

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 145680 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN



- (21) Ansøgning nr. 4668/76 (51) Int.Cl.³ C 12 Q 1/28
(22) Indleveringsdag 15. okt. 1976
(24) Løbedag 6. dec. 1974
(41) Alm. tilgængelig 15. okt. 1976
(44) Fremlagt 24. jan. 1983
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. 6370/74
(30) Prioritet 7. dec. 1973, 2361169, DE 16. aug. 1974, 2439348, DE

(71) Ansøger BOEHRINGER MANNHEIM GMBH, 6800 Mannheim-Waldhof, DE.

(72) Opfinder Peter Roeschlau, DE: Gunter Lang, DE: Klaus Beaucamp,
DE: Erich Bernt, DE: Wolfgang Gruber, DE.
(74) Fuldmægtig Firmaet Chas. Hude.

- (54) Reagens til påvisning og bestemmelse af cholesterin og cholesterinestere.

Opfindelsen angår et reagens til påvisning og bestemmelse af cholesterin og cholesterinestere.

Den kendteste metode til cholesterinbestemmelse er baseret på reaktionen ifølge Liebermann og Burchardt. Herved danner cholesterin og cholesterinestere med eddikesyreanhydrid og koncentreret svovlsyre blå-grønfarvede forbindelser, som kan bestemmes fotometrisk. Ulemper ved disse fremgangsmåder er manglende specificitet og anvendelsen af aggressive og ætsende reagenser.

I den senere tid er der fremkommet fremgangsmåder til bestemmelse af cholesterin og cholesterinestere, som er baseret på oxidation af cholesterin med oxygen til cholestenon og hydrogenperoxid, som bliver katalyseret ved hjælp af det nye enzym, cholesterinoxidase (DE fremlæggelsesskrift 22 24 132, DT offentliggørelseskrift 22 46 695). Udvidningen af dette nye enzym er beskrevet i DT fremlæggelsesskrift 22 24 131 og 22 24 133. Metoden til bestemmelse af cholesterin med dette enzym i de ovennævnte trykskrifter

UN 145680 B

er baseret på en måling af oxygenforbruget eller på en måling af dannet cholestenon eller hydrogenperoxid. Alle i disse trykskrifter beskrevne metoder har dog det til fælles, at de ganske vist giver kvantitative udbytter, men som "vådbestemmelser" er tidsrøvende og/eller kræver dyre apparater såsom oxygenelektroder eller fotometere.

I den kliniske kemi ønskes nu mere og mere hurtige metoder, som ganske vist hyppigt ikke giver helt så nøjagtige resultater, men dog til rutine- eller rækkeundersøgelser muliggør en hurtigere og billigere undersøgelse. De til hurtigundersøgelsen anvendte diagnosemidler er enten sugedygtige bærere eller vandfaste film, som indeholder samtlige til reaktionen nødvendige reagenser. Såfremt disse diagnostiske midler bringes i berøring med legemsvæskerne, der skal undersøges, fås farvereaktioner, som enten kan bestemmes ved hjælp af sammenligningsfarver eller med simple reflektionsfotometere.

Det er klart, at reaktionen ifølge Liebermann og Burchardt på grund af anvendelsen af koncentreret svovlsyre ikke er egnet til en hurtigtest til bestemmelse af cholesterin. Det synes dog lovende at udnytte de nye enzymatiske bestemmelsesmetoder for cholesterin også til en hurtigtest. Da påvisningen af det dannede hydrogenperoxid i koblede enzymatiske metoder til bestemmelsen af andre stoffer (f. eks. glucose, galaktose) allerede med godt resultat flere gange er blevet udnyttet i hurtigtests, synes dette at være den mest lovende metode til en hurtigtest til bestemmelse af cholesterin.

Forsøg på fremstillingen af cholesterin-hurtigtests ved imprægnering af cholesterinoxidase, peroxidase, en oxidationsindikator, en puffer samt befugtningsmidler i de ovennævnte trykskrifter anførte recepter på et sugedygtigt papir førte overraskende ikke til det ønskede resultat. De opnåede testpapir reagerede ikke eller kun meget langsomt med cholesterinholdigt serum af sædvanlig koncentration. Dermed fremkom den opgave at ændre de fra den fotometriske cholesterinbestemmelse kendte reagensblandinger således, at der dermed kunne fremstilles brugbare hurtigtests.

