

PATENTCHRIFT 150222

Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

Der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

Patentbibliothek
des AfEP

(11)	150 222	(44)	19.08.81	Int. Cl. ³ 3(51)	C 12 N 9/16
(21)	AP C 12 N / 219 760	(22)	19.03.80		
(31)	P 29 11 284.3	(32)	22.03.79	(33)	DE

(71) siehe (73)

(72) Klose, Sigmar, Dr.; Buschek, Herbert; Schlumberger, Helmut, DE

(73) BOEHRINGER MANNHEIM GMBH, Mannheim-Waldhof, DE

(74) Internationales Patentbüro Berlin, 1020 Berlin,
Wallstraße 23/24

(54) Verfahren und Reagenz zur Aktivierung der Cholesterinesterase

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren und ein Mittel zur Aktivierung von Cholesterinesterase, insbesondere bei der enzymatischen Umsetzung von Estern in Reaktionsgemischen, wobei erfindungsgemäß ein oberflächenaktives Mittel, wie ein Polyethoxyether oder -ester oder/und eine Gallensäureverbindung und/oder Salze von Fettsäuren mit 6 bis 10 Kohlenstoffatomen in Verbindung mit einem synergistisch wirkenden Alkohol, der aus geradkettigen, verzweigten oder cyclischen aliphatischen Alkoholen mit 5 bis 12 Kohlenstoffatomen, gegebenenfalls halogensubstituierten aromatischen Alkoholen und den mit mehreren Halogenatomen substituierten aliphatischen Alkoholen mit 1 bis 3 Kohlenstoffatomen zugesetzt werden.

Verfahren und Reagens zur Aktivierung der Cholesterin- esterase

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und ein Mittel zur Aktivierung von Cholesterinesterase, insbesondere bei der enzymatischen Umsetzung von Estern in Reaktionsgemischen. Solche Reaktionsgemische werden unter anderem in der klinisch-chemischen Analytik und in der lebensmittelchemischen Analytik verwendet.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Bekannte Probleme bei der Konzipierung von cholesterin-esterabhängigen Tests sind die Einsparung von teurem Enzym, Erzielung höherer Reaktionsgeschwindigkeiten und möglichst freie Wählbarkeit von Art und Gehalt der Detergenzien und Puffer nach übergeordneten Gesichtspunkten.

In einem gepufferten Medium, das keine weiteren Komponenten enthält, entwickelt die Cholesterinesterase gegenüber ihren Substraten keine oder nur eine sehr geringe Aktivität. Es ist daher erforderlich, aktivierende Zusätze für das Enzym zu finden, durch welche die Esterspaltung gesteigert wird. Als solche aktivierenden Zusätze sind einige Detergenzien bekannt (US-PS 3 884 764, DE-OS 24 09 696, DE-OS 25 12 605, DE-OS 25 12 585, DE-PS 2 506 712, Biochim. Biophys. Acta, 270 (1972) 156 - 166; z. B. Gallensäuren, Triton X-100, Thesit).

27. 8. 1980
AP A 61 B/219 760
56 997 12

- 2 -

Ein höherer Salzgehalt des Mediums unterstützt deren aktivierende Wirkung. Nicht alle Puffersysteme sind jedoch in gleicher Weise geeignet. Gleiches gilt für die Detergenzien. Man findet hier unter bestimmten Bedingungen solche mit guter und weniger guter Wirkung bis hin zu solchen, die überhaupt keine aktivierende Wirkung zeigen. Welches Detergens in dieser Hinsicht geeignet ist, läßt sich meistens nicht vorhersagen.

Den aktivierenden Detergenzien ist gemeinsam, daß sie in einem vorgegebenen Medium in einem bestimmten Konzentrationsbereich ihre optimal aktivierende Wirkung entfalten. Die Optima können in ungünstig hohen Konzentrationsbereichen liegen. Außerhalb der Optima wird ein höherer Einsatz des verhältnismäßig teuren Enzyms nicht in optimaler Weise in höhere Reaktionsgeschwindigkeiten umgesetzt.

