



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP



- (21) Patentansøgning nr.: 3243/84
(22) Indleveringsdag: 02 jul 1984
(41) Alm. tilgængelig: 03 jan 1985
(44) Fremlagt: 12 feb 1990
(86) International ansøgning nr.: -
(30) Prioritet: 02 jul 1983 DE 3323949

(51) Int.Cl.⁵ G 01 N 33/96
G 01 N 33/48

- (71) Ansøger: *BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; Sandhofer Strasse 112-132; 6800 Mannheim, Waldhof, DE
(72) Opfinder: Joachim *Siedel; DE, Johnny *Staepels; DE, Joachim *Ziegenhorn; DE

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) Fremgangsmåde, middel og anvendelse af dette middel til hurtig og fuldstændig fjernelse af en uklarhed i en biologisk væske

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

3243-84

Uklarheder i biologiske væsker fjernes hurtigt og fuldstændigt gennem tilsætning af en blanding af overfladeaktive midler, der indeholder:

- a) et polyethoxylet triglycerid med en HLB-værdi fra 4 til 14,
- b) et sekundært n-alkansulfonat samt eventuelt
- c) et yderligere non- eller anionaktivt tensid

i vandig, eventuelt pufret opløsning. Blandingen af overfladeaktive midler kan desuden indeholde et eller flere salte til forøgelse af ionstyrken. Desuden en fremgangsmåde til fjernelse af uklarheder i biologiske væsker under anvendelse af denne blanding af overfladeaktive midler samt et middel til gennemførelse af fremgangsmåden, der indeholder de nævnte overfladeaktive midler.

Opfindelsen angår en fremgangsmåde, et middel og anvendelse af dette middel til hurtig og fuldstændig fjernelse af en uklarhed i en biologisk væske især i humant blodserum eller -plasma under anvendelse af overfladeaktive midler.

5 Uklarheder i humant blodserum fremkaldes af et for stort indhold af triglyceridrige lipoproteinpartikler såsom chylomikroner og VLDL ("Very Low Density Lipoproteins"). Der tales i sådanne tilfælde om "lipæmisk" eller "hyperlipoproteinæmisk" serum. Sådanne uklarheder udgør et væsent-

10 ligt problem for gennemførelsen af fotometriske analyser af serumbestanddele i den klinisk-kemiske diagnostik. Dette gælder især, når koncentrationen af den serumbestanddel, der skal bestemmes, er meget ringe såsom f.eks. koncentrationen af sporelementer, og der må, for at opnå en tilstrækkelig målenøjagtighed, tilsættes forholdsvis store serum-

15 mængder til analysereagenset (volumenforhold serum: analysereagens $\geq 0,15$). Her kan den af serumet i reagenset forårsagede uklarhed også allerede ved ringe lipæmigrad føre til overskridelse af fotometrets linearitetsområde og derved påvirke målingen væsentligt eller gøre den umulig.

20

Det har dog også vist sig, at forskellige immunologiske forsøgsmetoder især de, ved hvilke de via immunopræcipitationsreaktioner opståede uklarheder måles nefelometrisk eller turbidimetrisk, og ved hvilke forholdsvis ringe serum-

25 mængder er nødvendige i forsøgsopstillingen, kan forstyrres føleligt af særlige uklarheder i prøvematerialet. Som eksempel kan her nævnes den immunonefelometriske bestemmelse af serum-apolipoproteiner (Clin. Chem. 28, 1153-1158 (1982), Clin. Chem. 29, 120-125 (1983)) samt den radioimmunologiske

30 bestemmelse af β -choriogonadotropin og prostatacarboxyl-phosphatase (Clin. Chem. 28, 2325 (1982)).

Den fuldstændige fjernelse af uklarheder ("klaring") i lipæmisk serum er derfor af overordentlig betydning for den kliniske analyse.

5 Fra litteraturen kendes allerede forskellige fremgangsmåder og midler til fjernelse af uklarheder i biologiske væsker.

Således er der f.eks. i Clin. Chem. 29, 120-125 (1983) beskrevet en fremgangsmåde, ved hvilken serumuklarheder fjernes ved udrystning med en blanding af organiske opløsningsmidler. Denne metode nødvendiggør et yderligere trin i fremgangsmåden. Desuden kan den især ved stærk lipæmiske sera føre til ukontrollérbare volumenændringer af prøvematerialet og dermed til en forfalskning af måleresultaterne. Endelig er bestemmelsen af de serumbestanddele, der fjernes helt eller delvis ved ekstraktionen, ikke længere mulig ved anvendelse af denne fremgangsmåde.

20 Det samme gælder for en fremgangsmåde, ved hvilken de uklarhedsforårsagende lipoproteinpartikler udfældes fra serumet og fracentrifugeres ved tilsætning af polyanioner såsom phosphorwolframsyre/magnesiumchlorid (Clin. Chem. 28, 1153-1158 (1983)).

25 Af hensyn til målenøjagtigheden og lønsomheden af fotometriske serumanalyser er det hensigtsmæssigt at gennemføre klaringen direkte i det til bestemmelse af den foreliggende serumbestanddel anvendte analysereagens, og nærmere bestemt fuldstændigt og indenfor få minutter (≤ 10 min.) og sædvanligvis i temperaturområdet mellem 15 og 40°C.

30 En sådan fremgangsmåde, der dog delvis kun fører til formindskelse af uklarheden i en serum-eller plasmaprøve, kendes f.eks. fra DE-OS 23 27 894. Herved tilføres analysereagenset en polyoxyethyleret laurinsyreforbindelse i højere koncentrationer.

