Kurookan japanilaisessa patenttihakemuksessa, siltä puuttuu herkkyyttä, jonka Kurooka lukee seerumin albumiinin aiheuttaman inhibition syyksi. Se on myös epäspesifinen lipaasin suhteen eikä välttämättä mittaa todellista lipaasi-aktiivisuutta. Lisäksi menetelmä edellyttää asetonin lisäystä proteiinin saostamiseksi ennen mittausta, mikä edellyttää sentrifugointia tai samankaltaista proteiinin poistovaihetta ennen mittausta.

On havaittu, että Kurooka et al. menetelmän ja reagenssin spesifisyyttä voidaan huomattavasti parantaa lisäämällä pseudokoliiniesteraasi-inhibiittoria, niin että muodostuva reagenssi ja menetelmä ovat spesifisempiä lipaasin suhteen. On edelleen havaittu, että menetelmän herkkyyttä voidaan parantaa liittämällä mukaan pieni määrä albumiinia. Koemenetelmää voidaan myös parantaa käyttämällä ei-ionista pinta-aktiivista ainetta päättämään inkubointi, ja väri voidaan mitata sitten suoraan, ilman sentrifugointia tai muita proteiinin poistovaiheita. On edelleen havaittu, että Kurooka et al. menetelmässä ja reagenssissa voidaan käyttää standardiliuoksina vesiliukoisia 5-(aminoalkyyli)-isotiorium-suoloja. Keksintöön kuuluu täten uusi, parannettu reagenssi, menetelmä ja määritykseen käytettävät koetarvikkeet.

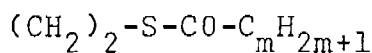
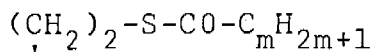
Reagenssiin, menetelmään ja keksinnön mukaiseen tarvikepakkaukseen sisältyy S-asyyli-yhdiste sekä väriä antava sulfhydriyli-reagenssi, ja siihen voi sisältyä myös karboksyyliesteri- ja ariyliesteraasi-inhibiittori kuten Kurooka ja Kurooka et al. ovat ilmaisseet. Voidaan käyttää samoja S-asyyli-yhdisteitä sekä väriä antavia sulfhydriylireagensseja, ja näitä termejä käytetään tässä hakemuksessa samassa merkityksessä kuin Kurooka et al. ovat käyttäneet U.S. Patent 3 986 930:ssa. Tällä hetkellä parempana pidetty S-asyyli-yhdiste on 2,3-dimerkaptopropan-1-olitributyraatti, lyhennetty "BALB":ksi Kurooka et al:n mukaan, ja sitä pidetään parempana myös tämän hakemuksen yhteydessä. Parempana pidetty väriä antava sulfhydriyli-reagenssi on "DTNB", 5,5'-ditriobis(2-nitrobentsoehappo), jota myös Kurooka et al. pitävät parempana. Ariyliesteraasin ja karboksyyliesteri- raasin parempana pidetty inhibiittori on fenyyliimetyylisulfonyy-

lifluoridi (lyhennetty "PMSF"), jota myös Kurooka et al. pitävät parempana.

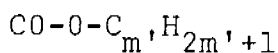
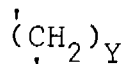
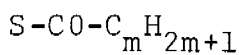
S-asyyli-yhdisteet vastaavat yhtä seuraavista kaavoista, jotka Kurooka et al. ovat esittäneet:



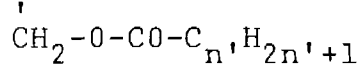
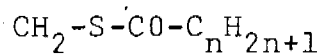
(I)



(II)



(III)



(IV)

jolloin n on kokonaisluku 2-4, n' on kokonaisluku 2-4 tai 9-19; m on kokonaisluku 3,7 tai 11; m' on kokonaisluku 1 tai 12; Y on kokonaisluku 1 tai 2; X on rikki- tai happiatomi; Y on rikki-atomi, happiatomi tai etyleeniryhmä; edellyttäen että, kun Y on 1, m' on 4 ja kun Y on 2, m' on 12.

On havaittu, että S-asyyli-yhdisteet ovat herkkiä biologisissa nesteissä, kuten ihmisen veriseerumissa esiintyvän pseudokoliiniesteraasin aiheuttamalle inhibitiolle. Seurauksena on, että väriä antavan sulfhydryyli-reagenssin kanssa tuotettu väri voi olla lisääntynyt, niin että saadaan vääriä, kohonneita lipaasi-tuloksia.

Kiinteä, vesiliukoinen pseudokoliiniesteraasi-inhibiittori voi olla mikä tahansa pseudokoliiniesteraasi-inhibiittori, joka on määrityksen kannalta hyväksyttävä; toisin sanoen, fyysikaalisesti sekä kemiallisesti kestävä ja vettä sisältävään inkubaatioseokseen liukoinen sekä kykenevä inhiboimaan biologisissa nesteissä esiintyvän pseudokoliiniesteraasin inhiboimatta lipaasia tai häiritsemättä värireaktiota sulfhydryyli-reagenssin kanssa. Pseudokoliiniesteraasi-inhibiittorit ja koliiniesteraasi-

inhibiittorit ovat myrkyllisiä, ja niitä tulee käsitellä erityisen huolellisesti. Haihtuvien koliiniesteraasi-inhibiittoreiden käyttö on johtanut myrkyllisten höyryjen muodostumiseen koe inkuboinnin aikana sekä inhibiittorin häviämiseen substraatista inkuboinnin tai valmistavan esikuumennuksen aikana. Lyofilisoituja reagensseja valmistettaessa määritystarvike pakkauksia varten inhibiittorin tulee olla haihtumaton olosuhteissa, joita käytetään veden poistamiseen muista reagensseista (lämpötiloissa alueella -50°C - $+35^{\circ}\text{C}$, 0,1-5 elohopeamillimetrin paineissa, 12-48 tunnin ajan). Niiden tulee olla myös fysikaalisesti ja kemiallisesti yhteensopivia muiden aineosien kanssa ja kuivasta muodosta helposti veteen dispergoituvia sekä vesiliukoisia. Monissa tapauksissa tunnettujen ominaisuuksien perusteella tai rutiinimenetelmin voidaan varmistua siitä, onko tietyllä koliiniesteraasi-inhibiittorilla vaadittua, inhiboivaa aktiivisuutta, inerttisuutta lipaasiin nähden, haihtumattomuutta, lyofilisoituvuutta sekä dispergoituvuutta veteen ja vesiliukoisuutta.