Außerdem lassen sich Aktivitätssteigerungen durch Optimierung des Detergensgehalts und Steigerung der Ionenstärke nur in relativ engem Rahmen erzielen.

Da die in Betracht kommenden Reaktionsgemische in der Regel noch weitere Enzyme und Substrate für die Folge- und Indikatorreaktionen enthalten, ist bei der Auswahl des Puffers und des Detergens sowie bei der Optimierung der jeweilig einzusetzenden Mengen keine freie Wählbarkeit gegeben.

Bei der Festlegung der Reaktionsbedingungen sind vielmehr immer die Wechselwirkungen aller Reaktionspartner untereinander, insbesondere mögliche Hemmungen oder nachteilige Stabilitätsbeeinflussungen anderer Enzyme durch Detergenzien und/oder hohe Ionenstärken zu berücksichtigen.

27. 8. 1980

AP A 61 B/219 760

56 997 12

- 3 -

Weiterhin sind bei der Konzipierung eines Testsystems Löslichkeitsgrenzen und Probleme der Galenik zu beachten.

Im letzteren Falle lassen sich die häufig flüssigen bis wachsartigen Detergenzien selten in der zur Aktivierung benötigten Menge in Feststoffgemischen, die ja trocken und rieselfähig sein sollen, unterbringen. Dies ist besonders bei Eintopfreaktionen von Bedeutung.

Schließlich ist noch zu berücksichtigen, daß die meisten in Frage kommenden Detergenzien nicht als definierte Verbindungen, sondern als Stoffgemische vorliegen. Folglich treten Chargenunterschiede auf, die sich auch bei der aktivierenden Wirkung bemerkbar machen. Es kann sich daher sehr nachteilig auswirken, wenn die Aktivierung allein von einem Detergens abhängig ist.

Ziel der Erfindung

Es besteht ein erheblicher Bedarf an weiteren und besseren Mitteln und Verfahren zur Aktivierung der Cholesterin-esterase, deren Auffindung das Ziel der Erfindung darstellt.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die oben erwähnten Nachteile zu beseitigen und ein Verfahren und ein Mittel der genannten Art zu schaffen, bei dem Cholesterin-esterase eingespart wird, unter bestimmten Bedingungen höhere Reaktionsgeschwindigkeiten erzielt werden können, mit geringerer Ionenstärke gearbeitet werden kann, Detergenzien nur in möglichst minimaler Konzentration benötigt werden und auch solche Detergenzien verwendbar werden, die

allein nur eine schlechte oder überhaupt keine aktivierende Wirkung zeigen.

Gelöst wird diese Aufgabe erfindungsgemäß durch ein Verfahren zur Aktivierung von Cholesterinesterase in ionenhaltigen Lösungen durch Zusatz von Detergenzien, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- a) als oberflächenaktives Mittel einen Polyethoxyether oder -ester und/oder eine Gallensäureverbindung und/oder Salze von Fettsäuren mit 6 bis 10 Kohlenstoffatomen in Kombination mit
- b) einem synergistisch wirkenden Alkohol, der aus den geradkettigen, verzweigten oder cyclischen aliphatischen Alkoholen mit 5 bis 12 Kohlenstoffatomen, gegebenenfalls halogensubstituierten, aromatischen Alkoholen und den mit mehreren Halogenatomen substituierten aliphatischen Alkoholen mit 1 bis 3 Kohlenstoffatomen ausgewählt ist, zusetzt.

Die Erfindung beruht auf der überraschenden Feststellung der Tatsache, daß die genannten Alkohole, die für sich allein keine aktivierende Wirkung auf die Cholesterinesterase zeigen, die an sich bekannte aktivierende Wirkung bestimmter Detergenzien synergistisch deutlich verstärken und bei bestimmten, für sich allein nicht aktivierenden Detergenzien eine Aktivierung bewirken.