I DE-AS 27 24 757 er der beskrevet et middel til fjernelse af uklarheder i serum, der består af en vandig pufret opløsning af fedtsyrepolyethylenglycolestere samt kortkædede alifatiske alkoholer, glycoler eller polyethylenglycoler eller en fedtalkoholpolyglycolether. Dette middel er egnet til at klare uklare måleopløsninger ved et volumenforhold serum: reagens $\leq 0,1$ inden for få minutter. F.eks. opnås ved en opløsning med et volumenforhold af serum: reagens = 0,1 ved 20 til 25°C en fuldstændig klaring inden for 5 minutter efter gennemblanding. Ved et volumenforhold af serum: reagens $\geq 0,15$ kræves dog en væsentlig længere tid til klaring af måleopløsningen. Til fjernelse af uklarheden i en opløsning med et volumenforhold af serum: reagens = 0,16 kræves allerede 30 minutter.

Fra Z..Klin. Chem. Klin. Biochem. 3, 96-99 (1965) kendes en fremgangsmåde til transferrin-jernbestemmelse i serum, hvorved analysereagenset tilsættes et sekundært alkylsulfat ("Teepol 610 S", Shell AG) i høj koncentration. Ved sammenblanding af 0,5 ml serum og 1,4 ml reagens opnås en fuldstændig uklarhedsfjernelse efter 15 minutter ved stuetemperatur.

I EP-OS 0041704 foreslås endelig at opløse chylomikroner i vandigt medium ved hjælp af en blanding af en polyethylenglycolether af en alkanol eller en alkylarylalkohol med forgrenet alkankæde og en HLB-værdi på 12 til 14, et sekundært alkylsulfonat med 10 til 20 C-atomer i molekylet samt eventuelt et alkali-p-toluensulfonat. Efterprøvningen af et i EP-OS 0041704 som særligt egnet beskrevet middel (middel ifølge eksempel 2) gav som resultat, at det ikke dermed er muligt ved et stærkt lipemisk serum og et volumenforhold af serum: reagens $\geq 0,2$ ved 25°C at opnå en fuldstændig klaring inden for 30 minutter.

De hidtil kendte metoder til fjernelse af uklarheder i biologiske væsker udviser således alle til dels betragtelige ulemper, der i det væsentlige beror på:

- 5 a) nødvendigheden af en serumforbehandling i et yderligere trin i fremgangsmåden

eller, såfremt klaringen foregår direkte i analysereagenset,

- b) en begrænset klaringsformåen af det anvendte middel,

- c) en utilstrækkelig klaringshastighed (> 10 min.) samt

- 10 d) et indskrænket pH-og temperaturområde, i hvilket den anvendte fremgangsmåde eller det anvendte middel er virksomt, f.eks. når der til understøttelse af den klarende virkning desuden tilsættes lipolytisk aktive enzymer (lipaser).

15 Yderligere findes der i de anførte litteratursteder ingen henvisninger til, at der i det respektivt anvendte klaringsreagens også uden forstyrrelser kan gennemføres antigen-antistofreaktioner såsom ved immunopræcipitationsanalyser af serum-apolipoproteiner.

20 For at undgå forstyrrelser gennem serumuklarheder ved den immunonefelometriske bestemmelse af et serumprotein, især et apolipoprotein, foreslås i DE-OS 28 29 531 en fremgangsmåde, ved hvilken immunreaktionen enten gennemføres i nærværelse af et meget lavkoncentreret kationisk tensid (10^{-3} til 10^{-1} vol.%) eller i nærværelse af et meget lavkoncentreret non-ionisk tensid (10^{-3} til 10^{-1} vol.%) og et lipolytisk aktivt enzym. Da der derved kun skal tilføres meget ringe serummængder til forsøgsopstillingen, behøver man ikke at stille store krav til det anvendte middels klaringsformåen.

25

Ved analoge immunoturbidimetriske målinger er væsentligt højere serumkoncentrationer nødvendige i forsøgsopstillingen. I DE-OS 28 29 531 siges intet om tensidernes virkning ved disse forøgede serumkoncentrationer. Det nævnes
5 dog, at ved tensidkoncentrationer over 0,1 vol.% hæmmes den immunologiske reaktion mellem antistof og antigen (i det foreliggende tilfælde apolipoproteinet).

Der er derfor behov for en fremgangsmåde og et middel, som også ved volumenforhold af serum: analysereagens $\geq 0,15$ bevirker en fuldstændig og varig klaring af serumuklarheder.
10 Klaringen bør derved foregå hurtigst muligt og fortrinsvis i løbet af mindre end 10 minutter. Virkningen bør være sikker over et størst muligt pH- ($3 \leq \text{pH} \leq 9$) og temperaturområde ($15 \leq T \leq 37^{\circ}\text{C}$). Ved siden af den nøjagtige bestemmelse af spor-
15 elementer skal fremgangsmåden og reagenset især også muliggøre den uforstyrrede analyse af proteiner såsom apolipoproteiner med immunoturbidimetriske målemetoder, selv ved anvendelse af stærkt lipæmiske sera. Endelig bør det til grund for fremgangsmåden liggende middel være lagerstabil
20 over et langt tidsrum, dvs. mindst et år ved stuetemperatur.

Grundlaget for opfindelsen var at tilfredsstille dette behov. Dette opnås ved en fremgangsmåde til fjernelse af uklarheder i biologiske væsker under tilsætning af overfladeaktive midler, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved,
25 at der som overfladeaktivt middel anvendes:

- a) et polyethoxylet triglycerid med en HLB-værdi fra 4 til 14,
- b) et sekundært n-alkansulfonat samt eventuelt
- 30 c) et yderligere non-eller anionisk tensid

i vandig, eventuelt pufret opløsning.