Det viste sig nu, at man fik testpapir, som reagerede trinvist med cholesterinholdigt serum, når man til imprægneringsopløsningen yderligere tilsætter overfladeaktive midler i en mængde på mindst 0,5%. Fra DE offentliggørelsesskrift 22 24 132 og 22 46 695 kendes det allerede, at små mængder af de overfladeaktive stoffer, som fremmer opløsningen af cholesterin- og cholesterinesterkomplekser (DT offentliggørelsesskrift 22 46 695, side 20) og ikke hindrer den enzymatiske reaktion, men at overfladeaktive stoffer i mængder på over 0,25% hæmmer den enzymatiske reaktion (DT offentliggørelsesskrift 22 46 695, side 14). De overfladeaktive stoffer, som ved udvindingen af cholesterinoxidase af mikroorganismer forbliver i enzympræparatet, skal derfor fjernes ved hjælp af specielle foranstaltninger, såsom dialyse, gel-filtrering og omfældning af enzymer eller reduceres til et acceptabelt indhold. Fra DT offentliggørelsesskrift 23 61 169 kendtes det yderligere, at cholesterinoxidase, også i fast form, ved længere tids lagring bliver dekomponeret irreversibelt ved vedhæftende spor af overfladeaktive midler, således at det er fordelagtigt først kort tid før reaktionen at blande enzymet med de nødvendige overfladeaktive stoffer. Under disse omstændigheder kunne man ikke vente, at der til fremstillingen af anvendelige hurtigtests måtte tilsættes disse overfladeaktive stoffer i mængder på mindst 0,5% af imprægneringsopløsningen for at opnå tilstrækkeligt aktive tests, og at disse tests, trods det høje indhold af overfladeaktive stoffer, alligevel er tilstrækkeligt lagringsstabile.

Fra dansk patentansøgning nr. 1083/74 kendes et analysereagens til bestemmelse af totalt kolesterol i en væskeformig prøve bestående af et kemisk system med cholesterolesterhydrolaseaktivitet, et kemisk system med cholesteroloxidaseaktivitet og fremgangsmåde til bestemmelse af mindst ét af de reaktionsprodukter, der dannes, når frit kolesterol bringes i kontakt med ovennævnte kemiske system med cholesteroloxidaseaktivitet, under tilstedeværelse af oxygen. Det angives, at der skal anvendes et overfladeaktivt middel til at holde kolesterol i opløsning. Mængder, som er væsentligt over 0,25%, af overfladeaktivt middel virker enzymhæmmende. Det fremgår at man konstant kun anvender 0,28% natriumtaurocholat. Herudover kan det nævnes, at der ved reagenset ifølge opfindelsen anvendes en langt større mængde befugtningsmiddel. Den udgør som anført 2 - 30%, fortrinsvis 10 - 20%. For at nå frem til den foreliggende opfindelse, skal der trods læren i den kendte teknik an-

vendes en mængde som ligger langt over den hidtil foreslåede mængde på 0,25%, og det er særdeles overraskende at tilsætninger, som ligger væsentligt over denne mængde faktisk virker hæmmende. Iøvrigt viser det sig at ikke blot indtræder denne hæmningsvirkning ikke mere, men samtidigt optræder der en stabiliserende og aktiverende virkning.

Reagenset ifølge opfindelsen til påvisning og til bestemmelse af cholesterin og cholesterinester i væsker, hvilket reagens indeholder en cholesterinoxidase, et middel til påvisning af H_2O_2 og bestående af peroxidase og en oxidationsindikator, en puffer og eventuelt en cholesterinesterase er ejendommeligt ved det i krav 1's kendetegnende del angivne.