Dies führt dazu, daß derartige nicht aktivierende, im Handel weit verbreitete Detergenzien eingesetzt werden können. Im gleichen Sinne werden wegen ihrer definierten Molekülstruktur und festen Konsistenz erwünschte, aber wegen schlechter aktivierender Eigenschaften bisher ungeeignete ionische Detergenzien verwendbar. Weiterhin läßt sich Enzym

27. 8. 1980

AP A 61 B/219 760

56 997 12

- 5 -

einsparen, die maximal erreichbare Reaktionsgeschwindigkeit erhöhen, die erforderliche Ionenstärke erniedrigen und schließlich durch die vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten das esteraseaktivierende System den durch weitere Komponenten des Reaktionsgemisches diktierten Bedingungen anpassen.

Beispiele für im Rahmen der Erfindung geeignete Polyethoxyether sind Fettalkohol-polyglykolether, wie Polyoxyethylenaurylether und Hydroxypolyethoxydodekan, Alkylarylether und Arylalkylether, wie Polyoxyethylenonylphenylether und Polyoxyethylen-octylphenylether, Fettsäureester, wie Polyoxyethylensorbitan-monolaurat und ähnliche. Bei den Gallensäureverbindungen werden Cholsäure, Desoxycholsäure und deren Alkalisalze bevorzugt. Desgleichen werden unter den Fettsäuresalzen ebenfalls die Alkalisalze, ganz besonders die Natriumsalze, bevorzugt.

Typische Beispiele für im Rahmen der Erfindung geeignete geradkettige, verzweigte oder cyclische aliphatische Alkohole sind Pentanol, tert.-Amylalkohol, Methylpentanol, Hexanol, Cyclohexanol, Octanol, Isooctanol, Dekanol und Dodekanol. Beispiele für geeignete aromatische Alkohole sind Phenol und Dihydroxynaphthol. Bevorzugt werden die halogensubstituierten Phenole und Naphthole, wie die Mono-, Di- und Trichlorphenole. Als mehrfach halogensubstituierte aliphatische Alkohole können beispielsweise Dichlorethanol, Trichlorethanol, Dichlormethanol, Trichlormethanol, Trichlorpropanol, Tetrachlorpropanol usw. verwendet werden. Als Halogensubstituenten kommen bei den aromatischen und aliphatischen Alkoholen Chlor, Brom und Fluor in Betracht, bevorzugt wird Chlor. Die aromatischen Alkohole können auch ein oder zwei Alkylgruppen mit 1 bis 2 C-Atomen aufweisen.

27. 8. 1980

AP A 61 B/219 760

56 997 12

- 6 -

Welcher dieser Alkohole (im folgenden Adjuvans genannt) für einen bestimmten Fall besonders geeignet ist, läßt sich leicht durch Vorversuche ermitteln. Meist sind Bedingungen, wie Art und Stärke des Puffersystems, Art und Konzentration des Detergens sowie Haltbarkeit und gewünschte Konsistenz der Aufbewahrungsform des Reaktionsgemisches vorgegeben. Diesen Bedingungen kann dann durch Auswahl des geeigneten Adjuvans und Anpassung der einzusetzenden Menge entsprochen werden. Im allgemeinen wurde gefunden, daß Konzentrationen zwischen 1 und 300 mM Adjuvans/l gute Ergebnisse bringen.

Bevorzugt werden die Alkohole in Mengen zwischen 0,01 und 5 %, Volumen-% bei flüssigen Alkoholen, Gew.-% bei festen Alkoholen, eingesetzt. Besonders bevorzugt sind 0,05 bis 3 %.

In den Polyethoxy-derivaten enthalten die Alkylgruppen im allgemeinen 8 bis 22 C-Atome, die Aralkyl- und Alkylarylgruppen enthalten vorzugsweise einen Phenylrest. Der Glykolrest dieser Detergenzien weist im allgemeinen 3 bis 25 Oxyethylengruppen auf.