Som polyethoxyleret triglycerid kan der f.eks. anvendes polyethoxyleret triolein (f.eks. "Tagat"[®] TO, Fa. Goldschmidt AG, HLB-værdi 11,3) eller polyethoxyleret ricinusolie (f.eks. "Mulsifan"[®] RT 7 eller "Mulsifan"[®] RT 163, Fa. Zschimmer og Schwarz, HLB-værdi henholdsvis ca. 10 og 6). Der opnås særligt gode resultater, såfremt man anvender et polyethoxyleret triglycerid, der udvindes ved omsætning af ethylenoxid og ricinusolie i autoklaver under alkalisk katalyse. Det på denne måde fremstillede produkt indeholder gennemsnitligt 10 oxyethylenenheder pr. molekyle og fås i handelen under benævnelsen "Mulsifan"[®] RT 163.

HLB-værdien (hydrophilic-lipophilic-balance), at de ifølge opfindelsen anvendelige polyethoxylerede triglycerider, kan bestemmes efter kendte fremgangsmåder, se f.eks. Stache "Tensid-Taschenbuch," Carl-Hanser-Verlag, München, Wien 1979, side 70-72.

Koncentrationen af de polyethoxylerede triglycerider i den vandige, pufrede opløsning andrager 0,5 til 15, fortrinsvis 1,0 til 12, især 2 til 9 vægtprocent.

Som sekundære n-alkansulfonater anvendes fortrinsvis forbindelser med 12 til 19 carbonatomer i molekylet som rene stoffer eller som blandinger af forskellige n-alkansulfonater med overvejende 12 til 19 carbonatomer i molekylet. De sekundære n-alkansulfonater anvendes fortrinsvis som natriumsalte. Som særligt gunstig ifølge opfindelsen har vist sig et sekundært n-alkansulfonat (Na-salt), der fremstilles ved sulfoxidering af n-paraffiner og udviser en carbonkædefordeling på:

30	< C ₁₃ -n-paraffin = max. 1%
	C ₁₃ - C ₁₅ -n-paraffin = ca. 58%
	C ₁₆ - C ₁₇ -n-paraffin = ca. 39%
	> C ₁₇ -n-paraffin = max. 3%

Et sådant produkt findes i handelen som vandholdig pasta med en andel af virksomt stof på 60% under navnet "Hos-tapur"[®] AT (Fa. Hoechst AG).

5 Det sekundære n-alkansulfonat, der skal anvendes ifølge opfindelsen, er indeholdt i den vandige, eventuelt pufrede opløsning i en koncentration på 0,5 til 10, fortrinsvis 1,0 til 7, især 1,2 til 4,8 vægtprocent i forhold til det rene virksomme stof.

10 Blandinger af de ifølge opfindelsen polyethoxylerede triglycerider og sekundære n-alkansulfonater i vandig, eventuelt pufret opløsning bevirker allerede som sådanne en tilstrækkelig hurtig klaring af uklare sera. Til yderligere forøgelse af klaringshastigheden har det dog vist sig gunstigt at tilføre disse blandinger et yderligere non-
15 eller anionisk tensid.

Som eventuelt ~~tilsæt~~ yderligere non-ioniske tensider kommer ligekædede eller forgrenede alkyl-eller alkylarylpolyglycolethere med lav oxyetyleringsgrad (gennemsnitligt 3 til 7 oxyethylenenheder pr. molekyle) på tale. Der fore-
20 trækkes en iso-decanolpolyglycolether med gennemsnitligt 5 oxyethylenenheder pr. molekyle ("Lütensol"[®] ON 50, BASF).

Som anioniske tensider egner sig alkylarylsulfonater, sekundære alkylsulfater eller blandinger af alkansulfonater med 13 til 15 carbonatomer i molekylet og 40 til
25 50% sekundær andel ("Mersolat"[®], Bayer AG). Særligt foretrækkes natriumdodecylbenzensulfonat (omsættes i handelen f.eks. som "Elfan"[®] WA 50 med et indhold af virksomt stof på 50% af Fa. Akzo).

Herved har koncentrationer i den vandige, eventuelt pufrede opløsning på 0,2 til 5, fortrinsvis 0,5 til 3, især
30 1 til 2 vægtprocent med hensyn til det rene virksomme stof i alle tilfælde vist sig gunstige.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen lader sig gennemføre ved, at man blander de enkelte bestanddele, dvs. vand eller eventuelt vandig pufferopløsning, overfladeaktive midler og biologisk væske efter hinanden.

- 5 Hensigtsmæssigt anvendes dog en i forvejen færdig blanding af det overfladeaktive middel i en vandig, eventuelt pufret opløsning, der tilsættes den biologiske væske i en mængde, der fører til en hurtig og fuldstændig fjernelse af uklarheden. Sædvanligvis er det til fuldstændig fjernelse af uklarheden tilstrækkeligt med mængder på 0,5 til 2 ml af midlet ifølge opfindelsen i 0,2 ml serum.

- 15 pH-værdien af blandingen kan vælges inden for vide grænser. Uklarheder ved pH-værdier fra 3 til 9 kan uden videre fjernes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen. Til indstilling af pH-værdien kan anvendes alle gængse pufferforbindelser, hvis pK-værdi ligger mellem 2,0 og 10,0. Især foretrækkes succinat-, acetat-, phosphat- eller trispuffer. Pufferkoncentrationen andrager hensigtsmæssigt 5 til 250 mM, især 10 til 170 mM.

- 20 Klaringshastigheden lader sig indtil en vis grænse påvirke gunstigt gennem en forøgelse af ionstyrken i det vandige, eventuelt pufrede medium. Det har dér vist sig fordelagtigt at tilsætte den biologiske væske eller detergentblandingen et salt, f.eks. natriumchlorid, eller flere salte ved fravær af pufferforbindelse eller ved lave pufferkoncentrationer (5 til 20 mM). Koncentrationen af tilsat salt andrager fortrinsvis 50 til 200 mM, især 50 til 150 mM.