Yleensä, pseudokoliiniesteraasi-inhibiittorin tulisi olla kiinteä alle 50°C :n lämpötiloissa, sen tulisi liueta hyvin veteen (ainakin 0,5-25 millimoolia litraa kohti), höyrynpaineen tulisi olla tuntuvasti veden höyrynpaineen alapuolella, ja sen tulisi olla kemiallisesti kestävä Vesiliuoksissa, joiden pH-arvot ovat neutraalista emäksisiin. Monet nestemäiset fosfaattihyönteismyrkkyjen koliiniesteraasi-inhibiittoreista eivät ole täten sopivia. Parationi, esim. ei ole ainoastaan erittäin myrkyllinen neste, vaan myös sen liukoisuus veteen on riittämätön, eikä se ole riittävän kestävä alkalisessa pH:ssa. Isofluorfaatti eli di-isopropyylifluorifosfaatti hajoaa kosteuden läsnäollessa muodostaen fluorivetyä ja menettäen inhiboivaa aktiivisuutta sekä on haihtuva, erittäin myrkyllinen eikä sitä voida lyofilisoida. Malationi on veteen huonosti liukeneva neste, hydrolysoituu ja menettää aktiivisuutta alkalisessa pH:ssa. Keksintöön soveltuviin pseudokoliiniesteraasi-inhibiittoreihin kuuluvat kiinteät, vesiliukoiset karbamaattikoliiniesteraasi) pseudokoliiniesteraasi-inhibiittorit kuten fysostigniini (eseriini), neostigniini, pyridostigniinibromidi, ambenoniumkloridi, bentspyriniumkloridi, demekoriumbromidi. Eseriiniä (fysostigniiniä) ja sen suoloja, kuten

esim. salisylaattia ja sulfaattia pidetään parempina pseudokoliiniesteraasi/koliiniesteraasi-inhibiittoreina. Eseriinialisylaatti on erittäin spesifinen seerumin pseudokoliiniesteraasi, eikä se inhiboi lipaasia koeolosuhteissa. Se ei myöskään häiritse sulfhydryylivärireaktiota käyttöolosuhteissa. Eseriinialisylaattia pidetään parempana. Käytetään riittävässä määrin inhibiittoria estämään näytteen pseudokoliiniesteraasi ja koliiniesteraasiaktiivisuus. Optimimäärät, joita tulee käyttää spesifisissä formuloinneissa sekä menetelmissä voidaan määrittää tavanomaisilla alueen etsintä kokeilla. Parempana pidetyn eseriinialisylaatin ollessa kysymyksessä vähintään 0,005 millimoolin konsentraatio (0,005 tuhannesosaa molekyyliä painoa vastaavaa grammamäärää litrassa) substraattireagenssin ja näytteen seoksessa on käyttökelppoisuus, ja parempana pidetään konsentraatioita 0,01-0,03.

Suurempia konsentraatioita voidaan käyttää (0,005-0,1 millimoolista kyllästyskonsentraatioon saakka), kuitenkin vähän tai ei mitään parantumista ole havaittu konsentraatioiden noustessa 0,02:sta 0,05 millimooliin, eikä lisämääriä ole tarvittu. Konsentraatioiden ollessa tuntuvasti alle 0,005 millimoolia, seerumin pseudokoliiniesteraasi voi vapauttaa sulfhydryyli-ryhmiä S-asyyli-yhdisteestä antaen virheellisesti kohonneita lipaasin mittausrvoja.

Albumiinia käytetään herkkyyttä lisäävässä määrin. Tiettyssä tapauksessa käytettävä tarkka määrä voidaan määrätä tavallisin alueen etsintämenetelmin käyttäen erilaisia albumiinin konsentraatioita. Riittämätön albumiinin määrä sekä ylimäärä albumiinia aiheuttaa herkkyuden menetyksen, mikä on osoitettu tiettyä määrää kohti lipaasia muodostuneen värin häviämisenä. Yleensä albumiinin konsentraatio, joka on 1-8 milligrammaa reagenssin millilitraa kohti, antaa hyviä tuloksia. Entsyymin aktivoimisen lisäämiseksi mieluummin otetaan mukaan anioninen pintaaktiivinen aine kuten natriumdodekyylisulfaatti, kuten Kurooka et al. ovat kuvanneet, *J. Biochem.* 81, 36169 (1977).

Keksinnön mukaisesti biologinen nestenäyte, kuten esim. seerumi, plasma, haimaneste tai muu sellainen, inkuboidaan reagenssin kanssa, joka sisältää S-asyyli-yhdisteen, väriä antavan sulfhydryyli-reagenssin, eseriinisuolan sekä albumiinin, käyttäen

pH- ja lämpötila-olosuhteita, jotka edistävät lipaasin aktiivisuutta. Ennalta määritetyn inkubointiajan kuluttua, inkubointi päätetään, samea seos kirkastetaan ja saatu väri mitataan kolorimetrissa tai spektrofotometrillä. On havaittu, että inkubointi voidaan päättää ja seos kirkastaa samanaikaisesti lisäämällä substraattia liuottavaa, ei-ionista pinta-aktiivista ainetta kuten esim. polyetyleeniglykolin alkyylifenyylietteriä, polyoksietyleenisorbitaanimonorasvahappoestereitä tai polyetoksi-loitua kasviöljyä.