Die Detergenzien werden zweckmäßig in einer Menge zwischen 0,05 und 5 Vol.-%, bzw. Gew.-% bei festen Substanzen, eingesetzt. Bevorzugt werden 0,1 bis 3 %.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Mittel zur Aktivierung der Cholesterinesterase in ionenhaltiger Lösung, enthaltend wenigstens ein oberflächenaktives Mittel auf Basis eines Polyethoxyethers oder -esters und/oder einer Gallensäureverbindung und/oder Salze von Fettsäuren mit 6 bis 10 Kohlenstoffatomen, welches gekennzeichnet ist durch einen Gehalt an synergistisch wirkendem Alkohol, der aus den geradkettigen Alkoholen oder verzweigt-kettigen oder cyclischen aliphatischen Alkoholen mit 5 bis 12 Kohlenstoffatomen,

27. 8. 1980

AP A 61 B/219 760

56 997 12

- 7 -

gegebenenfalls halogensubstituierten, aromatischen Alkoholen, halogensubstituierten aliphatischen Alkoholen mit 1 bis 3 Kohlenstoffatomen ausgewählt ist.

Die Erfindung ist anwendbar im Zusammenhang mit allen Arten von Messungen und Reaktionen, bei denen Cholesterinesterase in Reaktionsgemischen verwendet wird. Derartige Reaktionsgemische sind dem Fachmann allgemein bekannt und werden, soweit sie für analytische Zwecke bestimmt sind, beispielsweise in "Methoden der enzymatischen Analyse", H. U. Bergmeyer, Verlag Chemie Weinheim, Bergstraße, beschrieben. Eine nähere Erläuterung derartiger Reaktionsgemische erübrigt sich daher hier. Durch die Erfindung wird es möglich, Enzym einzusparen, unter gegebenen Bedingungen höhere Reaktionsgeschwindigkeiten zu erzielen, Puffer geringerer Ionenstärke einzusetzen, Detergenzien in geringerer Konzentration zu verwenden und auch solche Detergenzien anwendbar zu machen, die allein nur eine ungenügende oder überhaupt keine aktivierende Wirkung zeigen. Die Erfindung eignet sich für Cholesterinesterase aus Mikroorganismus oder anderen Ursprungs, wie aus Pankreas oder Leber.

Ausführungsbeispiel:

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter in Verbindung mit der beigefügten Zeichnung. In dieser stellen dar:

Fig. 1 eine schematische Darstellung der verwendeten Apparatur zur Bestimmung der Cholesterinesteraseaktivität,

Fig. 2 eine graphische Darstellung der bei der angewendeten Methode auftretenden Extinktionsänderung pro Zeiteinheit, die zur Ermittlung der Geschwindigkeit der Esterspaltung verwendet wurde.

27. 8. 1980

AP A 61 B/219 760

56 997 12

- 8 -

Folgende Tabelle zeigt die chemische Zusammensetzung der mit Handelsnamen bezeichneten Detergenzien:

Brij 35	Polyoxyethylen-laurylether
Genapol OX-100	Fettalkohol-polyglykolether
Tergitol NPX	Polyoxyethylennonyl-phenyl- ether (ca. 10,5 Oxyethylen- gruppen)
Thesit	Hydroxypolyethoxydodekan
Triton X-100	Polyethoxyoctylphenylether (9 bis 10 Oxyethylengruppen)
Tween 20	Polyoxyethylen-sorbitanmono- laurat.

Zum Nachweis der aktivierenden Wirkung der zu untersuchenden synergistischen Kombinationen der Erfindung auf Cholesterinesterase wurde die in Fig. 1 dargestellte Apparatur verwendet.

