

(19) DANMARK



DIREKTORATET FOR  
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 144643 B

- (21) Ansøgning nr. 2452/73 (51) Int.Cl.<sup>3</sup> C 12 Q 1/44  
(22) Indleveringsdag 4. maj 1973  
(24) Løbedag 4. maj 1973  
(41) Alm. tilgængelig 20. dec. 1973  
(44) Fremlagt 26. apr. 1982  
(86) International ansøgning nr. -  
(86) International indleveringsdag -  
(85) Videreførelsesdag -  
(62) Stamansøgning nr. -  
(30) Prioritet 19. jun. 1972, 2229849, DE

(71) Ansøger BOEHRINGER MANNHEIM GMBH., 68 Mannheim-Waldhof, DE.

(72) Opfinder August Wilhelm Wahlefeld, DE: Hans Moellering, DE: Wolf=  
gang Gruber, DE: Erich Bernt, DE: Peter Roeschlau, DE.

(74) Fuldmægtig Firmaet Chas. Hude.

(54) Fremgangsmåde og reagens til be=  
stemmelse af triglycerider.

Opfindelsen angår en fremgangsmåde og et reagens til bestemmelse af triglycerider ved forsøbning af glyceriderne og bestemmelse af den derved frigjorte glycerol.

Bestemmelsen af triglyceriderne får en stadig større betydning inden for såvel levnedsmiddelanalysen som inden for den medicinske diagnostik, navnlig ved diagnose af hyperlipæmier inden for den kliniske kemi.

Ifølge en kendt fremgangsmåde sker bestemmelsen på den måde, at man først forsøber triglyceriderne med alkoholisk alkalimetahydroxid og derpå

DK 144643 B

bestemmer den dannede glycerol. Bestemmelsen sker hensigtsmæssigt ved hjælp af enzymatiske metoder. Herved bliver glycerolen phosphoryleret med adenosintriphosphat (ATP) i nærværelse af glycerolkinase (GK) til dannelsen af glycerin-1-phosphat og adenosindiphosphat (ADP). Dannet ADP overføres atter ved hjælp af phosphoenolpyruvat (PEP) i nærværelse af pyruvatkinase til pyruvat og ATP. Herved dannet pyruvat hydreres med nikotinamidadenindinucleotid i hydreret form (NADH) i nærværelse af lactatdehydrogenase (LDH) til lactatet, hvorved NADH oxideres til nikotinamidadenindinucleotidet (NAD). Den ved reaktionen forbrugte NADH-mængde er ækvivalent med glycerolmængden. NADH kan let bestemmes kvantitativt på grund af dets absorption ved 366, 340 eller 334 nm.

En væsentlig ulempe ved denne kendte fremgangsmåde består i forsæbningen med ethanolisk alkalimetallhydroxid. Dette forsæbningstrin gør den i øvrigt specifikke, nøjagtige og let gennemførlige metode omstændelig og tidsrøvende, da alene forsæbningen varer 20-30 minutter ved en temperatur på ca. 70°C. Derefter skal der neutraliseres og centrifugeres, før der kan begyndes med selve glycerolbestemmelsen.

Denne ulempe afhjælpes ifølge en kendt fremgangsmåde ved hjælp af den enzymatiske forsæbning af triglyceriderne, hvorved der anvendes en lipase fra *Rhizopus arrhizus*. Ved denne fremgangsmåde var det overraskende, at der kunne findes frem til en lipase, som i vandig puffer kan spalte triglyceriderne fuldstændigt til fedtsyre og glycerol på 5-10 minutter ved 35-37°C. Ved en anden kendt fremgangsmåde anvendes en lipase sammen med en protease til forsæbningen, og med en lignende virkning. Andre lipaser, navnlig den kendte pankreaslipase, viste sig uegnet.

En ulempe ved den enzymatiske spaltning består imidlertid i, at forsæbningen kræver en væsentlig mængde af det meget kostbare enzym. For at opnå en brugbar reaktionstid er ca. 1 mg af enzymet for hver 0,1 ml serumprøve nødvendig. Endelig dannede de frigjorte fedtsyrer uopløselige sæber med eventuelt tilstedeværende calcium- og magnesiumioner, hvilket atter førte til uklarheder og dermed til forfalskning af måleresultaterne, hvis der ikke centrifugeres.