Termiä "substraattia liuottava" käytetään tarkoittamaan ei-ionisen pinta-aktiivisen aineen ominaisuutta liuottaa S-asyyli-yhdiste veteen, jolloin S-asyyli-yhdiste muodostaa reagenssi-seoksessa kirkkaan liuoksen pikemmin kuin emulsion. Kuten Kurooka et al. ovat kuvanneet S-asyylisubstraatti-yhdiste muodostaa miselliemulsion vettä sisältävässä puskurissa ilman pinta-aktiivista ainetta tai emulgaattoria. Tiettyjä ei-ionisia pinta-aktiivisia aineita voidaan tutkia substraattia liuottavan kyvyn suhteen yksinkertaisesti lisäämällä niitä vettä sisältävään S-asyylisubstraatti-emulsioon pH 8-9:ssä ja tarkkailemalla varmistua, että ei-vesijae sekoittuu vesijakeen kanssa. Sopiviin ei-ionisiin, substraattia liuottaviin pinta-aktiivisiin aineisiin kuuluu oktyylifenoksi-polyetoksietanoli (Triton[®] X-100, Rohm & Haas, keskimääräinen molekyylipaino 646, Merck Index, yhdeksäs painos, monografia 7350); nonyyli-fenolipolyetyleeniglykolieetteri (Tergitol[®] NPX, Union Carbide); polyoksietyloitu kasviöljy (Emulphor[®] EL-719 GAF Corporation); polyoksietyleeni (20) sorbitaanimonopalmiitti (Tween[®] 40, ICI United State) ja Cremphor[®], E-L, BASF-Wyandotte. Anioniset pinta-aktiiviset aineet kuten esim. natriumlauryylisulfaatti sekä jotkin ei-ioniset pinta-aktiiviset aineet, kuten esim. polyoksietyleeni (23) lauryylieetteri jättävät S-asyyliyhdiste-substraatin emulsion muotoon.

Ei-ioninen, substraattia liuottava pinta-aktiivinen aine rikkoo ja liuottaa substraatti-misellit lopettaen samanaikaisesti lipaasi-aktiivisuuden ja kirkastaen seoksen, niin että väri voidaan mitata suoraan ilman välivaiheen saostusta, sentrifugointia tai muuta eristysvaihetta. Niin kauan kuin ei-ioninen pinta-aktiivinen aine yksinään on riittävä päättämään inkuboinnin ja sallimaan suoran mittauksen, pidetään myös parempana lisätä

riittävästi happoa laskemaan pH 7,0:aan tai sen alapuolelle. Hapon lisäyksen sekä ei-ionisen pinta-aktiivisen aineen yhdistetty käyttö liuottaa seokseen paljon kätevämmän, lopullisen värin. Parempana pidetyssä menetelmässä käytetään inkuboinnin päättämiseen liuosta, jossa on noin 0,5-2,0 g oktyylifenoksyipolyoksyetanolia (Triton[®] X-100, Rohm & Haas) 100 ml:ssa happoa, kuten esim. 16,5 millimolaarista suolahappoa tai Tris-HCl:a (1,5-2,5 molaarista), jolloin käytetään kaksi millilitraa tätä hapanta reagenssia noin yhtä millilitraa kohti reaktioseosta.

Yksityiskohtainen kuvaus

Keksinnön mukainen reagenssi-substraatti-koostumus sisältää seuraavia aineosia seuraavia määriä.

| | |
|-------------------------------------|--------------------------|
| Puskuri, pH 8,0 - 9,5 | 0,05-0,3 molaarinen |
| Anioninen pinta-aktiivinen aine | 1-3 millimolaarinen (mM) |
| Väriä antava sulfhidryyli-reagenssi | 0,15-0,8 mM |
| Karboksyyliesteraasi-inhibiittori | 0,05-1,5 mM |
| Eseriini-suola | 0,005-0,1 mM |
| Albumiini | 1-8 mg/ml |
| S-asyyli-yhdiste | 2-5 mM |

Keksinnön mukaisessa menetelmässä yllämainittujen aineosien vesiseosta sekoitetaan näytteen kanssa, suhteessa 2 millilitraa reagenssi-substraattia 10-100 mikrolitraan näytettä, ja seosta inkuboidaan 20° - 25° - 37°C:ssa 15-45 minuutin ajan. Hapan reagenssi ja ei-ioninen pinta-aktiivinen aine lisätään ja väri mitataan, mieluummin mittaamalla absorbanssi spektrofotometrissä valon aallonpituuden ollessa 400-420 nanometriä ("nm"). Lipaasin aktiivisuus voidaan määrittää vertaamalla tuloksia tunnetun lipaasiaktiivisuuden omaavilla standardiliuoksilla saatuihin tuloksiin, kalibrointitaulukoihin y.m.s. Mieluummin mitataan myös tyhjäkoe käyttäen kaksoisnäytteitä; ja päättäen toisen kaksoisnäytteen inkubointi aikaisin tyhjäkokeen arvon saamiseksi.

On toivottavaa käyttää standardi-liuosta, jonka tulee antaa ennalta määrätty väri tai absorbanssi, joka on vastaavuussuhteessa tunnetun määrän kanssa lipaasi-aktiivisuutta. Voidaan käyttää standardi lipaasi-liuoksia tai kontrolli-seerumeita; kuitenkin näissä ilmenee vaihtelua erästä toiseen ja lipaasi-aktiivisuuden häviötä varastoinnin aikana. Ei-entsymaattisen

kemiallisen standardin ollessa kysymyksessä on mahdollista formuloida se siten, että sillä suoritettu kalibrointi on tasainen sarjasta toiseen ja sillä on paremmat varastointi ominaisuudet, jotka ovat välttämättömät käytettäessä etukäteen sekoitettuja reagensseja ja määritystarvikkeita. Vaikka monet yhdisteet reagoivat väriä antavan sulfhydryylireagenssin kanssa, niitä ei voida käyttää standardeina. Esim. S-asyylitiokoliinibromidi ja 2-metyyli-3-asetyylimerkaptopropionihappo reagoi niin hitaasti sulfhydryyli-reagenssin kanssa, että värireaktio on inkuboinnin jälkeen epätäydellinen. Merkaptopuriini ja tiomaitohappo antavat epästabiilin värin. Muut yhdisteet, kuten esim. ditiotreitoli ja 2-merkaptotiatsoliini ovat joko epästabiileja, tai ne eivät liukene inkubointi-seokseen.