- 30 Uklarhedsfjernelsen kan ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen gennemføres i et bredt temperaturinterval ($15^{\circ}\text{C} \leq T \leq 40^{\circ}\text{C}$). Fortrinsvis arbejdes ved temperaturer mellem 20 og 37°C .

En yderligere genstand for opfindelsen er et middel til hurtig og fuldstændig fjernelse af en uklarhed i en biologisk væske, især humant blodserum eller-plasma, der er ejendommeligt ved, at det indeholder:

- 5 a) et polyethoxylet triglycerid med en HLB-værdi fra 4 til 14,
 - b) et sekundært n-alkansulfonat samt eventuelt
 - c) et yderligere non-eller anionisk tensid
- 10 i vandig, eventuelt pufret opløsning.

Midlet ifølge opfindelsen indeholder hensigtsmæssigt i vandig, pufret opløsning:

- a) 0,5 til 15, fortrinsvis 1,0 til 12 vægtprocent polyethoxylet triglycerid med en HLB-værdi fra 4 til 14,
- 15 b) 0,5 til 10, fortrinsvis 1,0 til 7 vægtprocent sekundært n-alkansulfonat samt eventuelt
- c) 0,2 til 5, fortrinsvis 0,5 til 3 vægtprocent af et yderligere non-eller anionisk tensid.

Særligt foretrukket er et middel med følgende sammensætning:

- 20 a) 2 til 9 vægtprocent polyethoxylet triolein eller ricinusolie,
- b) 1,2 til 4,8 vægtprocent af et sekundært n-alkansulfonat med 12 til 19 carbonatomer i molekylet eller
- 25 en blanding af forskellige sekundære n-alkansulfonater med overvejende 12 til 19 carbonatomer i molekylet samt eventuelt

- c) 1 til 2 vægtprocent af en ligekædet eller forgrenet alkyl-eller alkylarylpolyglycolether med gennemsnitligt 3 til 7 oxyethylenenheder pr. molekyle, et alkylarylsulfonat, et sekundært alkylsulfonat eller en blanding af alkansulfonater med 13 til 15 carbonatomer i molekylet og 40 til 50% sekundær andel

i vandig, eventuelt pufret opløsning.

Som puffer kan midlet ifølge opfindelsen indeholde alment kendte pufferstoffer, hvis pK-værdi ligger mellem 2,0 og 10,0. Særligt foretrukne er succinat-, acetat-, phosphat- eller trispuffere. Pufferkoncentrationen andrager 5 til 250, fortrinsvis 10 til 170 mM.

Midlet ifølge opfindelsen kan endvidere indeholde et salt, f.eks. natriumchlorid, eller flere salte til forøgelse af ionstyrken. Saltkoncentrationen andrager fortrinsvis 50 til 200 mM, især 50 til 150 mM.

Foruden de nævnte komponenter kan reagenset indeholde yderligere stoffer, der er nødvendige til den fotometriske analyse af en bestemt serumbestanddel. I tilfælde af sporelementanalyser såsom serum-transferrin-jern kan disse være et reduktionsmiddel såsom ascorbinsyre samt farvekompleksdannere såsom bathophenantrolindisulfonsyre, "Ferrozine"® eller andre forbindelser af ferroin-typen.

Til den immunoturbidimetriske eller -nephelometriske bestemmelse af serumbestanddele såsom f.eks. apolipoproteiner og underenheder deraf samt immunologisk aktive apolipoproteinspaltningsstykker, kan reagenset som yderligere komponenter indeholde antistoffer f.eks. i form af et antiserum, den deraf udvundne γ -globulin- eller IgG-fraktion eller også

monoklone antistoffer samt et stof, der fremmer immunopræcipitationsreaktionen såsom polyethylenglycol med en molekylvægt mellem 1.000 til 10.000, fortrinsvis 6.000 i en koncentration på 1 til 6, fortrinsvis 3 til 4 vægtprocent.

- 5 Fremgangsmåden og midlet ifølge opfindelsen til hurtig og fuldstændig fjernelse af uklarheder i biologiske væsker er med hensyn til den opklarende virkning de kendte fremgangs-
- 10 måder og tilgængelige midler tydeligt overlegen, især ved volumenforhold af serum: reagens $\geq 0,15$. Overlegenheden viser sig særligt tydeligt ved analyse af sporelementer i serum, f.eks. bestemmelsen af jern i serum. For at opnå en tilstrækkelig målenøjagtighed, må der herved anvendes store serum-
- 15 mængder i forhold til analysereagenset, dvs. der må i måleopløsningen regnes med et højt lipidindhold og dermed en forstærket uklarhedstilskyndelse. Gennem den høje klaringshastighed lader analyser af bestemte bestanddele også i stærkt lipemiske sera sig gennemføre inden for maksimalt 10 minutter efter blanding af serum og reagens, hvad der er særligt vigtigt for den automatiserede analyse.
- 20 Derudover er det overraskende, at der til trods for den i sammenligning med midlet ifølge DE-OS 28 29 531 høje detergentkoncentration i det beskrevne reagens upåklageligt også kan gennemføres immunologiske bestemmelser af serumbestanddele via antigen-antistof-præcipitationsreaktioner.
- 25 Fremgangsmåden og reagenset ifølge opfindelsen lader sig her også på fordelagtig måde anvende ved sådanne immunopræcipitationsreaktioner, f.eks. ved den immunologiske bestemmelse af serum-apolipoproteiner eller underenheder deraf eller af immunologisk aktive apolipoproteinbrudstykker.

De vedlagte figurer fremstiller:

Fig. 1: Hastighed af uklarhedsfjernelsen i et stærkt lipæmisk serum med forskellige klaringsmidler ifølge eksempel 1.

5 A: Reagens A = middel ifølge EP-OS 0 041 704.

B: Reagens B = midlet ifølge opfindelsen.

C: Reagensblindværdi.