Opfindelsen tager derfor sigte på at afhjælpe disse ulemper og angive en fremgangsmåde til bestemmelse af triglycerider i en vandig væske ved hjælp af enzymatisk forsæbning, ved hvilken den nødvendige lipasemængde samt den nødvendige bestemmelsestid formindskes væsentligt, og nødvendigheden af en fraskillelse af de eventuelt udfældede sæber endvidere fjernes.

Dette opnås ifølge opfindelsen ved hjælp af en fremgangsmåde til bestemmelse af triglycerider ved enzymatisk forsæbning ved hjælp af lipase og måling af den frigjorte glycerol, som er ejendommelig ved, at forsæbningen foretages i nærværelse af såvel lipase som carboxylesterase og et alkalimetal- eller jordalkalimetalalkylsulfat med 10-15 carbonatomer i alkylgruppen. Fortrinsvis arbejdes der herved i nærværelse af serumalbumin.

Den til forsæbningen ifølge opfindelsen benyttede reagenskombination muliggør overraskende en meget stor nedsættelse af den nødvendige lipasemængde og tilmed fra ca. 1 mg pr. 0,1 ml serumprøve til 20 µg pr. 0,1 ml serumprøve uden samtidig forøgelse af reaktionstemperaturen eller reaktionstiden.

Som lipase foretrækkes en lipase fra *Rhizopus arrhizus*. Som carboxylesterase EC 3.1.1.1, carboxylesterhydrolase, anvendes fortrinsvis et pattedyr-leverpræparat, navnlig en svineleveresterase. Der kan dog også anvendes andre carboxylestereaser. En mængde på ca. 100 µg esterase pr. 0,1 ml serumprøve har vist sig at være fuldt tilstrækkelig.

Blandt alkylsulfaterne foretrækkes alkalimetalsaltene, da de ikke giver anledning til dannelse af uopløselige sæber med de frigjorte fedtsyrer. I den foretrukne udførelsesform for fremgangsmåden, hvor der anvendes serumalbumin, kan der imidlertid også anvendes jordalkalimetalalkylsulfater. Dodecylsulfat foretrækkes, da det fremskynder forsæbningen af triglyceriderne kraftigst under disse betingelser. Alkylsulfatet er virksomt i en mængde ned til 0,001 vægt%/vol. i prøvematerialet. Mængder over 0,1% fører til en forstyrrende skumdannelse og en let hæmning og er derfor i almindelighed u hensigtsmæssige.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen gennemføres hensigtsmæssigt ved pH-værdier mellem 6 og 9, fortrinsvis mellem 7 og 8,5. Dette har den fordel, at der ved påvisning af den dannede glycerol med den bekendte reaktion under anvendelse af ATP, GK, PEP, PK, NADH og LDH ikke behøver at foregå en pH-værdiændring, men at forsæbning og måling af den dannede glycerol kan gennemføres i et enkelt reaktionsmateriale.

I den foretrukne udførelsesform, hvor der tilsættes serumalbumin, fortrinsvis kvægserumalbumin, undgås en uklarhed som følge af udfældede sæber pålideligt, så at sådanne sæber ikke skal fraskilles, f.eks. ved centrifugering. Serumalbumin tilsættes herved hensigtsmæssigt i en koncentration mellem 0,1 og 2,0 mg/ml prøvemateriale.

Kobolt- og/eller magnesiumioner har en vis aktiverende virkning på lipasen eller esterasen og kan derfor ligeledes tilsættes til yderligere reaktionsfremskyndelse.

Som puffer er alle inden for ovennævnte pH-område virksomme puffer egnede med undtagelse af fosfatpuffer. Eksempler på egnede puffer er triethanolaminpuffer, trispuffer, imidazolpuffer, veronalpuffer, glycinpuffer samt, mindre foretrukket, amediolpuffer, boratpuffer og collidinpuffer.