Aus einem temperierbaren Reaktionsgefäß 1 (25 °C), in dem sich die Esterspaltung vollzieht, werden über eine Schlauchpumpe 2 durch einen Förderschlauch 3 definierten Querschnitts kontinuierlich 0,32 ml Gemisch pro Minute entnommen. Über die gleiche Pumpe wird durch einen zweiten Schlauch 4 aus einem Vorratsgefäß 5 ebenfalls kontinuierlich 1,0 ml Indikatorlösung pro Minute gefördert, hinter der Pumpe 2 mit einem Luftstrom 6 von konstant 0,6 ml Luft/Minute zusammengeführt und damit segmentiert und dann mit dem zuvor beschriebenen Reaktionsgemischstrom vereinigt. Der Gesamtstrom passiert daraufhin zwei Glasschlangen 7, wodurch eine Durchmischung der Flüssigkeiten und die notwendige Reaktionszeit für die Indikatorreaktion bis zum Endpunkt gewährleistet wird. Durch Abziehen eines Stroms von 1,2 ml/Minute unmittelbar vor der Küvette durch Schlauchleitung 8 senkrecht nach oben werden die Luftblasen wieder

27. 8. 1980

AP A 61 B/219 760

56 997 12

- 9 -

entfernt.

Der nichtsegmentierte Reststrom wird zur photometrischen Messung (bei 546 nm) in eine Durchflußküvette 9 (1 cm Schichtdicke) geleitet, und die Meßwerte werden vom Schreiber 10 registriert.

Wegen der gleichbleibenden Bedingungen bezüglich der Indikatorreaktion sind Änderungen in Höhe und Verlauf des Meßsignals allein von den Vorgängen im Reaktionsgefäß abhängig. Findet dort eine Esterspaltung statt, so bewirkt deren kinetischer Verlauf eine Zunahme des Meßsignals, welches als positive Steigung mit dem Schreiber 10 registriert wird. Die Steilheit des Anstiegs ist ein Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit und damit für die Cholesterinesterase-Aktivität im Reaktionsansatz.

Wegen des getrennten Ablaufes von Esterspaltung und Indikatorreaktion ist eine gegenseitige Beeinflussung ausgeschlossen. Natürlich wären auch andere Indikatorsysteme einschließlich der Sauerstoffelektrode verwendbar.

Indikatorlösung:

0,1 m	Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0
1,5 mM/l	4-Amino-antipyrin
5 mM/l	Phenol
3 ‰	Hydroxypolyethoxydodekan
8 U/ml	Peroxidase
1 U/ml	Cholesterinoxidase

Die Indikatorlösung setzt zunächst freies Cholesterin zu Cholestenon und H_2O_2 um. Das entstandene H_2O_2 wird mit Phenol und 4-Amino-antipyrin zu einem roten Farbstoff umgesetzt, dessen Absorption photometrisch gemessen wird. Die Menge des entstehenden Farbstoffs ist der Konzentration des freien Cholesterins proportional. Die Konzentra-

27. 8. 1980
AP A 61 B/219 760
56 997 12

- 10 -

tion an freiem Cholesterin setzt sich aus dem bereits im Substrat vorhandenen Anteil an freiem Cholesterin sowie aus dem durch die Esterase freigesetzten Cholesterin zusammen.

Ansatz im Reaktionsgefäß:

0,5 ml Substrat (Kontrollserum; 360 mg Gesamtcholesterin/dl)
Detergens, je nach Versuch
Adjuvans, je nach Versuch
Puffer auf 5 ml.

Start mit 50 μ l einer Ersterase-Stocklösung, woraufhin 0,003 U/ml Esterase im Ansatz vorliegen. Bei Aktivitätsabstufungen wurde diese Menge variiert.

Nach erfolgreichem Start und Durchmischung wird bei laufender Pumpe 2 der Förderschlauch 3 in die Lösung im Reaktionsgefäß 1 für etwa 10 Minuten eingetaucht. Anschließend werden zur besseren Trennung der Signale in jeweils etwa 10 Segmenten wechselweise Luft und bidest. Wasser angesaugt. Daraufhin kann die nächste Bestimmung folgen.