Som befugtningsmidler med lipophile og hydrophile egenskaber anvendes fortrinsvis ikke-ionogene befugtningsmidler, som mindst indeholder en OH-gruppe i molekylet. Der anvendes fortrinsvis polyoxyethylen-derivater af alkyl-, aryl- og aralkylalkoholer. Eksempler på sådanne særligt foretrukne befugtningsmidler er polyoxyethylenalkylethere, polyoxyethylenalkylcarboxylsyreestere, polyoxyethylensorbitanalkylcarboxylsyreestere, polyoxyethylenglycerinalkylcarboxylsyreestere, polyoxyethylenalkylaminer, polyoxyethylenpolyoxypropylenblokpolymerisater, polyoxyethylenalkylthioether, polyoxyethylenalkylarylether. Specielle eksempler er hydroxypolyethoxydedecan, ethylenoxyaddukter af alkylphenoler, og polyethoxyethylenderivater af sorbitanhydrider. Også med mercaptaner modificerede polyoxyethylenderivater viser sig som omtrent lige så velegnede. Ved anvendelse af den nævnte særligt foretrukne gruppe af befugtningsmidler er det almindeligvis fuldstændigt tilstrækkeligt at tilsætte mellem ca. 0,005 vægt% og 0,1 vægt%.

Der findes i handelen en hel række forbindelser af denne art, som adskiller sig fra hinanden ved antallet af oxyethylengrupper. De mest anvendelige er de vandopløselige forbindelser, der udmærker sig ved et middelantal af oxyethylengrupper (ca. 5 til 20). Lavere oxyethylerede typer kan for det meste kun dispergeres og er derfor mindre anvendelige. Højere ethoxylerede forbindelser (større end 25) er ganske vist vandopløselige, men så hydrophile, at aktiviteten er forringet.

Blandt de anioniske befugtningsmidler er specielt saltene af galde-syrer som cholsyre, taurocholsyre og desoxycholsyre velegnede, samt yderligere fedtsure salte og fedtsyresarkosider. Af særlig betydning er svovlsyrederivater, der som bekendt yderligere har den egenskab, at stabilisere mange indikatorers farvede radikaliske oxidationsprodukter (o-tolidin, heterocykliske aciner). Dette er f.eks. følgende grupper: Sulforavsyreestere, alkylarylsulfonater, alkylsulfater, alkylpolyoxyethylensulfater.

Af de kationiske befugtningsmidler er f.eks. alkylpyridinium- eller -trimethylammoniumsalte anvendelige, men også kompliceret opbyggede forbindelser, som f.eks. benzethoniumchlorid.

Af de amphotere befugtningsmidler er f.eks. imidazoliumbetainerne anvendelige.

Specielle eksempler er natriumdi-(2-ethylhexyl)-sulfosuccinat, natriumdodecylsulfat, natriumoleat, benzalkoniumchlorid og cetylpyridiniumchlorid.

Sådanne ioniske og amphotere befugtningsmidler anvendes fortrinsvis i kombination med de ovennævnte ikke-ionogene befugtningsmidler. De egnede mængder svarer til mængden af ikke-ionogene befugtningsmidler.

De ikke-ionogene befugtningsmidler, som indeholder mindst en OH-gruppe, foretrækkes, da de giver en ca. 5 til 10 gange stærkere aktivering og dermed en tilsvarende forhøjelse af reaktionshastigheden eller forkortelse af reaktionsvarigheden i forhold til de andre anvendelige befugtningsmidler. De er også virksomme i ringere mængder.

Alkylgrupperne har fortrinsvis indtil ca. 20, især 12 til 18 carbonatomer.

Blandt de ikke-ionogene overfladeaktive polyoxyethylenforbindelser kan specielt anvendes sådanne, som besidder et afpasset forhold mellem hydrophobrest og polyoxyethylenkæde og er vandopløselige.

Et tal for forholdet af hydrophobrest og polyoxyethylenkæde er den såkaldte HLB-værdi (jvf. W.C. Griffin, J.Soc.Cosmetic.Chem. 1, 311 (1950) og 5, 249 (1954)).

