



**SUOMI—FINLAND**

**(FI)**

**Patentti- ja rekisterihallitus  
Patent- och registerstyrelsen**

[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU  
UTLÄGGNINGSSKRIFT 63637**

C (45) Patentti myönnetty 11 07 1983  
Patent meddelat

(51) Kv.lk.<sup>3</sup>/Int.Cl.<sup>3</sup> G 01 N 31/22, 33/16

(21) Patentihakemus — Patentansöknin	781015
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	03.04.78
(23) Alkupäivä — Giltighetsdag	03.04.78
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig	10.10.78
(44) Nähtävöispanon ja kuul.julkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.03.83
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	09.04.77

Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken  
Tyskland(DE) P 2716060.7

(71) Boehringer Mannheim GmbH., Mannheim-Waldhof, Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE)

(72) Walter Rittersdorf, Mannheim-Waldhof, Hugo Tiedemann, Mannheim-Wallstadt, Wolfgang Werner, Mannheim-Vogelstang, Hans Wielinger, Mannheim-Waldhof, Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE)

(74) Berggren Oy Ab

(54) Hapetusindikaattoreita sisältäviä stabiloituja pikadiagnostisia välineitä - Stabiliserade snabbdiagnostiska medel innehållande oxideringsindikatorer

Tämä keksintö koskee parannettuja pikadiagnostisia välineitä hydroperoksidien tai aineiden, joiden reagoidessa vapautuu hydroperoksijedeja, samoin peroksidaasin tai peroksidaattisesti vaikuttavien aineiden osoittamiseksi kehon nesteissä, jotka välineet sisältävät kromogeenina hapetusindikaattoreita, erityisesti pikakokeita glukoosin osoittamiseksi virtsassa ja veressä sekä veren osoittamiseksi virtsassa, ulosteessa ja kehon nesteissä.

Pikadiagnostiset välineet ovat viime aikoina saavuttaneet lääkäripraktiikassa ja kliinisessä työskentelyssä yhä suuremman merkityksen, erityisesti pikakokeissa, jotka perustuvat imukykyisten kantajien käyttöön. Näihin imukykyisiin kantajiin, useimmiten papereihin, imeytetään osoittamisreaktiossa tarvittavia reagensseja ja näissä on todettavissa, yksinkertaisen kehon nesteisiin kastamisen jälkeen, osoitettavan aineen läsnäollessa värireaktio. Pikakokeet, jotka ovat saavuttaneet lääketieteellisessä diagnostiikassa suuren merkityksen, ovat ennen kaikkea pikakokeita glukoosin osoittamiseksi virtsassa ja veressä sekä veren osoittamiseksi virtsassa, ulosteessa ja kehon nesteissä.

Nämä kokeet perustuvat tällöin seuraavaan periaatteeseen: pikakokeissa glukoosin osoittamiseksi kehon nesteissä, esim. glukoosioksidasi (GOD) hapettaa glukoosin glukonihapoksi, jolloin ilman happi pelkistyy vetyperoksidiksi. Vetyperoksidi hapettaa sitten peroksidaasin tai peroksidaattisesti vaikuttavan aineen välityksellä hapetusindikaattorin vastaavaksi väriaineeksi, jonka värin syvyys on läsnä olevan glukoosimäärän mittana.

Veren läsnäoloa osoitettaessa käytetään hyväksi hemoglobiinin peroksidaattimaista ominaisuutta hapetusindikaattorin hapettamiseksi hydroperoksidin avulla.

Edellä mainituissa pikakokeissa käytettävät hapetusindikaattorit ovat yleisesti tunnettuja ja sijoitettavissa määrättyihin yhdisteluokkiin. Erityisen käytettyjä ovat bentsidiinisarjaa edustavat yhdisteet, heterosykliset atsiinit, samoin kuin fenoliyhdisteet, erityisesti guajak-hartsin aineosat.

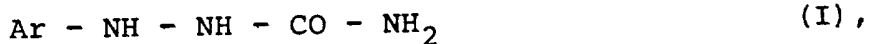
Luonteeltaan hapetusindikaattorit ovat helposti hapettuvia aineita. Sen vuoksi ei ole yllättävää, että ne voivat hapettua ilman vaikutuksesta, erityisesti valolle alttiina ollessaan. Arvokkaita hapetusindikaattoreita ei näistä syistä voida ilman muuta käyttää pikadiagnostisissa välineissä koska ne heikentävät suuresti niiden säilyvyyttä.