Volumenforhold serum: Analysereagens = 0,2,

temperatur = 25°C, λ = 578 nm, lagtykkelse = 1 cm.

10 Fig. 2: Immunoturbidimetrisk bestemmelse af serum-apolipoprotein A-I (APO A-I). Justeringskurve ud fra standardserumfortyndingsrække. Måling svarende til eksempel 3.

15 Fig. 3: Immunoturbidimetrisk bestemmelse af serum-apolipoprotein A-II (APO A-II). Justeringskurve ud fra standardserumfortyndingsrække. Måling svarende til eksempel 3.

Fig. 4: Immunoturbidimetrisk bestemmelse af serum-apolipoprotein B (APO B). Justeringskurve ud fra standardserumfortyndingsrække. Måling svarende til eksempel 3.

De følgende eksempler belyser opfindelsen yderligere..

20 Eksempel 1

Klaringshastighed af et lipæmisk serum med forskellige reagenser, der indeholder overfladeaktive midler.

1. Reagenser

Reagens A (middel ifølge EP-OS 0 041 704)

Indholdsstof	Koncentration
"Mersolat" [®] H 30% i H ₂ O	150 ml/l
"Triton" [®] X 151 30% i H ₂ O	200 ml/l
p-toluensulfonsyre, Na-salt	258 mmol/l

- 5 "Mersolat"[®] H = en i handelen værende blanding af sekundære alkansulfonater med 13 til 15 carbonatomer og 40 til 50% sekundær andel.

"Triton"[®] X 151 = isooctylphenolpolyethylenglycolether.

Reagens B (middel ifølge opfindelsen)

10	Indholdsstof	Koncentration
	"Mulsifan" [®] RT 163	90,00 g/l (=9,0 vægtprocer
	"Hostapur" [®] AT	80,00 g/l (=4,8 vægtprocer
	"Elfan" [®] WA 50	40,00 g/l (=2,0 vægtprocer
	Natriumacetatpuffer (pH 5,4)	170 mmol/l.

15 2. Forsøgsgennemførelse.

I en 1 cm's kuvette blandes ved 25°C 0,2 ml stærkt lipæmisk serum med henholdsvis 1 ml reagens A eller reagens B. Ændringen af ~~lysgennemtrængningen~~ ved 578 nm bestemmes i afhængighed af tiden. De opnåede resultater er vist grafisk i fig. 1.

20 3. Vurdering.

Det i fig. 1 viste forløb af ændringen i ~~lysgennemtrængningen~~ viser, at ved et forhold serum: analysereagens = 0,2 opnås med midlet ifølge opfindelsen (reagens B) allerede efter 2 minutter en fuldstændig fjernelse af uklarheden. Med reagenset ifølge EP-OS 0 041 704 er uklarheden selv efter 30 minutter ikke fuldstændigt fjernet.

25

Eksempel 2 (anvendelseseksempel):Bestemmelse af jern i serum

1. Reagenser

1.1 Blindværdireagens

5	Indholdsstof	Koncentration
	"Mulsifan" [®] RT 163	90,00 g/l (=9,0 vægtprocent)
	"Hostapur" [®] AT	80,00 g/l (=4,8 vægtprocent)
	"Elfan" [®] WA 50	40,00 g/l (=2,0 vægtprocent)
	Natriumacetatpuffer (pH 5,4)	170 mmol/l
10	Ascorbinsyre	10 mmol/l

1.2 Farvereagens

	Indholdsstof	Koncentration
	"Mulsifan" [®] RT 163	90,00 g/l (=9,0 vægtprocent)
	"Hostapur" [®] AT	80,00 g/l (=4,8 vægtprocent)
15	"Elfan" [®] WA 50	40,00 g/l (=2,0 vægtprocent)
	Natriumacetatpuffer (pH 5,4)	170 mmol/l
	Ascorbinsyre	10 mmol/l
	"Ferrozine" [®] 1)	1,6 mmol/l

1) Indregistreret varemærke for Hach Chemical Co., Ames, Iowa,
 20 U.S.A.

2. Forsøgsopstilling

Temperatur: 37°C, bølgelængde: 578 nm, lagtykkelse: 10 mm.
 Følgende opløsninger pipetteres over i jernfrie reaktionsbeholdere:

	Prøve	Prøveblindværdi
Farvereagens	1,00 ml	-
Blindværdireagens	-	1,00 ml
Serum	0,20 ml	0,20 ml

- 5 Der blandes i hvert tilfælde, inkuberes 10 minutter, hvorefter der måles absorption af prøven mod en blanding af 1,00 ml farvereagens og 0,20 ml H_2O (ΔA_1) samt af prøveblindværdien mod en blanding af 1,00 ml blindværdireagens og 0,20 ml H_2O (ΔA_2). Derudfra beregnes $\Delta A = \Delta A_1 - \Delta A_2$.

10 3. Vurdering

Koncentrationen af jern i serum beregnes efter følgende ligning:

$$\text{Koncentration af jern i serum } (\mu\text{g}/100 \text{ ml}) = \Delta A \times 1330.$$

- 15 I stedet for "Mulsifan"[®] RT 163 kan der i reagenserne 1.1 og 1.2 anvendes "Mulsifan"[®] RT 7 i de samme mængder, uden at resultatet ændrer sig. Ligeledes kan "Elfan"[®] WA 50 (Na-dodecylbenzensulfonat, 50% virksomt stof i vandig opløsning) erstattes af samme koncentration (med hensyn til andel af virksomt stof), sekundært alkylsulfat ("Teepol"^R 610 S, Fa. 20 Shell) (8 til 18 carbonatomer i molekylet). I alle tilfælde er klaringen ved anvendelsen af lipemisk serum afsluttet og fuldstændig inden for inkubationsperioden.

Eksempel 3 (anvendelseseksempel)

Bestemmelse af apolipoproteiner (A-I, A-II og B) i serum.