On havaittu, että määrityksen kannalta hyväksyttäviä, veden liukenevia S-(2-aminoalempialkyyli)isotiuronium-suoloja voidaan käyttää lipaasin määritysmenetelmän kemiallisina standardeina. Sellaiset suolat, joissa "alempialkyyli" on 1,2 tai 3 hiili-atomia ja joissa anioni-osa ei inkiboi, osallistuvat tai muutoin puuttuvat värireaktioon, niillä on myös riittävä stabilisuus, reaktiokyky väriä antavan sulfhydryyli-reagenssin kanssa sekä stabilisuus erinomaisten tulosten saamiseksi käytettäessä niitä kemiallisina standardeina. Parempana pidetty yhdiste on S-(2-aminoetyyli)isotiuroniumbromidihydrobromidi. Standardi-liuos sisältää isotiuronium-suolan vedessä, ennalta määrättyinä konsentraationa, joka on sovellettu antamaan väri lipaasi-reagenssin kanssa tapahtuvassa reaktiossa, siten että väri vastaa lipaasi-aktiivisuuden ennalta määrättyä, tunnettua tasoa. Isotiuronium-suolaa tulisi käyttää määrältään niin paljon, että lopullisessa reaktioseoksessa, inkuboinnin ja väriä antavan sulfhydryyli-reagenssin kanssa tapahtuneen reaktion jälkeen se antaa absorbanssi-arvon, joka on 0,1-0,5-1. Mieluummin isotiuronium-suola sekoitetaan puskurin tai hapon kanssa, jolloin pH vesiliuoksessa on 6,2-7,0. Etukäteen sekoitettuja reagensseja tai määrityspakkauksia varten isotiuronium-suola ja puskuri voidaan formuloida ja kuivata, esim. lyofilisoimalla, jolloin se ennen käyttöä tislatus veden avulla saatetaan uudelleen käyttökuntoon. Myös isotiuronium-suola voidaan lyofilisoida stabiloimisaineen, kuten esim. dekstraanin kanssa ja saattaa käyttökuntoon hapon vesiliuoksen, kuten 0,2

normaalisen suolahapon avulla. Sopiva lipaasin väristandardin koostumus voidaan valmistaa seuraavasti:

Standardi värikoostumus, joka vastaa korkeita normaali ihmisen seerumin lipaasin tasoja (noin 200 kansainvälistä yksikköä millilitraa kohti):

S-(2-aminoalempialkyyli) isotiuronium-suolaa 1,1 milligrammaa puskuria (pH 6,5) vettä q.s. yhteen millilitraan saakka, 20 μ l:aa tätä liuosta on tyypillinen määrittystä kohti käytetty määrä 1,1 millilitran kanssa substraatti-reagenssi koostumusta, jotta saadaan lopullinen absorbanssi, joka on noin 0,4. Täsmällinen absorbanssi-arvo sekä korrelaatio tiettyyn lipaasin tasoon nähden riippuu lopullisessa seoksessa käytetyn isotiuronium-suolan tarkoista suhteista.

Parempana pidetty reagenssi-substraatti sisältää seuraavaa:

| | |
|---------------------------|------------------------|
| Puskuri-Tris puskuri | 0,12 molaarinen |
| Natriumdodekyylisulfaatti | 2 mM (millimolaarinen) |
| DTNB | 0,3 mM |
| PMSF | 0,4 mM |
| Eseriinisalisylaatti | 0,03 mM |
| Albumiini | 7,0 mg/ml |
| BALB | 3,0 mM |
| lopullinen pH | 8,8 |

Parempana pidetyssä menetelmässä käytetään 1,1-2,1 millilitraa yllämainittua reagenssia 20-50 mikrolitraa kohti näytettä. Inkubointi suoritetaan mieluummin 30°C:ssa 20-30 minuutin ajan, minkä jälkeen reaktio pysäytetään lisäämällä 2 millilitraa 0,6-0,8 prosenttista (painoa tilavuutta kohti) Triton[®] X-100:aa 16,5 mM suolahapossa tai happoliuoksessa (pH 1-5), kuten esim. Tris-HCl:ssa (1,5-2,5 molaarinen, pH noin 4,0). Absorbanssi mitataan 412 nanometrissä ja verrattuna tuloksiin, jotka on saatu kaksoisnäytteillä, kun absorbanssi on mitattu 10 minuutin inkuboinnin jälkeen. Absorbanssieroa käytetään lipaasin aktiivisuuden mittana.

Muodossa, jota pidetään erityisesti parempana tarvikepakkaus sovellutuksiin nähden, reagenssi-substraatti, hapan ei-ioninen pinta-aktiivinen reagenssi ja kemiallinen väristandardi ovat valmistetut viitenä koostumuksena:

a) Puskuri (pH 9,2-9,5), albumiini, eseriinisuola, anionien pinta-aktiivinen aine sekä karboksyyliesteraasi-inhibiittori, valinnaisesti lyofilisoinnin stabilisaattorin, kuten esim. dekstraanin, esimerkiksi Dextran[®] 2000:n kanssa, lyofilisoidussa muodossa.

b) Puskuri (pH valittu stabiloimaan väriä antava sulfhydryyli-reagenssi, mieluummin pH 6,8-7,2), väriä antava sulfhydryyli-reagenssi ja dekstraani lyofilisoinnin stabilisaattorin lyofilisoidussa muodossa.

c) S-asyyli-yhdistelios veteen sekoittuvassa inertissä liuottimessa, mieluummin noin 33 millimolaarinen etanolissa.

d) Ei-ioninen, pinta-aktiivinen aine (Triton[®] X-100, noin 0,75 %) noin 2,0 m tris-HCl:ssä (Trometamiini HCl), pysäyttävä reagenssina.

e) S-(aminoalempialkyyli) isotiuronium-halogenidihydrohalogenidisuola (noin 1,1 milligrammaa) lyofilisoidussa muodossa, säiliössä, joka soveltuu 0,2 normaalisen suolahapon vesiliuoksella yhdeksi millilitraksi suoritettavaan uudelleen liuottamiseen.