Tehtävänä oli sen vuoksi sopivan suojan löytäminen näille hapetusindikaattoreille, jotta niitä voitaisiin käyttää hyväksi myöskin pikadiagnostiikassa ilman, että käytettävillä stabilisaattorimäärillä olisi haitallista vaikutusta kokeen herkkyydelle. Aineiden, joiden tulisi kyetä antamaan tällaisen suojan, olisi puolestaan oltava riittävän stabiileja eivätkä ne saisi kontrolloimattomissa olevalla tai oleellisella tavalla muuttaa koepaperin herkkyyttä.

Yllättäen l-aryylisemikarbatsidien yhdisteluokasta löydettiin sarja yhdisteitä, jotka erinomaisella tavalla tuottavat toivotun vaikutuksen.

Tämän keksinnön kohteena ovat siten koeliuskat hydroperoksidien tai aineiden, jotka reagoidessaan vapauttavat hydroperoksidia, samoin kuin peroksidaasin tai peroksidaattimaisesti vaikut-

tavien aineiden osoittamiseksi kehon nesteissä, jonka koeliuskan muodostaa hapetusindikaattorilla imeytetty kantaja. Keksintö on tunnettu siitä, että stabilisaattori on l-aryylisemikarbatsidi, jonka yleiskaava I on



jossa Ar merkitsee mahdollisesti alkyyli-, alkoksi- tai halogeeni-substituentin sisältävää aryylihdettä.

Aryyllillä tarkoitetaan lähinnä fenyyli- tai naftyylihdettä; alkyyli- ja alkoksiryhmissä voi olla 1-4 hiiliatomia, jolloin ensisijaisia ovat metyyli- ja etyylihdet. Halogeeni voi merkitä fluoria, klooria tai bromia, lähinnä klooria.

Keksinnön lisäkohteena on kaavan I mukaisten yhdisteiden käyttö hapetusindikaattorilla imeytettyjen koeliuskojen stabiloimiseksi.

On yllättävää, että juuri l-aryylisemikarbatsidien yhdisteluokalla on erinomaiset edulliset ominaisuudet. On tosin ollut tunnettua, että näillä yhdistellillä hydratsiinien johdannaisina on pelkistäviä ominaisuuksia; on kuitenkin osoittautunut, että pelkistysaineet eivät automaattisesti sovellu tähän tarkoitukseen, hapetusindikaattorien stabilointiin vaikuttamatta oleellisesti niiden herkkyyteen. Siten esim. sarjan perusyhdiste, semikarbatsidi, ei sovellu tähän tarkoitukseen.

Jo pitkähkön ajan on esitetty selostuksia muista pelkistysaineista, kuten askorbiinihaposta, hydrokinonista ja muista yhdisteistä reaktioiden herkkyyden "modifiointiaineina" (vrt. DT-AS 1129003, US-patentti n:o 3 008 879, DT-OS 2555704), mutta mitään näistä yhdisteistä ei kuitenkaan ole käytetty käytännön sovellutuksissa, koska ne toisaalta ovat liian epästabiileja ja toisaalta tämän käytön aikana esiintyvän epästabiilisuuden seurauksena kokeen herkkyyks muuttuu epäedulliseksi. Myöskään tunnetut antioksidantit kuten esim. nordihydroguajarethappo, N-fenyyli-naftyyliamiinit tai merkaptoyhdisteet samoin kuin US-patentissa n:o 2 008 879 ja DT-OS 2555704 esitetyt yhdisteet eivät erikoisemmin sovellu tarkoitukseen, koska ne joko ovat pikadiagnostiikassa käytettävien indikaattorien yhteydessä tehottomia tai liian epästabiileja tai vaikuttavat liian voimakkaasti reaktiokykyyn.

Keksinnön mukaisten stabilisaattorien edullista käyttöä koesuikaleissa, jotka sisältävät kromogeenina hapetusindikaattoreita, selostetaan lähemmin seuraavassa.