25 1. Reagenser

1.1 Fåre-anti-human apo-A-I-antiserum (γ -globulinfraktion, Boehringer Mannheim GmbH, kat.-nr. 726 478).

1.2 Fåre-anti-human apo-A-II-antiserum (γ -globulinfraktion, Boehringer Mannheim GmbH, kat.-nr. 726 486).

1.3 Fåre-anti-human apo-B-antiserum (γ -globulinfraktion, Boehringer Mannheim GmbH, kat.-nr. 726 494).

5 1.4 Antiserumfortyndingsmiddel

Sammensætning

	Indholdsstof	Koncentration
	"Mulsifan" [®] RT 163	20 g/l (=2,0 vægtprocent)
	"Hostapur" [®] AT	20 g/l (=1,2 vægtprocent)
10	"Lutensol" [®] ON 50	10 g/l (=1,0 vægtprocent)
	Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4)	10 mmol/l
	NaCl	150 mmol/l
	Polyethylenglycol 6000	40 g/l

15 1.5 Prøvefortyndingsmiddel (til serum eller standard): kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) 10 mmol/l, NaCl 150 mmol/l.

1.6 Standardserum ("Immunoneph"[®] referencestandard, Immuno GmbH, kat.-nr. 4380105).

2. Antiserum-, standardserum- og serumfortynding.

20 2.1 Antiserumfortynding

Antiserum (1.1, 1.2 eller 1.3) fortyndes hver 10 gange med serumfortyndingsmiddel 1.4. Før brug henstilles de 15 minutter ved 20-25°C.

2.2 Standardserumfortynding

Standardserum (1.6) fortyndes 5, 10, 20, 40 og 80 gange med prøvefortyndingsmiddel. (1.5.).

2.3 Serumfortynding

- 5 Til apo A-I-bestemmelse fortyndes serum 20 gange og til apo A-II- eller apo B-bestemmelse fortyndes serum 10 gange med prøvefortyndingsmiddel (1.5.).

3. Forsøgsopstilling (til enten apo A-I, apo A-II eller apo-B).

- 10 Temperatur: 25°C, bølgelængde: 366 nm, lagtykkelse: 10 mm.

I reaktionsbeholdere pipetteres:

	Prøve	Prøveblindværdi
	Antiserumfortynding 2,00 ml	-
	Antiserumfortyndingsmiddel -	2,00 ml
15	Serum- eller standard- 0,10 ml	0,10 ml
	serumfortynding	

- 20 Der blandes, inkuberes 2,5 timer, omrystes kortvarigt og derefter måles absorptionen af prøven mod en blanding af 2,00 ml antiserumfortynding og 0,10 ml prøvefortyndingsmiddel (ΔA_1) samt af prøveblindværdien mod en blanding af 2,00 ml antiserumfortyndingsmiddel og 0,10 ml serum- eller standardfortynding (ΔA_2). Derudfra beregnes $\Delta A = \Delta A_1 - \Delta A_2$.

4. Vurdering

Koncentrationen af enten apo A-I, apo A-II eller apo B

med Δ A fastsættes ud fra de med standardfortyndingsrækken opstillede referencekurver.

Typiske referencekurver opnået med disse forsøgsfremgangsmåder er vist i fig. 2-4.

- 5 I stedet for "Mulsifan"[®] RT 163 kan der i antiserumfortyndingsmiddel 1.4 også anvendes "Mulsifan"[®] RT 7 eller polyethoxylet triolein (f.eks. "Tagat"[®] TO) i samme mængder, uden at resultaterne ændrer sig. Klaringen af lipæmiske sera er i alle tilfælde afsluttet fuldstændigt i løbet af kort tid
- 10 (ca. 1 minut), hvilket kan fastsættes ud fra prøveblindværdiopstillingen.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåde til fjernelse af uklarheder i biologiske væsker gennem tilsætning af overfladeaktive midler, k e n d e t e g n e t ved, at der som overfladeaktive midler anvendes:
- 5
- a) et polyethoxyleret triglycerid med en HLB-værdi fra 4 til 14,
 - b) et sekundært n-alkansulfonat samt eventuelt
 - c) et yderligere non- eller anionaktivt tensid
- 10 i vandig, eventuelt pufret opløsning.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes en puffer med en pK-værdi mellem 2,0 og 10,0.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at der som puffer anvendes en succinat-, acetat-, phosphat-
- 15 eller trispuffer i en koncentration fra 5 til 250 mM.
4. Fremgangsmåde ifølge et af kravene 1-3, k e n d e t e g n e t ved, at der til forøgelse af ionstyrken tilsættes mindst ét salt.
5. Middel til fjernelse af en uklarhed i en biologisk væske, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder:
- 20
- a) etpolyethoxyleret triglycerid med en HLB-værdi fra 4 til 14,
 - b) et sekundært n-alkansulfonat samt eventuelt
 - c) et yderligere non- eller anionaktivt tensid

i vandig, eventuelt pufret opløsning.

6. Middel ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder en puffer med en pK-værdi mellem 2,0 og 10,0.
7. Middel ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at
5 det som puffer indeholder en succinat-, acetat-, phosphat- eller trispuffer i en koncentration fra 5 til 250 mM.
8. Middel ifølge et af kravene 5-7, k e n d e t e g n e t ved, at det til forøgelse af ionstyrken indeholder mindst ét salt.
- 10 9. Anvendelse af et middel ifølge et af kravene 5-8 til immunologisk bestemmelse af serum-apolipoproteiner.
10. Anvendelse af et middel ifølge krav 9, k e n d e t e g n e t ved, at den immunologiske bestemmelse foregår ved turbidimetrisk eller nefelometrisk måling af uklarheden, der
15 opstår under immunopræcipitationsreaktionen mellem apolipoprotein og dets antistof.