Reagenset til gennemførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen indeholder enzymatisk lipase som forsæbningsmiddel, puffer og et system til påvisning af glycerol og er ejendommeligt ved et indhold af såvel lipasen som carboxylesterase og et alkalimetal- eller jordalkalimetalalkylsulfat med 10-15 carbonatomer i alkylgruppen.

Som system til påvisning af glycerol kan der i reagenset ifølge opfindelsen principielt anvendes ethvert sådant system. Et påvisningssystem, som består af NADH, ATP, PEP, LDH, PK, GK samt magnesiumioner og puffer, foretrækkes. Sidstnævnte påvisningssystem er velegnet i reagenset ifølge opfindelsen og har tillige den fordel, at bestanddelene ikke forstyrrer hinanden, og at alle enzymer er aktive ved samme pH-værdi.

Inden for rammerne af den foretrukne reagenskombination består et særlig egnet reagens af

- 0,1-10,0 mg lipase fra *Rhizopus arrhizus*
- 0,5-20,0 mg carboxylesterase
- 0,01-0,2 mg alkylsulfat
- 1-20 mM NADH
- 10-100 mM ATP
- 2-20 mM PEP
- 0,5-5 mg LDH
- 0,2-5 mg PK
- 0,05-10 mg GK
- 0,1-2,0 mg serumalbumin
- 3-30 mM magnesiumioner
- eventuelt 0,5-1,0 mM koboltioner og
- 0,03-0,3 M puffer, pH = 6-9.

De ovenfor angivne mængder refererer til 1 ml pufferopløsning med den angivne koncentration. Som puffer foretrækkes 0,1 M triethanolaminpuf-

fer med en pH-værdi fra 7 til 8,5 i det ovennævnte reagens.

Som allerede nævnt muliggør fremgangsmåden og reagenset ifølge opfindelsen en meget stor billiggørelse af triglyceridbestemmelsen. I forhold til den kendte fremgangsmåde, som anvender forsæbning med ethanolisk kalilud, forkortes varigheden af bestemmelsen fra mere end 1 time til mindre end 1/2 time. Samtidig bliver talrige pipetteringstrin, opvarmning af forsæbningsmaterialet, neutralisering og centrifugering af bundfaldet overflødig.

Sammenlignet med den kendte teknik, der anvender enzymatisk forsæbning, opnås en meget betydelig formindskelse af den nødvendige enzymmængde.

De følgende eksempler belyser opfindelsen nærmere.

#### Eksempel 1

Man fremstillede et lagringsbestandigt reagens bestående af fem komponenter, som blandes før brugen og derpå er holdbare i blandet tilstand i 1-2 dage.

| <u>Komponenter</u> | <u>Sammensætning</u>                                                                                                                 |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                  | 0,1 M triethanolaminpuffer pH 7,6 indeholdende 3 mM $\text{MgSO}_4$ , 1,5 mg kvægserumalbumin/ml og 0,1 mg natrium=dodecylsulfat/ml. |
| 2                  | Opløsning af 6 mM NADH, 33 mM ATP og 11 mM PEP i destilleret vand.                                                                   |
| 3                  | Krystalsuspension af 2 mg LDH/ml og 1 mg PK/ml (fås i handelen).                                                                     |
| 4                  | Opløsning af 0,2 mg lipase fra <i>Rhizopus arrhizus</i> /ml og 4,0 mg carboxylesterase/ml.                                           |
| 5                  | Krystalsuspension af 2 mg GK/ml.                                                                                                     |

2,9 ml komponent 1, 0,1 ml komponent 2 og 0,02 ml komponent 3 blandes og indstilles på 25°C. Derpå iblandes 0,1 ml serum, som indeholder de triglycerider, der skal bestemmes, og der inkuberes i 5 minutter ved den angivne temperatur. Derpå iblandes 0,1 ml komponent 4, og blandingen holdes i 15-20 minutter ved den angivne temperatur, og ekstinktionen ved 366 nm eller 340 nm aflæses derpå i et fotometer. Den aflæste værdi betegnes med  $E_1$ . Prøven tilsættes derpå 0,02 ml komponent 5, og

efter 10 minutter aflæses ekstinktionen påny. Denne måleværdi betegnes med  $E_2$ . Efter yderligere 10 minutter aflæses atter, og måleværdien  $E_3$  noteres.