Veren tai glukoosin osoittamiseksi virtsassa pikakokeissa on tähän asti käytetty indikaattorina o-tolidiinia. Viime aikoina tämä karsinogeeninen aine on kuitenkin korvattu 3,3'-5,5'-tetrametyyllibentsidiinillä (TMB) (vrt. DT-OS 2 460 903).

Tätä indikaattoria sisältävät koepaperit ovat valitettavasti, kuten kaikkien bentsidiiniyhdisteiden yhteydessä on asian laita, arkoja valolle. Ne värjäytyvät jo muutaman minuutin ajan valolle alttiina oltuaan. Lisähaitta ilmenee erityisesti koepaperien yhteydessä, joilla on tarkoitus osoittaa glukoosin läsnäolo. Tällöin on kysymyksessä indikaattorin helppo hapettuvuus ilmassa, erityisesti läsnä olevan ilman kosteuden vaikutuksesta. Tämä ilmiö on erittäin haitallinen erityisesti sen vuoksi, koska juuri glukoosin osoittamiseksi virtsassa käytettävien indikaattoripaperit joutuvat ennakkotutkimuksissa maallikoiden käsiin.

Keksinnön mukaisia l-aryylisemikarbatsidejä sisältävillä koepapereilla ei yllättäen ole näitä varjopuolia. Tämän lisäksi kokeissa käytettäviä l-aryylisemikarbatsidi-määriä voidaan käyttää avarin sietorajoin vaikuttamatta oleellisesti ja haitallisesti kokeen herkkyteen.

Edelleen keksinnön mukaisia l-aryylisemikarbatsideja voidaan käyttää yleisesti glukoosikokeissa ja veren osoittamiseksi ulosteessa käytettävissä koesuikaleissa, jotka sisältävät indikaattoreina heterosyklisiä atsiineja (DBP 16 48 840:n, DBP 19 17 996:n mukaisia). Edullisiksi ovat osoittautuneet erityisesti l- $\sqrt{3}$ -alkyylibentstiatso-loni(2) $\sqrt{7}$ -2- $\sqrt{1}$ -fenyyli-3-metyyli-4-etyyli-1,2,4-triatso-loni(5) $\sqrt{7}$ -atsiini ja 2,2'-atsino-di- $\sqrt{1}$ -etyyli-kinolimoni(2)-disulfonihappo(6) $\sqrt{7}$ . Tällöin ne vaikuttavat osaltaan myös parempaan stabiilisuuteen veden ja ilman aiheuttamaa värjäytymistä vastaan, mikä puolestaan voi vaikuttaa helposti virheellisesti positiivisiin reaktioihin.

Veren osoittamiseksi ulosteessa tarkoitettut koepaperit sisältävät kuitenkin tarkoituksenmukaisuussyistä guajak-hartsia tai sen puhdistettua fraktiota, guajakonihappo A:ta, jonka ominaisekstinktio

$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  kohdalla 600 nm on ainakin 200, määritettynä peroksidaasin ja vetyperoksidin kanssa tapahtuneen reaktion jälkeen, suomalaisen patenttihakemuksen nro 78 1014 mukaisesti. Tällaisilla koepapereilla on myös taipumus värjäytyä valossa ja ilmassa hapettumisen takia siniseksi, mikä virheellisten positiivisten reaktioiden vuoksi voi aiheuttaa häiriöitä. Keksinnön mukaiset l-aryyilisemikarbatsidit ehkäisevät tällöinkin häiritsevän ja ei toivotun siniseksi värjäytymisen.

Koepaperien valmistus tapahtuu tunnetuin menetelmin, jolloin kulloinkin kyseessä oleviin resepteihin lisätään stabilisaattoreiksi tämän patenttihakemuksen mukaisia l-aryyilisemikarbatsideja. (Vrt. DT-OS 24 60 903, DBP 16 48 840 ja DBP 19 17 996).

Hydroperoksiedeina tulevat yleensä kysymykseen tavanomaiset niitä edustavat yhdisteet elleivät ne ole liian haihtuvia, kuten esim. tert.-butyylihydroperoksidi. Edullisiksi ovat osoittautuneet ennen kaikkea kiinteät yhdisteet 2,5-dimetyyliheksaani-2,5-dihydroperoksidi, tetraliinihydroperoksidi ja di-isopropyylibentseenidihydroperoksidi, mutta myös nestemäiset yhdisteet kuten di-isopropyylibentseeni-, kumeeni-, p-mentaani- ja pinaanihydroperoksidi ovat käytökelpoisia.