Særligt anvendelige er befugtningsmidler med HLB værdier mellem ca. 10 og 17. Disse værdier kan kun betragtes som retningsangivende, da virkningen også afhænger af karakteren af den hydrophobe rest.

Et foretrukket system til påvisning af H_2O_2 består af peroxidase og en oxidationsindikator, eventuelt sammen med kvældestoffer og/eller stabilisatorer.

Prøvepapir indeholdende reagenserne og opnået ved imprægnering af sugedygtigt papir er fremragende egnet til påvisning af kolesterol i serum. Såfremt man dog vil påvise kolesterol i komplet blod, skal man dog hensigtsmæssigt hydrophobere eller overtrække prøvepapiret med en semipermeabel membran af celluloseestere f.eks. som beskrevet i tysk offentliggørelsesskrift nr. 1.598.048. Til påvisningen i komplet blod foretrækkes dog specielt prøvefilm, som kan opnås som beskrevet i tysk patent nr. 1.598.153.

Til fremstillingen røres reagenserne, f.eks. kolesteroloxidase, peroxidase, puffer, indikator og eventuelt kvældestof sammen med de i reagenset ifølge opfindelsen anvendte befugtningsmidler en vandig dispersion af en filmdannende polymer. Denne dispersion fordeles så til en tynd film og tørres. Pådryppes kolesterolholdigt blod på en sådan reagensfilm og aftørres efter ca. 1 minut fås ligeledes farvninger, hvis farvedybde afhænger af kolesterolmængden. Disse farvninger egner sig særlig til kvantitativ bestemmelse med simple remissionsphotometere.

Reagenset ifølge opfindelsen er uden et indhold af kolesterolsterase egnet til påvisning og til bestemmelse af fri kolesterol. Foreligger derimod kolesterolsterase, må kolesterolnet så først frigøres herfra. Dette kan ske på sædvanlig måde, f.eks. ved forsæbning med vandig alkali. Af særlig fordel er dog esterspaltningen med kolesterolsterase (der fortrinsvis isoleres af mikroorganismer), da der herved kan arbejdes under meget skånsomme betingelser.

Man kan også tilsætte cholesterinesterase til legemsvæsken og inkubere i et bestemt tidsrum. Man kan gennemføre denne fremgangsmåde, f.eks. således, at man opsuger legemsvæsken i kapillarer, hvis indvendige vægge i analogi med tysk patentskrift nr. 2.240.672 er belagt med cholesterinesterase og eventuelle hjælpestoffer. Efter inkuberingen i kapillarerne overføres væsken så, som beskrevet ovenfor, på prøvestrimlerne. Når der i legemsvæsken forud forelå fri og forestret cholesterin sammen, påvises naturligvis summen af disse to. Særlig fordelagtig kan man imidlertid også indarbejde cholesterinesterase i prøvestrimlerne, således at man får reagenser, ved hjælp af hvilke man i et trin kan bestemme eller påvise summen af fri og forestret cholesterin.

De til påvisningen af det ved oxidationen af cholesterinet dannede hydrogenperoxid egnede systemer, fortrinsvis peroxidase, puffer, oxidationsindikatorer og eventuelt kvældestoffer kendes f.eks. fra beskrivelser af hurtigprøver for glucose. Eksempler på anvendelige komponenter i disse foretrukne systemer er anført i det følgende.

Af peroxidaserne egner sig specielt de af peberrod, men også lactoperoxidase er anvendelige.

Som puffer kommer de sædvanlige som f.eks. phosphat-, citrat- og boratpuffer på tale. Den pH-værdi, som indstilles i det diagnostiske middel, skal ligge mellem 4 og 9, fortrinsvis mellem 5 og 8.

Som oxidationsindikatorer kommer forskellige forbindelsesgrupper på tale og specielt benzidinderivater som f.eks, o-tolidin, o-vanillin-derivater ifølge tysk fremlæggeskrift nr. 1.598.133 eller heterocykliske aciner ifølge tysk fremlæggeskrift nr. 1.648.840.