Koostumuksissa (a) ja (b) käytetyt suhteelliset konsentraatiot ja pH:t ovat valitut siten, että lopullisen konsentraation saamiseksi, tislattulla vedellä suoritettua liuottamista ja sekoittamista jälkeen, puskureiden yhdistelmä aineosissa (a), (b) ja (c) tuottaa lipaasin aktiivisuutta edistävän lopullisen pH:n 8,5-9,5. Uudelleen liuotettu sulfhydryyli-reagenssi on paljon kestävämpi, kun se on valmistettu erikseen pH:ssa, joka on lähellä neutraalia. Hapan, ei-ioninen pinta-aktiivinen aine on sovellettu, yhdistettynä muihin aineosiin, inaktivoimaan lipaasi alhaisessa pH:ssa sekä särkemään misellit ja kirkastamaan seos ilman saostusta, niin että väri voidaan mitata suoraan.

Keksintöä valaistaan edelleen seuraavin esimerkein.

Esimerkki 1

a) Valmistettu lyofilisoitu substraatti-reagenssi, joka sisältää:

| | |
|-----------------------------|-------------------------|
| Tris-puskurin (pH 9,2-9,4) | 0,11 g |
| Albumiinia | 77 mg (milligrammaa) |
| Eseriinialisylaattia | 0,18 mg |
| Dextran [®] 2000:a | 5 mg |

| | |
|--|---------------|
| Natriumdodekyylisulfaattia | 6,335 mg |
| Fenyyylimetyylisulfonyyli- fluoridia ("PMSF") | 0,765 mg |
| Tislattua vettä | q.s. 3 ml:aan |

sekoitettu ja lyofilisoitu.

b) On valmistettu lyofilisoitu DTNB, joka sisältää:

| | |
|--|---------------|
| Tris-puskuria (pH 6,85) | 0,188 g |
| DTNB:a | 14,25 mg |
| Dextran [®] 200:a | 5 mg |
| Tislattua vettä, sekoitettu ja lyofilisoitu | q.s. 3 ml:aan |

c) BALB-substraatti on valmistettu liuottamalla BALB etanoliin BALB:n 33 millimolaariseen konsentraatioon.

d) Pysäytysliuos on valmistettu liuottamalla 0,6 g ei-ionista pinta-aktiivista ainetta (Triton[®] X-100) 16,5 millimolaariseen suolahappoon.

Yllämainitut neljä koostumusta muodostavat määritystarvikepakkauksen.

Esimerkki 2

Esimerkin 1 mukaista 4-reagenssipakkausta käytetään seuraavasti käyttäen kaksoisnäytepulloja, jotka on merkitty "potilas-tausta", "potilas", "tausta 10 minuuttia" ja "tausta 30 minuuttia", sekä seuraavaa menetelmää.

a) Siirrä 10,0 ml tislattua vettä lyofilisoidun substraattireagenssin pulloon ja liuosta kääntäen pulloa.

b) Siirrä 1,0 ml BALB lipaasisubstraattia yllämainittuun pulloon ja sekoita hyvin pulloa kääntäen.

c) Siirrä 12 ml tislattua vettä lyofilisoituun DTNB-reagenssipulloon. Liuota kääntäen.

d) Pipetoi 0,1 ml yllämainittua DTNB-liuosta merkittyihin pulloihin.

e) Pipetoi 1,0 ml BALB-substraatin ja substraatti-reagenssin seosta kuhunkin merkittyyn pulloon ja sekoita varovasti pyörittäen. Saatu seos on substraatti, joka sisältää BALB:n emulsion muiden reagenssien liuoksessa.

f) Inkuboi kaikkia pulloja, jotka nyt sisältävät täydellisen substraatti-reagenssin koostumuksen, 30°C:n lämmössä 10 minuutin ajan.

g) Tietyin aikavälein lisää 0,05 ml seerumia sopivasti merkittyihin, rinnakkaisiin potilas-taustapulloon ja potilaspulloihin ja lisää 0,05 ml tislattua vettä "tausta 10 minuuttia"-pulloon.

h) 10 minuutin kuluttua (sauvassa järjestyksessä ja samoin aikaväleinä kuin vaiheessa g) lisää 2 ml pysäytysreagenssia "potilas-tausta"- ja "tausta 10 minuuttia"-pulloihin.

i) 30 minuutin kuluttua lisää 2,0 ml pysäytysreagenssia "potilas"-pulloon sekä "tausta - 30 minuuttia"-pulloon.

j) Aseta spektrofotometri 412 nanometriin ja nollaa laite tislattua vettä käyttäen.

k) Lue näytteiden absorbanssi kussakin tapauksessa 5 minuutin kuluttua pysäytysliuoksen lisäyksestä.

Seerumin lipaasi-aktiivisuus on verrannollinen absorbanssiin 412 nanometrissä, ja se lasketaan seuraavasti:

Lipaasi-aktiivisuus 20 minuutissa = absorbanssi / potilasnäyte - taustanäyte / 30 minuuttia - absorbanssi / potilasnäyte - taustanäyte / (10 minuuttia).

Esimerkki 3

Yllä esitetyissä esimerkeissä käytetyn menetelmän tarkkuus tutkittiin käyttäen seitsemää tyyppiä "epänormaalia", kohonnutta lipaasikontrolliseerumia sekä "normaalia" kontrolliseerumia ja käyttäen 35 minuutin inkubointiaikaa, ja absorbanssi-ero mitattiin 25 minuutin ajanjakson aikana (absorbanssi/25). Molemmissa tapauksissa saatiin erinomainen tarkkuus standardi-poikkeaman ollessa $\pm 0,028$ ja $\pm 0,029$.

Viidentoista normaali henkilön seeruminäytteiden analyysi tuotti normaalit tulokset (absorbanssi/25 = 0,2) 93 prosentissa tapauksissa verrattuna 93 prosenttiin kaupallisella vertailumenetelmällä (DuPont ACA turbidometrinen menetelmä) saatuun normaaliin tulokseen. Korkeimman, selvästi normaalin tuloksen absorbanssi/25 oli 0,252.

Kuudentoista pankreatiitti-potilaan seeruminäytteiden tulokset olivat suuremmat kuin 0,3 kaikissa tapauksissa. Joissakin tapauksissa seeruminäytteen korkea lipaasi-aktiivisuus laimennettiin 1:1 ennen analyysiä ja tulos kerrottiin 10:llä.