Hydroperoksiedeja käytetään 0,5-5 g, lähinnä 1-3 g 100 ml:aa kohden impregnointiliuosta.

Puskureina tulevat kysymykseen esim. sitraatti-, fosfaatti-, ftalaatti- tai sukkinäattipuskurit.

Reseptiin on myös edullista lisätä vähäisiä määriä (noin 0,05-0,5g 100 ml:aa kohden) kompleksinmuodostajaa kuten natriummetafosfaattia tai etyleenidiamiini-tetraetikkahapon alkalisuolaa, minkä ansiosta voidaan välttyä virheellisiltä positiivisilta reaktioilta, joita metallijäänteet voivat aiheuttaa. Kompleksinmuodostajat voivat toimia puskureina.

Koska koepapereilla suhteellisen suurista vesiliukoisista ainemääristä johtuen on taipumusta "kukkia", reseptiin on tarkoituksenmukaista lisätä paksunnosaineita kuten metyyliiselluloosaa ja erityisesti gelatiinia noin 0,5-5 g 100 ml:aa kohden. Eräissä tapauksissa polyvinyylipyrrolidoni on osoittautunut sopivaksi.

63637

Kostutusaineina käytetään tarkoituksenmukaisuussyistä pitkäketjuisia orgaanisia sulfaatteja tai sulfonaatteja, kuten esim. natriumdodekyyli-bentseenisulfonaattia, dioktyyli-natriumsulfosukkinaattia tai natrium-lauryylisulfaattia.

Keksinnön mukaisten koepaperien valmistamiseksi imukykyisiin koepapereihin, kuten esim. suodatinpaperiin, selluloosa- tai tekokuituharsoihin imeytetään reagenssien ja helposti haihtuvien liuottimien liuoksia. Tämä tapahtuu tarkoituksenmukaisesti kolmessa vaiheessa, jolloin yksityisten liuosten koostumukset riippuvat kulloinkin valmistettavasta pikakoesuikaleesta. Valmistettaessa pikakoesuikaleita veren osoittamiseksi ulosteessa käyttämällä guajak-hartsia tai guajakoni-hartsia A:ta, on edullista, että hydroperoksidia, tässä tapauksessa vetyperoksidia, ei imeytetä kantajalle, vaan sitä tiputetaan vasta ulosteen levittämisen jälkeen.

Keksinnön mukaisia l-aryylisemikarbatsideja lisätään noin 5-900 mg 100 ml:aa kohden impregnointiliuosta. Määrä riippuu yleensä tutkimuskohteesta, jota lisäyksellä halutaan seurata.

Itse keksinnön mukaiset aryylisemikarbatsidit ovat joko tunnettuja tai niitä valmistetaan tunnettujen menetelmien mukaisesti.

(O. Widman, Ber. 26, 2613 (1893), J.T. Hewitt, Soc. 209 (1891)).

Keksintöä selvennetään lähemmin seuraavissa esimerkeissä:

Esimerkeissä ilmoitetut prosentit merkitsevät kaikissa tapauksissa painoprosentteja.

Lyhenne K-EDTA merkitsee: etyleenidiamiinitetraetikkahapon kaliumsuolaa.

#### Esimerkki 1

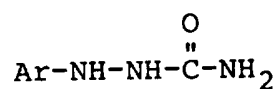
##### l-Aryylisemikarbatsidien synteesi

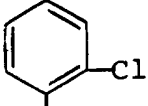
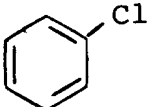
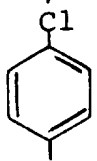
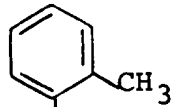
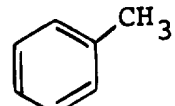
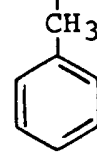
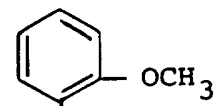
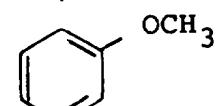
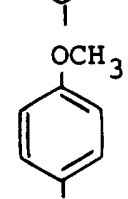
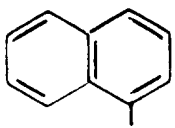
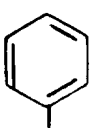
Yleisohje:

Synteesissä käytetään lähtöaineena aromaattista amiinia, jonka annetaan reagoida diatsotointia käyttäen diatsoniumyhdisteeksi. Diatsoniumsuola muutetaan suolahappoisessa liuoksessa tina-II-kloridilla hydratsiiniksi. Annettaessa hydrokloridin reagoida vedessä tai hydratsiiniemäksen jääetikassa kaliumsyanaatin kanssa, saadaan hyvin saannoin haluttua l-aryylisemikarbatsidia.

Seuraavassa taulukossa on esitetty muutamia keksinnön mukaisia yhdisteitä, joista osa on uusia. (Uudet yhdisteet on merkitty tunnuksella \*).

Taulukko 1



AR	Sp. °C	Kirjallisuus
	168-170°	*
	151-153°	J.T. Hewitt Soc. 868 (1873)
	228-231°	J.T. Hewitt Soc. 209 (1891)
	159°	J.V. Janowski, K. Reimann Ber. <u>21</u> , 1221 (1888)
	182°	*
	188°	*
	216°	*
	135°	*
	179°	*
	231°	A. Pinner, Ber. <u>21</u> , 1222 (1888)
	170°-173°	Kauppan oleva tuote Fa. E. Merck

Esimerkki 2Koe piilevän veren osoittamiseksi ulosteessa

Suodatinpaperiin (Schleicher & Schüll 597 NF-Ind.) imeytetään peräkkäin seuraavia liuoksia ja kuivataan.

Liuos 1:

0,34 molaarinen K-EDTA-jauhe pH 5,5		10 ml
Polyvinyylipyrrolidoni		300 mg
Vesi, tislattu	ad	100 ml

Liuos 2:

Guajakonihappo A	$E_{1\text{ cm}}^1 \%$ = 260 kohdalla 600 nm	130 mg
l-fenyyliisemikarbatsidi		65 mg
Asetoni	ad	100 ml

l-fenyyliisemikarbatsidin asemesta voidaan käyttää jokaista muuta esimerkissä 1 esitettyä yhdistettä ekvimoolimäärin.

l-aryyliisemikarbatsidien konsentraatioita voidaan vaihdella edellä mainituista määristä laskien rajoissa  $\pm 30 \%$  (painoprosentteja) tämän vaikuttamatta merkittävästi osoittamisreaktion herkkyyteen, tai stabiloivan vaikutuksen muuttumatta.

Koepaperit, jotka on valmistettu tässä esimerkissä mainitun menetelmän mukaisesti, ovat stabiileja valon ja ilman vaikutuksia vastaan ja soveltuvat erinomaisesti patologisten verimäärien osoittamiseen ulosteessa. Tätä varten ulostetta levitetään koepaperille, tämän annetaan kuivua ja kehittäminen suoritetaan selkäpuolelta vetyperoksidin alkoholiliuoksella. Jos läsnä on patologisin määrin verta, syntyy näytteestä säteettäisesti ulospäin siirtyvä loistavan sininen värivyöhyke.

Esimerkki 3Kokeita guajakonihappo A:n stabiloimiseksi tunnetuin antioksidantein (koe veren osoittamiseksi ulosteessa).

Suodatinpaperiin (Schleicher & Schüll 597 NF-Ind) imeytetään peräkkäin seuraavia liuoksia ja kuivataan.

Liuos 1:

0,34 molaarinen K-EDTA-puskuri pH 5,5	10 ml
Polyvinyylipyrrolidoni	300 mg
Vesi, tislattu	ad 100 ml

Liuos 2:

Guajakonihappo A $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 260$ kohdalla 600 nm	130 mg
Antioksidantti	60 mg
Etanoli	ad 100 ml

Antioksidantteina käytettiin yhdisteitä: 2,6-di-tert.-butyyli-p-kresolia, gallushappoa, gallushappoestereitä, brentskatekiinia, 2,6-di-ter-butyyli-fenolia, 2,6-dihydroksibentsoehappoa, gentisiinihappoa, nordihydroguajarethappoa, N-fenyyl- $\alpha$ -naftyyliamiinia, trifenyylifosfiinia, bentsimidatsolia, 2,2-bis(4-hydroksifenyyli)-propaania.