Beregning:  $\Delta E = (E_1 - E_2) - (E_2 - E_3)$   
 mg totalglycerol fra triglycerider/100 ml =  $\Delta E \times 89,1$ .

Ovennævnte bestemmelse blev gentaget 9 gange, idet den tilsatte serum-mængde hver gang blev formindsket med 0,01 ml. Ved grafisk optegning af de således opnåede  $\Delta E$ -værdier som funktion af den benyttede serum-mængde opnås den på tegningen viste rette linie.

Ud fra de fundne værdier beregnes en proportionalitet med  $r = 0,9986$ . En sammenligning med  $r$  (ideal) = 1,000 viser fremgangsmådens meget store nøjagtighed.

#### Eksempel 2

Fremgangsmåden ifølge eksempel 1 blev gentaget under anvendelse af en triglyceridstandardopløsning. I forsøg 1 blev carboxylesterase og dodecylsulfat udeladt. I forsøg 2 og 3 blev henholdsvis dodecylsulfat og carboxylesterase udeladt. I forsøg 4 blev det fuldstændige reagens benyttet. De opnåede resultater udtrykt som genfindelse af de anvendte triglycerider i % i løbet af den ovenfor beskrevne, fastlagte reaktions-tid, er angivet i følgende tabel.

| <u>Forsøg</u> | <u>Esterase</u> | <u>Dodecylsulfat</u> | <u>% genfindelse</u> |
|---------------|-----------------|----------------------|----------------------|
| 1             | -               | -                    | 16                   |
| 2             | +               | -                    | 24                   |
| 3             | -               | +                    | 78                   |
| 4             | +               | +                    | 101                  |

De ovennævnte resultater viser, at under de anvendte betingelser med hensyn til lipasekoncentration er den anvendte kombination egnet til en kvantitativ bestemmelse.

#### P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmåde til bestemmelse af triglycerider i en vandholdig væske, såsom serum, ved enzymatisk forsæbning ved hjælp af lipase og måling af den frigjorte glycerol, k e n d e t e g n e t ved, at forsæbnin-

gen foretages i nærværelse af såvel lipase som carboxylesterase og et alkalimetal- eller jordalkalimetalalkylsulfat med 10-15 carbonatomer i alkylgruppen.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes 0,001-0,1 %vægt/vol alkylsulfat.

3. Reagens til gennemførelse af fremgangsmåden ifølge krav 1 eller 2 indeholdende enzymatisk lipase som forsæbningsmiddel, puffer og et system til påvisning af glycerol, k e n d e t e g n e t ved et indhold af såvel lipasen som carboxylesterase og et alkalimetal- eller jordalkalimetalalkylsulfat med 10-15 carbonatomer i alkylgruppen.

4. Reagens ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at det består af

0,1-10,0 mg lipase fra *Rhizopus arrhizus*,  
0,5-20,0 mg carboxylesterase,  
0,01-0,2 mg natriumdodecylsulfat,  
1-20 mM nikotinamid-adenin-dinucleotid i reduceret form,  
10-100 mM adenosintriphosphat,  
2-20 mM phosphoenolpyruvat,  
0,5-5 mg lactatdehydrogenase,  
0,2-5 mg phosphoenolkinase,  
0,05-10 mg glycerinkinase,  
0,1-2,0 mg serumalbumin,  
3-30 mM magnesiumioner og  
0,03-0,3 M pufferopløsning med pH-værdien 6-9, idet de an-

givne mængder refererer til 1 ml pufferopløsning med den angivne koncentration.

Fremdragne publikationer:

DE fremlæggelsesskrift nr. 2000127

SE patentansøgning nr. 7116097 (fremlæggelsesskrift nr. 389919).

144643