Til recepterne for de diagnostiske midler, specielt til prøvefilmene, kan der også tilsættes sædvanlige kvældestoffer som natriumalginat og carboxymethylcellulose, desuden stabiliseringsmidler for enzymerne som f.eks. dithioerythrit.

Basisstofferne for prøvefilmene er formstoffdispersioner af f.eks. polyvinylpropionat eller polyvinylacetat. Heri indrøres alle reagenser fortrinsvis i opløst form, og blandingen forarbejdes til tynde film og tørres.

Prøvepapir fremstilles ved, at man opløser reagenserne i vand eller i blandinger af vand og organiske opløsningsmidler, imprægnerer filtrerpapir med opløsningen og tørrer. Man kan imidlertid også først forimprægnerer med de vandopløselige reagenser og derpå f.eks. efterimprægnerer med indikatorerne i organisk opløsning.

De følgende eksempler belyser opfindelsen.

Eksempel 1

Filtrerpapir ("Schleicher og Schüll 597 NF Ind") gennemvædes med en opløsning af følgende sammensætning og tørres ved 40°C.

1 molær citratpuffer pH-værdi 5,25	20 ml
cholesterinoxidase (60 U/mg)	0,1 g
Peroxidase (70 U/mg)	0,05 g
Vand, destilleret	til 100 ml

Dette papir imprægneres med opløsninger af 0,2 g o-tolidin i 100 ml methylenchlorid, som desuden hver indeholder 1 g af af de følgende befugtningsmidler:

- a) Polyoxyethyltributylphenolether
- b) Polyoxyethylsorbitanmonolaurat
- c) Polyoxyethylenonylphenolether
- d) Polyoxyethylenlaurylether
- e) Polyoxyethylencetylether
- f) Polyoxyethylenstearat
- g) Polyoxyethylendodecylthioether.

Efter tørring fås prøvepapir, som med cholesterinholdige sera reagerer med grøn farve. Såfremt de anvendte sera samtidig indeholder cholesterinester, fås en kraftigere grønfarvning, når disse sera nogen tid hver er blevet behandlet med en dråbe cholesterinesteraseopløsning. Et prøvepapir, som ikke indeholder noget af de nævnte grænsefladeaktive stoffer, reagerer ikke med de ovennævnte sera.

Eksempel 2

Filtrerpapir ("Schleicher og Schüll 597, NF, Ind.") gennemvædes med en opløsning af følgende sammensætning og tørres ved 40°C.

1 molær citratpuffer pH-værdi 7	20 ml
cholesterinoxidase (60 U/mg)	0,1 g
cholesterinesterase (18 U/mg)	0,25 g
Peroxidase (70 U/mg)	0,05 g
Vand, destilleret	100 ml

Dette papir imprægneres med opløsninger af 0,2 g o-tolidin i 100 ml methylenchlorid som desuden indeholder 0,5 g af de følgende befugtningsmidler:

- a) Polyoxyethylencocoat
- b) Polyoxyethylenoleat
- c) Polyoxyethylenpolypropylenglycol
- d) Polyoxyethylenstearylamin
- e) Polyoxyethylenglycerinmonolaurat

Efter tørringen fås prøvepapir, som reagerer grønt med sådanne sera, som indeholder kolesterol og/eller kolesterolinester. Prøvepapir uden befugtningsmiddel viser ingen reaktion.

Praktisk taget det samme er tilfældet med prøvepapir, som indeholder den samme mængde citratpuffer med pH-værdi 5,25 eller 6.

Eksempel 3

Forimprægneret papir ifølge eksempel 1 efterimprægneres med opløsninger af 0,3 g o-tolidin i 100 ml acetone, som indeholder de følgende befugtningsmidler i mængder på 1,5 g:

- a) Dioctylnatriumsulfosuccinat
- b) Dodecylbenzensulfonsyre, natriumsalt
- c) Laurylpolyglycolethersulfat, natriumsalt
- d) Natriumlaurylsarkosinat
- e) Natriumlaurat
- f) Cholsyre
- g) Desoxicholsyre
- h) Natriumtaurocholat

Dette prøvepapir besidder praktisk taget de samme egenskaber som prøvepapiret ifølge eksempel 1, dog er reaktionsfarverne stabile i længere tid.