Näin valmistettuja papereita verrattiin esimerkin 2 mukaisesti valmistettuihin papereihin ja kokeiltiin niiden käyttökelpoisuutta patologisten verimäärien osoittamiseksi ulosteessa.

Tulos: kaikki antioksidantit vaikuttivat siten, että ne estivät patologisten verimäärien osoittamisen ulosteessa.

Jos antioksidanttien konsentraatiota reseptissä piennetään niin paljon, että kokeen herkkyys saadaan jälleen riittävän hyväksi, nämä aineet menettävät stabiloivan vaikutuksensa.

Esimerkki 4Veren osoittaminen ulosteessa

Suodatinpaperiin (Whatman Nr. 1) imeytetään peräkkäin seuraavia liuoksia ja kuivataan.

Liuos 1:

0,34 molaarinen K-EDTA-puskuri pH 5,0	10 ml
Dioktyylinatriumsulfosukkinaatti	500 mg
Metanoli	20 ml
Vesi, tislattu	80 ml

Liuos 2:

3,3'-5,5'-tetrametyylibentsidiini	400 mg
l-fenyylisemikarbatsidi	100 mg
Asetoni	100 ml

Näin valmistettu koepaperi vastaa täydellisesti vaatimuksia, joita kokeelle patologisten verimäärien osoittamiseksi ulosteessa on asetettava.

Kun koepaperille levitetty ulostenäyte oli "kehitetty" vetyperoksidin alkoholiliuoksella, patologiset verimäärät olivat osoitettavissa. Näytteen ympärille muodostuva vihreä väri ilmaisee veren läsnäolon. Koepaperi on riittävän kestävä valoa ja ilman hapettavaa vaikutusta vastaan.

Koepaperi, joka oli valmistettu muuten edellä mainitun reseptin mukaisesti, mutta käyttämättä keksinnön mukaista l-aryylisemikarbatsidia, värjäytyy sitä vastoin valossa ja ilmassa lyhyen ajan kuluessa sinisen vihreäksi. Sitä ei enää voi käyttää diagnostisiin tarkoituksiin.

#### Esimerkki 5

##### Veren osoittaminen ulosteessa

Suodatinpaperiin (Schleicher & Schüll 597 NF-Ind.) imeytetään peräkkäin seuraavia liuoksia ja kuivataan.

Liuos 1: Vastaa esimerkin 4 liuosta 1.

##### Liuos 2:

1- $\sqrt{3}$ -etyylisemikarbatsidi (2) $\sqrt{7}$ -2- $\sqrt{1}$ -fenyyli-3-metyyli-4-etyyli-1,2,4-triatsoloni (5) $\sqrt{7}$ -atsiini	100 mg
l-fenyylisemikarbatsidi	70 mg
Asetoni	100 ml

Tällaisella paperilla on samat ominaisuudet kuin esimerkin 3 mukaisella paperilla; syntyvä reaktioväri on sininen. Paperit, jotka valmistettiin lisäämättä keksinnön mukaista l-aryylisemikarbatsidia, värjäytyvät jo osoittamisreaktion aikana siten, että terveidenkin henkilöiden ulosteiden yhteydessä voidaan erheellisesti saada väärä positiivinen reaktio.

#### Esimerkki 6

##### Koepaperi veren osoittamiseksi virtsassa tai kehon nesteessä

Suodatinpaperiin (Schleicher & Schüll 23 SL) imeytetään peräkkäin seuraavia liuoksia ja kuivataan:

Liuos 1:

1,2-molaarinen natrium-sitraattipuskuri pH 5,25	35 ml
Etyleenidiamiinitetraetikkahappo, dinatriumsuola	0,1 g
Dioktyylinatriumsulfosukkinaatti	0,5 g
2,5-dimetyyliheksaani-2,5-dihydroperoksidi (noin 70 %:nen)	1,6 g
Fosforihappotrimorfolidi	12,7 g
Etanoli	30,0 ml
Tislattu vesi	ad 100 ml

Liuos 2:

3,3',5,5'-tetrametyylibentsidiini	0,3 g
Fenantridiini	0,2 g
1-fenyyliisemikarbatsidi	0,05 g
Metanoli/tolueeni (40:60)	ad 100 ml

Tämän tapaisiin koepapereihin valo ja ilma eivät käytännöllisesti katsoen vaikuta haitallisesti. Koepaperit, joissa ei ole keksinnön mukaista l-aryyllisemikarbatsidia, värjäytyvät 5-10 minuuttia valolle alttiina ollessaan vihreiksi. Yhtä epäedullisia ominaisuuksia on papereilla, joita valmistettaessa keksinnön mukaisen l-aryyllisemikarbatsidin asemesta impregnointiliuokseen on punnittu ekvimoolimäärin aminoguanidiinia tai semikarbatsidia.

1-fenyyliisemikarbatsidi voidaan korvata ekvimoolimäärillä l-(p-kloorifenyyli)-semikarbatsidia, l(p-tolyyli)-semikarbatsidia, l-(p-metoksi)-semikarbatsidia paperien ominaisuuksien muuttumatta. Tämän esimerkin mukaisesti valmistetuilla papereilla veri on riittävällä herkkyydellä osoitettavissa virtsassa tai kehon nesteissä.

Esimerkki 7Koepaperi glukoosin osoittamiseksi virtsassa

Suodatinpaperiin (Schleicher & Schüll 2312) imeytetään peräkkäin seuraavia liuoksia ja kuivataan.

Liuos 1:

Glukoosioksidaasi (55 yks./mg)	500 mg
Peroksidaasi (75 yks./mg)	200 mg
Tartratsiini	100 mg
Vesi, tislattu	100 ml

Liuos 2:

3,3',5,5'-tetrametyylilibentsidiini	600 mg
1-fenyyliisemikarbatsidi	50 mg
Natriumlauryylisarkosinaatti	100 mg
Vesi, tislattu	100 ml

Näin valmistettu paperi kestää valon, ilman ja ilman kosteuden vaikutusta ja sillä saadaan aikaan, glukoosikonsentraatioiden ollessa 30 mg - 2000 mg desilitrassa virtsaa, lisääntyvässä määrin intensiivisempiä vihreitä indikaattorireaktioita. Jos valmistuksen yhteydessä keksinnön mukainen 1-aryyliisemikarbatsidi jätetään pois, tällaiset paperit ovat arkoja valolle, ilmalle ja ilman kosteudelle. Ne värjäytyvät lyhyessä ajassa siten, että glukooseja virtsassa osoitettaessa voi esiintyä virheellisiä positiivisia reaktioita.

Esimerkki 8Koepapereita glukoosin osoittamiseksi virtsassa

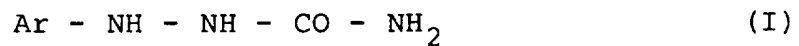
Suodatinpaperiin (Schleicher & Schüll 2316) imeytetään seuraavan koostumuksen omaavaa liuosta ja kuivataan:

2,2'-atsiino-di[1]-etyyli-kinolinoni(2)- di-sulfonihapon(6) di-natriumsuola	100 mg
1-fenyyliisemikarbatsidi	50 mg
Polyvinyylipyrrolidoni	250 mg
Glukoosioksidaasi (50 yks./mg)	400 mg
Peroksidaasi (75 yks./mg)	100 mg
0,4-molaarinen natriumsitraattipuskuri pH 5,0	100 ml

Näin valmistettu koepaperi mahdollistaa glukoosikonsentraatioiden osoittamisen virtsassa alkaen pitoisuuksista noin 50 mg/dl paperin värjäytyessä sinipunertavaksi. Se ei värjäydy valossa ja ilmassa. Sitä vastoin paperit, joissa ei ole keksinnön mukaista 1-aryyli-semikarbatsidia, värjäytyvät valon ja ilman vaikutuksesta.