Die nachstehenden Beispiele zeigen die durch die Erfindung ermöglichte Einsparung an Enzym (a), die Erzielung höherer Reaktionsgeschwindigkeiten unter vorgegebenen Bedingungen (b), die Verwendung von Puffern geringerer Ionenstärke (c), den Einsatz von Detergenzien in geringerer Konzentration (d) und die Verwendung auch solcher Detergenzien, die unter bestimmten Bedingungen nur eine ungenügende oder überhaupt keine aktivierende Wirkung zeigen (e).

a) Einsparung von Cholesterinesterase

Die Möglichkeit der Einsparung von Cholesterinesterase wird wie folgt aufgezeigt:

Zunächst wird eine Enzymaktivitätsabstufung in Abwesenheit

27. 8. 1980
AP A 61 B/219 760
56 997 12

- 11 -

von Adjuvantien vorgenommen. Die Vergleichsmessungen erfolgen dann unter Zusatz von Adjuvantien bei einem Cholesterin-esterase-Einsatz von 0,003 U/ml. Aufgrund der aufgezeigten Beziehung zwischen eingesetzter Aktivität und resultierender Geschwindigkeit wird dann die erzielte Aktivitätssteigerung ermittelt.

Beispiel 1

0,1 m Tris/Weinsäure-Puffer, pH 8,0
5 ‰ Triton X-100

eingesetzte Aktivität	resultierende Geschwindigkeit
0 u/ml	0 Ext/10 Minuten
0,0012	0,012
0,0030	0,032
0,0045	0,052
0,0060	0,058
0,0089	0,094

1.1 Zusatz von 2 Vol.-% tert.-Amylalkohol

eingesetzte Aktivität	0,0030 U/ml
erzielte Geschwindigkeit	0,046 Ext/10 Min.
erforderlicher Enzymeinsatz für diese Geschwindigkeit ohne Adjuvans	0,0044 U/ml
erzielte Aktivität	147 %

1.2 Zusatz von 0,4 Vol.-% 4-Methylpentanol-(2)

eingesetzte Aktivität	0,003 U/ml
erzielte Geschwindigkeit	0,065 Ext/10 Min.
erforderlicher Enzymeinsatz für diese Geschwindigkeit ohne Adjuvans	0,0063 U/ml
erzielte Aktivität	210 %

27. 8. 1980
AP A 61 B/219 760
56 997 12

- 12 -

1.3 Zusatz von 1 Vol.-% Cyclohexanol

eingesetzte Aktivität	0,0030 U/ml
erzielte Geschwindigkeit	0,077 Ext/10 Min.
erforderlicher Enzymeinsatz für diese Geschwindigkeit ohne Adjuvans	0,0075 U/ml
erzielte Aktivität	250 %

Beispiel 2

In 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,0
1,5 % Tergitol NPX

eingesetzte Aktivität	resultierende Geschwindigkeit
0,0012 U/ml	0,019 Ext/10 Minuten
0,0030 U/ml	0,030 Ext/10 Minuten
0,0060 U/ml	0,055 Ext/10 Minuten
0,0090 U/ml	0,091 Ext/10 Minuten
0,0120 U/ml	0,120 Ext/10 Minuten

2.1 Zusatz von 0,4 Vol.-% 2,2,2-Trichlorethanol

eingesetzte Aktivität	0,003 U/ml
erzielte Geschwindigkeit	0,046 Ext/10 Min.
erforderlicher Enzymeinsatz für diese Geschwindigkeit ohne Adjuvans	0,0046 U/ml
erzielte Aktivität	153 %

2.2 Zusatz von 2 Vol.-% tert.-Amylalkohol

eingesetzte Aktivität	0,003 U/ml
erzielte Geschwindigkeit	0,053 Ext/10 Min.
erforderlicher Enzymeinsatz für diese Geschwindigkeit ohne Adjuvans	0,0053 U/ml
erzielte Aktivität	177 %

27. 8. 1980
AP A 61 B/219 760
56 997 12

- 13 -

2.3 Zusatz von 1,4 Vol.-% 4-Methylpentanol-(2)

eingesetzte Aktivität	0,003 U/ml
erzielte Geschwindigkeit	0,059 Ext/10 Min.
erforderlicher Enzymeinsatz für diese Geschwindigkeit ohne Adjuvans	0,0059 U/ml
erzielte Aktivität	197 %