Analysoitiin 15 seeruminäytettä potilailta, joilla esteraasitasot olivat korkeat, mukaanluettuna yhdeksän kohonnuttu koliiniesteraasia. Kolme näistä antoi epänormaali tulokset (absorbanssi/25 = yli 0,3), ja kaksi näistä kolmesta varmistettiin kohonneiksi arvoiksi lipaasin turbidometrisen vertailumenetelmän avulla sekä amylaasin kohonneiden tai raja-arvojen perusteella. Tämän lisäksi yhdellä näyteellä oli korkea lipaasin raja-arvo, joka oli 0,2:n ja 0,3:n välillä (absorbanssi /25).

Ylläesitetetyt tulokset osoittavat, että keksintö muuttaa lipaasi-aktiivisuutta ja antaa tulokset, jotka erottavat normaalit tasot epänormaaleista, vieläpä koliiniesteraasin läsnäollessa, luotettavuuden ollessa vähintään yhtä hyvän kuin turbidometrisellä menetelmällä.

Esimerkki 4

On formuloitu reagenssikoostumus, joka sisältää seuraavat aineosat:

| | |
|---------------------------|--------------------------|
| Tris-puskuri | 0,12 molaarinen |
| Natriumdodekyylisulfaatti | 2 millimolaarinen ("mM") |
| DTNB | 0,3 mM |
| PMSF | 0,4 mM |
| BALB | 3 mM |

Lopullinen pH noin 8,8. Käyttäen esimerkin 2 mukaista menetelmää, reagenssia käytettiin 1,17 yksikköä asetyylikoliiniesteraasia (todellinen koliiniesteraasi) tai 0,36 yksikköä butyryylikoliiniesteraasia (pseudokoliiniesteraasi) sisältäen liuosten määrittämiseen. Asetyylikoliiniesteraasi tuotti 0,011 absorbanssi-yksikön suuruisen ja butyryylikoliiniesteraasi liuotti 0,421 absorbanssi-yksikön suuruisen absorbanssin muutoksen. Nämä tulokset, joita ei ole saatu millään lipaasilla eikä eseriini-suolan avulla, ilmaisevat, että todellisilla koliiniesteraaseilla on jonkin verran vaikutusta ja että seerumissa esiintyvät pseudokoliiniesteraasit antavat vääriä, kohonneita lipaasin tuloksia.

Käyttäen tuoreita ihmisen seeruminäytteitä lisättiin erilaiset määrät eseriini-salisylaattia, ja todettiin absorbanssin muutos 10:n ja 30:n minuutin välillä. Eseriini-salisylaatti lisättiin 1 millimolaarisena liuoksena.

| <u>Lisätty eseriinisalisylaatti</u> | <u>Absorbanssin muutos</u> |
|--|----------------------------|
| 0 | 0,604 |
| 5 mikrolittraa (0,005 millimolaarinen) | 0,501 |
| 10 mikrolittraa | 0,495 |
| 20 mikrolittraa | 0,475 |
| 30 mikrolittraa | 0,490 |
| 40 mikrolittraa | 0,496 |
| 50 mikrolittraa | 0,492 |

Ylläesitetyt tulokset ilmaisevat pseudokoliiniesteraasin inhiboitumisen eseriinisalisylaatilla, jolloin lipaasin aktiivisuus mitataan spesifisemmin.

Esimerkki 5

Esimerkin 4 kaltaisessa menetelmässä verrataan neostigmiinimetyylisulfaatin, eseriinisalisylaatin sekä PMSF:n kykyä inhiboida asetyylikoliiniesteraasia (10,4 yksikköä millilitraa kohti); pseudokoliiniesteraasibutyryylikoliiniesteraasia (7,2 yksikköä millilitraa kohti) tai ihmisen seerumissa normaalisti esiintyviä pseudokoliiniesteraaseja. Käytettiin 50 mikrolittraa seerumia tai koliiniesteraasia tai pseudokoliiniesteraasia, ja merkittiin muistiin absorbanssin muutos 20 minuutin aikana. Saatiin seuraavat tulokset.

Taulukko II

| | Asetyyli- koliiniesteraasi | Butyyryyli- koliiniesteraasi | Seerumi A | Seerumi B |
|--|-------------------------------|---------------------------------|--------------|--------------|
| | Ei inhibiittoreita | 0.013 | 0.343 | 0.482 |
| Eseriinialisylaatti * | 0.027 | 0.182 | 0.078 | 0.092 |
| Nestigmiiinimetyylisulfaatti* PMSF*** | 0.025 | 0.187 | 0.098 | 0.081 |
| Eseriini* + PMSF*** | 0.021 | 0.338 | 0.487 | 0.383 |
| Neostigmiiini** + PMSF*** | 0.013 | 0.179 | 0.087 | 0.077 |
| | 0.018 | 0.169 | 0.063 | 0.068 |
| * Eseriinialisylaatti | - 0.037 μ m | (mikromolaarinen) | | |
| ** Neostigmiiinimetyylisulfaatti | - 0.037 mM | (millimolaarinen) | | |
| *** PMSF | - 0.37 mM | | | |

Aktiivisuus on ilmaistu Δ absorbanssina/20 minuutin inkubaatio

Taulukon II tulokset ilmaisevat merkittävää absorbanssin lisääntymistä pseudokoliiniesteraasin, buturyylikoliiniesteraasin kohdalla verrattuna koliiniesteraasiin, asetyylikoliiniesteraasiin, mikä osoittaa pseudokoliiniesteraasin huomattavasti hydrolysoivan BALB-substraattia. Tulokset ilmaisevat myös, että esi-riinisalisylaatti ja neostigniini inkuboivat huomattavasti joko yksinään tai PMSF:ään yhdistettynä. Seeruminäytteissä tulokset ilmaisevat karboksyyliesteraasi-aryyliesteraasi-inhibiittorilla olevan vähän tai ei yhtään vaikutusta, kun inhiboidaan S-asyyli-yhdisteen häiritsevää hydrolyysiä, paitsi kun pseudokoliiniesteraasi inhimiittori on läsnä.

Esimerkki 6

Esimerkin 1 mukaiset koostumukset on valmistettu ja pakattu määritysvälinelaatikkoon, joka sisältää myös standardina 5,5 milligrammaa S-(2-aminoetyyli)-isotiuroniumbromidihydrobromidia säiliössä, joka soveltuu 5,0 millilitraan 0,2 normaalisella suolahapolla suoritettavaan laimentamiseen.