Patenttivaatimukset

1. Koeliuska hydroperoksidien tai aineiden, joiden reagoidessa vapautuu hydroperoksidia sekä peroksidaasin tai peroksidaattisesti vaikuttavien aineiden määrittämiseksi stabiloitujen hapetusindikaattorien avulla käyttämällä hyväksi hydroperoksidien tai peroksidaattisesti vaikuttavien aineiden reaktioita määrittämällä värin muutos tunnetulla tavalla, t u n n e t t u siitä, että stabilisaattori on l-aryylisemikarbatsidi, jonka yleiskaava I on



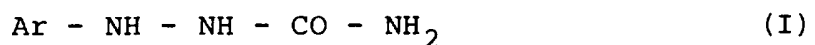
jossa Ar merkitsee mahdollisesti alkyyli-, alkoksi- tai halogeenisubstituentin sisältävää aryylihdettä.

2. Koeliuska glukoosin määrittämiseksi kehon nesteissä patenttivaatimuksen 1 mukaisesti, t u n n e t t u siitä, että hapetusindikaattoreina käytetään bentsidiini- tai atsiini-ryhmän yhdisteitä.

3. Koeliuska piilevän veren määrittämiseksi ulosteessa patenttivaatimuksen 1 mukaisesti, t u n n e t t u siitä, että hapetusindikaattorina käytetään guajakonihappo A:ta, jonka ominais-ekstinktio  $E_1^1 \%$   $\frac{\text{cm}}{\text{cm}}$  kohdalla 600 nm on ainakin 200, määritettynä peroksidaasin ja vetyperoksidin kanssa tapahtuneen reaktion jälkeen, tai bentsidiini- tai atsiiniryhmän yhdisteitä.

4. Jonkin patenttivaatimuksista 1-3 mukainen koeliuska, t u n n e t t u siitä, että kantaja sisältää paitsi stabilisaattoria mahdollisesti muita apuaineita kuten puskureita, kostutusaineita, paksunnosaineita, suojakolloidialia tai kompleksinmuodostajia.

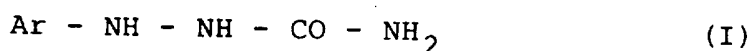
5. Yleiskaavan I mukaisten yhdisteiden



jossa Ar merkitsee mahdollisesti aryyli-, alkoksi- tai halogeenisubstituentin sisältävää aryylihdettä, käyttäminen koeliuskojen valmistamiseksi hydroperoksidien tai aineiden, joiden reagoidessa vapautuu hydroperoksidia sekä peroksidaasin tai peroksidaattisesti vaikuttavien aineiden osoittamista varten.

Patentkrav

1. Provremsa för bestämning av hydroperoxider eller av substanser, vilka reagerar under frigöring av hydroperoxid, samt av peroxidas eller peroxidatiskt verksamma substanser med hjälp av stabiliserade oxidationsindikatorer under utnyttjande av hydroperoxiders eller peroxidatiskt verksamma substansers reaktioner genom bestämning av en färgförändring på i och för sig känt sätt, k ä n n e t e c k n a d därav, att stabilisatorn är en l-arylsemikarbazid med den allmänna formeln I



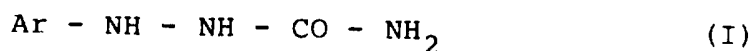
vari Ar betecknar en eventuellt en alkyl-, alkoxi- eller halogensubstituent innehållande arylrest.

2. Provremsa för bestämning av glukos i kroppsvätskor enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att som oxidationsindikatorer användes föreningar tillhörande gruppen bensidiner eller aziner.

3. Provremsa för bestämning av ockult blod i feces enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att som oxidationsindikator användes guajakonsyra A med specifik extinktion  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  vid 600 nm på minst 200, bestämd efter reaktion med peroxidas och väteperoxid, eller föreningar ur gruppen bensidin- eller azingruppen.

4. Provremsa enligt något av patentkraven 1-3, k ä n n e t e c k n a d därav, att bäraren förutom stabilisatorn eventuellt innehåller ytterligare hjälpmedel såsom buffertar, vätskemedel, tjockningsmedel, skyddskolloider eller komplexbildare.

5. Användning av föreningar med den allmänna formeln I



vari Ar betecknar en eventuellt aryl-, alkoxi- eller halogensubstituent innehållande arylrest,  
för framställning av provremsor för påvisning av hydroperoxider eller av substanser, vilka reagerar under frigöring av hydroperoxid, ävensom av peroxidas eller peroxidatiskt verksamma substanser.  
Viitejulkaisuja-Anförda publikationer