Lignende egenskaber besidder tilsvarende prøvepapir med en fosfatpuffer med pH-værdi 7.

Eksempel 4.

Forimprægneret papir ifølge eksempel 2 imprægneres med opløsninger, som indeholder 0,4 g o-tolidin og 0,5 g af et af de følgende befugtningssmidler:

- a) Laurylpyridiniumchlorid
- b) Benzethoniumchlorid
- c) Cetyltrimethylammoniumchlorid
- d) 1-hydroxyethyl-1-carboxymethyl-2-alkylimidazolinium-betain

Dette prøvepapirs egenskaber svarer til egenskaberne af prøvepapiret ifølge eksempel 2.

Eksempel 5

Filtrerpapir ("Schleider og Schüll 597, NF, Ind.") imprægneres med en opløsning af følgende sammensætninger og tørres ved 40°C:

1 molær fosfatpuffer, pH-værdi 6	25 ml
Cholesterinoxidase (60 U/mg)	0,1 g
Peroxidase (70 U/mg)	0,05 g
Cholsyre	1,0 g
Acetone	10 ml
Vand; destilleret	til 100 ml

Dette papir bliver efterimpregneret med opløsninger af oxidationsindikatorer i 100 ml acetone.

Indikationsmængden, den kemiske struktur heraf og farvereaktionen heraf med cholesterinholdige sera er sammenfattet i tabel 1.

Tabel 1

Mængde	Indikator	Farvereaktion
0,3 g	o-vanillyliden-p-vanilloylhydrazon	violet
0,2 g	azino-bis-(N-ethylbenzthiazolon-2-sulfonsyre-5)-diammoniumsølt	grøn
0,1 g	azino-bis-(N-alkylquinolon-2-sulfonsyre-6)-diammoniumsølt	blåviolet
0,1 g	bis-(N-alkylquinolon-2)-azin	violet
0,1 g	(N-methylbenzthiazolon-2)-N-ethylquinolon-2)-azin	blågrøn
0,3 g	(N-methylbenzthiazolon-2)-1-phenyl-3,4-dimethyltriazolon-5)-azin	blå

Eksempel 6

Der fremstilles en blanding af følgende bestanddele:

Polyvinylpropionatdispersion	45 g
Natriumalginat, 1,85% i 0,5 molær phosphatpuffer, pH-værdi 5,5	35 g
Cholesterinoxidase (60 U/mg)	0,5 g
Peroxydase (70 U/mg)	0,25 g
Diocetylnatriumsulfosuccinat	1 g
o-tolidin, opløst i 6 ml acetone	0,6 g
Vand	50 ml

Denne blanding fordeles til en film med en vådfilmtykkelse på ca. 300 nm eller fordeles på en fast bærer og tørres ved 35°C. Såfremt der dryppes cholesterinholdig blod på filmen, og blodet aftager efter 1 minuts forløb, fås alt efter cholesterinkoncentrationen grønfarvninger af varierende kraftighed.

Suppleres den ovennævnte recept med 1,0 g cholesterinesterase fås film, hvormed der også kan bestemmes forhøjede cholesterinesterindhold.

P a t e n t k r a v .

1. Reagens til påvisning og bestemmelse af cholesterin og cholesterinestere i væsker, hvilket reagens indeholder en cholesterinoxidase, et middel til påvisning af H₂O₂ og bestående af peroxidase og en oxidationsindikator, en puffer og eventuelt en cholesterinesterase, k e n d e t e g n e t ved, at reagenserne er imprægneret på en sugedygtig bærer eller indlejret i en formstoffilm, og indeholder mindst et befugtningsmiddel med lipophile og hydrophile egenskaber i en koncentration på 2 - 30% af de faste reagenser.

2. Reagens ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at befugtningsmidlet indgår i en koncentration på 10 til 20% af de faste reagenser.

Fremdragne publikationer:

DK ansøgnings nr. 1083/74 (pl. § 2,2,3)
DE offentliggørelsesskrift nr. 2246695.