Esimerkki 7

Valmistetaan esimerkin 1 mukainen koostumus, paitsi että albumiini jätetään pois koostumuksesta (a) ja koostumus (b) valmistetaan seuraavasti:

| | |
|--|----------|
| Tris-puskuria (pH 6,85) | 0,0605 g |
| DTNB:a | 7,18 mg |
| Albumiinia | 0,423 g |
| Tislattua vettä sekoitettu q.s. ja lyofilisoitu | 4 ml:aan |

Koostumuksia käytetään kuten esimerkissä 2, paitsi että vaiheessa (c) DTNB-reagenssi liuotetaan uudelleen 5,5 ml:lla vettä ja vaiheessa (d) käytetään 1,1 ml tätä liuosta.

Kaksikymmentä mikrolitraa standardiliuosta, joka on esimerkin 6 mukaista, käytetään standardina pullossa, johon on merkitty "standardi".

Patenttivaatimukset.

1. Reagenssikoostumus biologisissa nesteissä esiintyvän lipaasi-aktiivisuuden määrittämiseksi, käsittää S-asyyli-yhdisteen ja väriä antavan sulfhydryyli-reagenssin, t u n n e t t u siitä, että reagenssi sisältää myös diagnostisesti hyväksyttävän koliiniesteraasi/-pseudokoliiniesteraasi-inhibiittorin biologisessa nesteessä esiintyvän koliiniesteraasin ja pseudokoliiniesteraasin inhiboimiseksi.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen reagenssi, t u n n e t t u siitä, että koliiniesteraasi/pseudokoliiniesteraasi-inhibiittori on vesiliukoinen karbamaatti.
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen reagenssi, t u n n e t t u siitä, että karbamaatti - inhibiittori on eseriini tai sen diagnostisesti hyväksyttäviä suoloja.
4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen reagenssi, t u n n e t t u siitä, että eseriinipseudokoliini-inhibiittori on eseriinisalisylaatti.
5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen reagenssi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää millilitraa kohti 1-8 milligrammaa albumiinia.
6. Menetelmä lipaasin aktiivisuuden määrittämiseksi biologisissa nesteissä inkuboimalla biologinen nestenäyte S-asyyli-yhdisteen, väriä antavan sulfhydryyli-reagenssia sekä karboksyyli-esteraasi-inhibiittorin läsnäollessa sekä mittaamalla syntyvä väri, t u n n e t t u siitä, että inkubointi suoritetaan diagnostisesti hyväksyttävän koliiniesteraasi/pseudokoliiniesteraasi-inhibiittorin läsnäollessa käyttäen konsentraatiota, joka on riittävä inhiboimaan näytteen koliiniesteraasi sekä pseudokoliiniesteraasi.
7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että inkubointi päätetään lisäämällä riittävästi ei-ionista, substraattia liuottavaa pinta-aktiivista ainetta misellien rikkomiseksi, riittävästi, jotta lipaasi-aktiivisuus päättyy, sekä inkuboimis-seoksen kirkastamiseksi; ja sen jälkeen suoraan mittaamalla muodostuvan seoksen väri.

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että pinta-aktiivinen aine on alkyylifenolipolyetoksi-
etanoli pinta-aktiivinen aine.

9. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että koliiniesteraasi/pseudokoliiniesteraasi-inhi-
biittori on kiinteä, vesiliukoinen karbamaatti.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että pseudokoliiniesteraasi-inhibiittori on eseriini-
suola.

11. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että inkuboidaan diagnostisesti hyväksyttävä S-(ami-
noalempialkyyli) isotiuronium-suola mainitun S-asyyli-yhdisteen,
väriä antavan sulfhydriyli-reagenssin sekä mainittujen inhibiit-
toreiden kanssa, mitataan saatu väri ja verrataan värin mittaus-
tuloksia.

12. Reagenssipakkaus biologisten nesteiden lipaasi-aktii-
visuuden määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että se sisäl-
tää

(a) ensimmäisen substraatti-reagenssi koostumuksen, jossa
on puskuri, mikä antaa alkalisen pH:n 9-95, eseriinipseudokolii-
niesteraasi-inhibiittori sekä karboksyyliesteraasi-inhibiittori;

(b) toisen reagenssi-koostumuksen, joka sisältää väriä
antavan sulfhydriyli-reagenssin, sekä puskurin, joka tuottaa
pH-arvon riittävän lähellä 7:ää väriä antavan sulfhydriyli-rea-
genssin stabiloimiseksi;

(c) S-asyyli-yhdisteen liuoksen veteen sekoittuvassa inertis-
sä liuottimessa; ja

(d) ei-pinta-aktiivisen aineen liuoksen; koostumukset
(a), (b) ja (c) on sovellettu muodostamaan patenttivaatimuksen 1
mukainen koostumus, kun ne sekoitetaan keskenään; ja koostumus-
ten (a) ja puskurit on sovellettu tuottamaan (a):n, (b):n sekä
(c):n lopullisessa seoksessa pH:n, joka edistää lipaasin aktiivi-
suutta; ja pinta-aktiivinen liuos (d) on sovellettu inaktivoi-
maan lipaasi sekä kirkastamaan (a):n, (b):n, (c):n sekä (d):n
mainittu seos.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen reagenssipakkaus, t u n n e t t u siitä, että liuos (d) on ei-ionisen pinta-aktiivisen aineen hapan liuos, jotta (a):n, (b):n, (c):n sekä (d):n seoksessa lopullinen pH on riittävän alhainen inaktivoimaan lipaasi sekä stabiloimaan väri.

14. Patenttivaatimuksen 12 mukainen reagenssi-pakkaus, t u n n e t t u siitä, että se sisältää (e) kemiallisen väristandardikoostumuksen, jossa on ennalta määrätty määrä diagnostisesti hyväksyttävää S-(aminoalempialkyyli) isotiuronium-suolaa sovellettuna antamaan väri, väriä antavan sulfhydriyli-reagenssin kanssa tapahtuvassa reaktiossa värin vastatessa ennalta määrättyä lipaasi-aktiivisuuden tasoa.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen reagenssi-pakkaus, t u n n e t t u siitä, että koostumus (e) sisältää S-(2-aminoetyyli)-isotiuroniumbromidihydrobromidin.