2.4 Zusatz von 2 Vol.-% Cyclohexanol

eingesetzte Aktivität	0,003 U/ml
erzielte Geschwindigkeit	0,114 Ext/10 Min.
erforderlicher Enzymeinsatz für diese Geschwindigkeit ohne Adjuvans	0,0114 U/ml
erzielte Aktivität	380 %

Beispiel 3

In 0,3 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,0
5 % Genapol OX-100/5 % Na-Caprylat

eingesetzte Aktivität	resultierende Geschwindigkeit
0,0012 U/ml	0,01 Ext/10 Minuten
0,0030 U/ml	0,023 Ext/10 Minuten
0,0060 U/ml	0,038 Ext/10 Minuten
0,0090 U/ml	0,055 Ext/10 Minuten
0,0150 U/ml	0,093 Ext/10 Minuten
0,0240 U/ml	0,138 Ext/10 Minuten

3.1 Zusatz von 4 mM/l 3,4-Dichlorphenol (0,065 Gew.-%)

eingesetzte Aktivität	0,0030 U/ml
erzielte Geschwindigkeit	0,058 Ext/10 Min.
erforderlicher Enzymeinsatz für diese Geschwindigkeit ohne Adjuvans	0,0093 U/ml
erzielte Aktivität	310 %

27. 8. 1980
AP A 61 B/219 760
56 997 12

- 14 -

3.2. Zusatz von 10 mM/l (ca. 0,09 Gew.-%) Phenol

eingesetzte Aktivität	0,003 U/ml
erzielte Geschwindigkeit	0,064 Ext/10 Min.
erforderlicher Enzymeinsatz für diese Geschwindigkeit ohne Adjuvans	0,0104 U/ml
erzielte Aktivität	347 %

3.3 Zusatz von 1 Vol.-% 4-Methylpentanol-(2)

eingesetzte Aktivität	0,003 U/ml
erzielte Geschwindigkeit	0,069 Ext/10 Min.
erforderlicher Enzymeinsatz für diese Geschwindigkeit ohne Adjuvans	0,0112 U/ml
erzielte Aktivität	373 %

3.4 Zusatz von 2 Vol.-% Cyclohexanol

eingesetzte Aktivität	0,003 U/ml
erzielte Geschwindigkeit	0,080 Ext/10 Min.
erforderlicher Enzymeinsatz für diese Geschwindigkeit ohne Adjuvans	0,0129 U/ml
erzielte Aktivität	430 %

3.5 Zusatz von 0,3 Vol.-% 2,2,2-Trichlorethanol

eingesetzte Aktivität	0,003 U/ml
erzielte Geschwindigkeit	0,089 Ext/10 Min.
erforderlicher Enzymeinsatz für diese Geschwindigkeit ohne Adjuvans	0,0144 U/ml
erzielte Aktivität	480 %

b) Erzielung höherer Reaktionsgeschwindigkeiten unter vorgegebenen Bedingungen

In vielen Fällen sind bestimmte Bedingungen, wie etwa Puffer und Ionenstärke sowie Art des Detergens in Reaktionsgemischen aufgrund übergeordneter Gesichtspunkte bereits vorgegeben. Solche Gründe können z. B. durch größere Empfindlichkeit eines anderen, noch im Gemisch benötigten Enzyms gegeben sein. In diesen Fällen ist die bei konstantem Cholesterinesterase-Einsatz erzielbare maximale Geschwindigkeit der Esterspaltung durch die Abhängigkeit der Esteraseaktivierung von der Art des Detergens und der Detergensenkonzentration gekennzeichnet und begrenzt. Diese Abhängigkeit zeigt im allgemeinen im unteren Konzentrationsbereich an Detergens ein Optimum. Die an diesem Punkt erreichte Geschwindigkeit ist nach den oben angeführten Bedingungen nicht überbietbar und stellt in dieser Hinsicht eine Grenze des Systems dar.

Die im Beispiel nachfolgend beschriebenen erfindungsgemäßen Kombinationen sind geeignet, solche Grenzen zu übertreffen.