FIG. 1

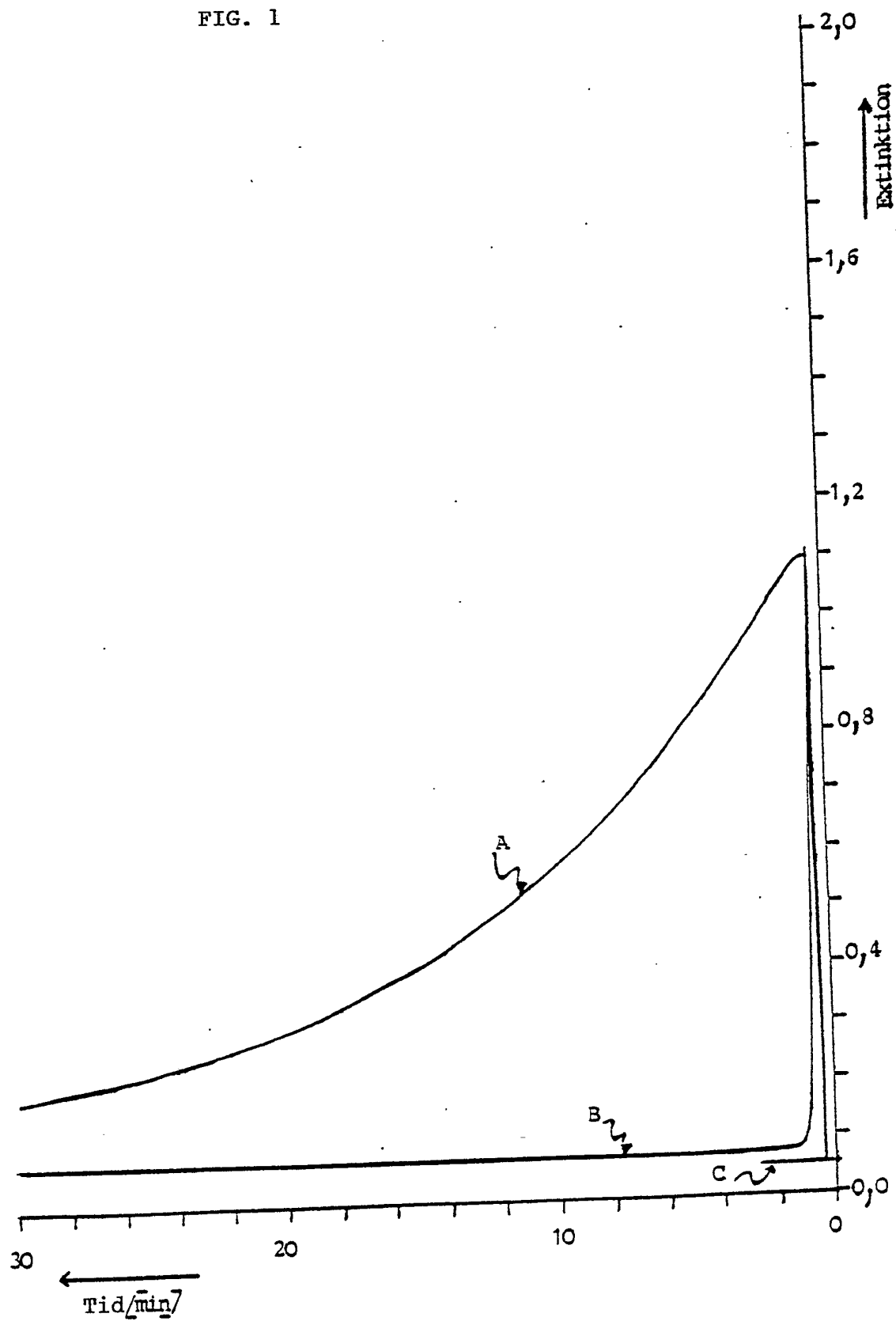


FIG..2

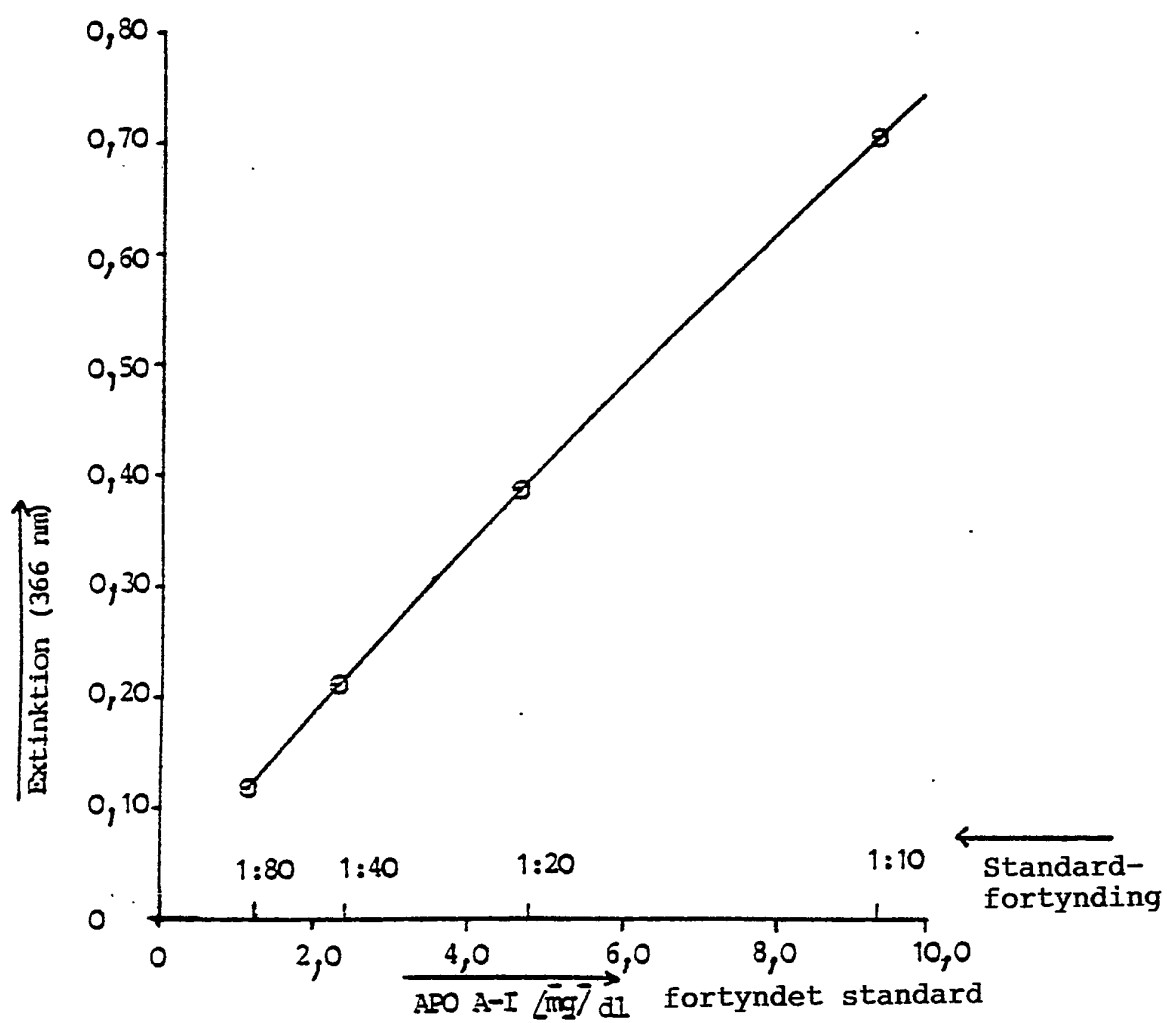