Patentkrav:

1. Reagenskomposition för bestämning av lipasaktivitet i biologiska vätskor, och omfattande en S-acylförening och en kromogenisk sulfhydrylreagens, k ä n n e t e c k n a d därav, att reagensen även omfattar tillräckligt med en diagnostikalt godtagbar cholinesteras/pseudocholinesteras-inhibitor för hämmande av cholinesteras och pseudocholinesteras i biologiska vätskor.
2. Reagens enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att cholinesteras/pseudocholinesteras-inhibitorn är ett vattenlösligt, fast karbamat.
3. Reagens enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att karbamatet är eserin eller dess diagnostikalt godtagbara salt.
4. Reagens enligt patentkravet 3, k ä n n e t e c k n a d därav, att eserin-pseudocholinesterasinhibitorn är eserinsalicylat.
5. Reagens enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att den innehåller 1-8 mg albumin per ml.
6. Förfarande för bestämning av lipasaktivitet i biologiska vätskor genom inkubering av ett biologiskt vätskeprov i närvaro av en S-acylförening, en kromogenisk sulfhydrylreagens och en karboxi-esterasinhibitor och och mätning av den resulterande färgen, k ä n n e t e c k n a t därav, att inkubationen utföres i närvaro av en diagnostikalt godtagbar cholinesteras/pseudocholinesteras-inhibitor i en koncentration som är tillräcklig att hämma cholinesteras och pseudocholinesteras i provet.
7. Förfarande enligt patentkravet 6, k ä n n e t e c k n a t därav, att inkuberingen avslutas genom tillsats av tillräckligt med ett joniskt inaktivt, substratlösande, ytaktivt medel för att tillräckligt störa micellerna och väsentligen avsluta lipasaktiviteten och klara inkubationsblandningen; varefter färgen mäts direkt i den resulterande blandningen.
8. Förfarande enligt patentkravet 6, k ä n n e t e c k n a t därav, att ytaktiva medlet är ett ytaktivt medel av alkylfenolpolyetoxi-etanoll.

9. Förfarande enligt patentkravet 6, k ä n n e t e c k n a t därav, att cholinesteras/pseudocholinesteras-inhibitorn är ett fast, vattenlösligt karbamat.

10. Förfarande enligt patentkravet 9, k ä n n e t e c k n a t därav, att pseudocholinesterasinhibitorn är ett eserinsalt.

11. Förfarande enligt patentkravet 6, k ä n n e t e c k n a t därav, att man inkuberar ett diagnostiskt godtagbart S-(amino-lägrealkyl)isotiuroniumsamt med nämnda S-acylförening, kromogenisk sulfhydrylreagens och nämnda inhibitorer, mäter erhållna färgen och jämför färgmätningarna.

12. Reagensförpackning för bestämning av lipasaktivitet i biologiska vätskor, k ä n n e t e c k n a d därav, att den innehåller

a. en första substratreagenskomposition som omfattar en buffert som lämpar sig att tillhandahålla ett alkaliskt pH från 9 till 9,5, en eserin-pseudocholinesterasinhibitor och en karboxy-esterasinhibitor;

b. en andra reagenskomposition som omfattar en kromogenisk sulfhydrylreagens och en buffert för tillhandahållande av ett pH nära 7 för stabiliserande av kromogeniska sulfhydrylreagensen.

c. en lösning av en S-acylförening i ett med vatten blandbart lösningsmedel; och

d. en lösning av ett joniskt inaktivt, ytaktivt medel; varvid kompositionerna (a), (b) och (c) lämpar sig att bilda en reagenskomposition enligt patentkravet 1 då de sammanblandas; och buffermedlen i kompositionerna (a) och (b) lämpar sig att tillhandahålla ett pH i slutliga blandningen av (a), (b) och (c) som lämpar sig för lipasaktiviteten; och att lösningen (d) av ytaktivt medel lämpar sig att inaktivera lipas och att klara nämnda blandning i blandningen av (a), (b), (c) och (d).

13. Reagensförpackning enligt patentkravet 12, k ä n n e t e c k n a d därav, att lösningen i (d) är en sur lösning av ett joniskt inaktivt, ytaktivt medel som lämpar sig att i lösningen av (a), (b), (c) och (d) tillhandahålla ett pH som är tillräckligt lågt att inaktivera lipas och stabilisera färg.

14. Reagensförpackning enligt patentkravet 12, k ä n n e t e c k n a d därav, att den innehåller (e) en kemisk standardfärgkomposition som omfattar en i förväg bestämd mängd av ett diagnostiskt godtagbart S-(aminolägrealkyl)isotiuroniumsamt, som

lämpar sig tillhandahålla en färg vid reaktion med kromogeniska sulfhydrylreagensen, varvid färgen motsvarar en i förväg bestämd nivå av lipasaktivitet.

15. Reagensförpacknin enligt patentkravet 14, k ä n n e - t e c k n a d därav, att kompositionen (e)imfattar S-(2-aminoetyl) isotiuroniumbromidhydrobromid.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI

CH

DE

DK

FR

GB

NO

SE

US 3 986 930 (C12k 1104), 3 119 668 (C 23-230),
3 917 515 (C12k 1104) palsta 2, sivut 57-63

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen K ja vastausjulkaisun numeron eteen K ja P.

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

- *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 24, 1957, Gornoi, "Assay of Pancreatic Lipase in Serum", s. 170-182 edit. s. 170, s. 171 rivit 1-8, s. 176, rivit 6-16
- Kirk-Othmer, *Encyclopedia of Chemical Technology*, 3rd ed., vol. 3, 1979, John-Wiley & Sons, New York, s. 31-32
- *Journal of Biochemistry*, vol. 81, 1977, Kurooka et al, "A Novel and Simple Colorimetric Assay for Human Serum Lipase", s. 361-369
- *Chemical Abstracts*, vol. 70 (1969), 113805e, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1969, 167(1), 98-104

Majid Suman

Allekirjoitus