FIG. 3

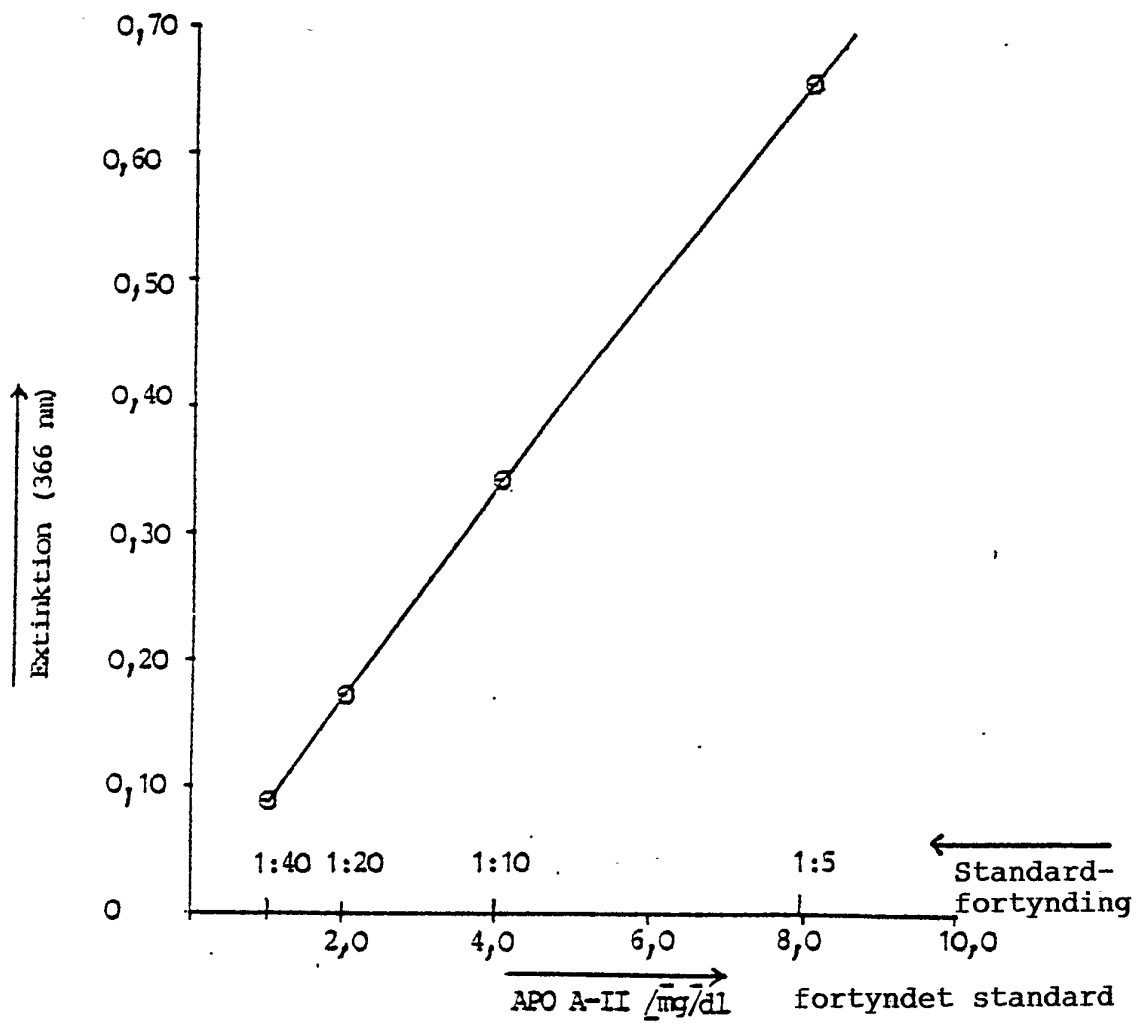


FIG. 4