Beispiel 4

Vorgegeben: 0,1 M Tris/Weinsäure-Puffer, pH 8,0

Triton X-100, 0,003 U/ml Cholesterinesterase

% Triton X-100 im Ansatz	Resultierende Geschwindigkeit
0 ‰	0 Ext/10 Minuten
1 ‰	0,003 Ext/10 Minuten
3 ‰	0,028 Ext/10 Minuten
5 ‰	0,037 Ext/10 Minuten
7 ‰	0,037 Ext/10 Minuten
10 ‰	0,037 Ext/10 Minuten
15 ‰	0,029 Ext/10 Minuten

27. 8. 1980
AP A 61 B/219 760
56 997 12

- 16 -

Optimum	Grenze des Systems
5 ‰	0,037 Ext/10 Minuten

Zusatz von Adjuvantien erfolgt bei 5 ‰ Triton X-100.

4.1 Zusatz von 2 Vol.-% tert.-Amylalkohol

Erzielte Geschwindigkeit	0,046 Ext/10 Min.
Steigerung auf	124 ‰

4.2 Zusatz von 0,4 Vol.-% 4-Methylpentanol-(2)

Erzielte Geschwindigkeit	0,065 Ext/10 Min.
Steigerung auf	176 ‰

4.3 Zusatz von 1 Vol.-% Cyclohexanol

Erzielte Geschwindigkeit	0,077 Ext/10 Min.
Steigerung auf	208 ‰

Beispiel 5

Vorgegeben: 0,3 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,0
Tergitol NPX, 0,003 U/ml Cholesterinesterase

‰ Tergitol NPX im Ansatz	Resultierende Geschwindigkeit
0 ‰	0 Ext/10 Minuten
2 ‰	0 Ext/10 Minuten
5 ‰	0,029 Ext/10 Minuten
10 ‰	0,042 Ext/10 Minuten
15 ‰	0,049 Ext/10 Minuten
20 ‰	0,039 Ext/10 Minuten
Optimum	Grenze des Systems
15 ‰	0,049 Ext/10 Minuten

27. 8. 1980

AP A 61 B/219 760

56 997 12

- 17 -

Zusatz von Adjuvantien erfolgt bei 15 % Tergitol NPX

5.1 Zusatz von 2 mM/l 3,4-Dichlorphenol und 1 Vol.-%
Cyclohexanon

Erzielte Geschwindigkeit	0,058 Ext/10 Minuten
Steigerung auf	118 %

5.2 Zusatz von 2 Vol.-% tert.-Amylalkohol

Erzielte Geschwindigkeit	0,066 Ext/10 Minuten
Steigerung auf	135 %

5.3 Zusatz von 1,4 Vol.-% Cyclohexanol

erzielte Geschwindigkeit	0,118 Ext/10 Minuten
Steigerung auf	241 %

c) Verwendung von Puffern geringerer Ionenstärke

Wie schon erwähnt, unterstützen Puffer höherer Ionenstärke die aktivierende Wirkung von Detergenzien auf Cholesterin-esterase. Im Rahmen der geforderten möglichst freien Wählbarkeit der Bedingungen ist es jedoch wünschenswert, nicht auf hohe Salzgehalte in der Lösung angewiesen zu sein. Das folgende Beispiel zeigt, daß erfindungsgemäß die Salzgehalte wesentlich verringert werden können.

Gegenübergestellt werden:

0,3 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,0

0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,0

Durch Zusatz geeigneter Adjuvantien zum 0,1 m Puffersystem lassen sich die Geschwindigkeiten derart steigern, daß sie den höheren Vergleichswert des 0,3 M Puffersystems ohne Adjuvans erreichen und zum Teil deutlich übertreffen.

27. 8. 1980
AP A 61 B/219 760
56 997 12

- 18 -

Beispiel 6

15 ‰ Tergitol NPX, 0,003 U/ml Cholesterinesterase

6.1 Zusatz von 2 Vol.-% tert.-Amylalkohol

System	Geschwindigkeit
0,1 m Puffer ohne Zusatz	0,030 Ext/10 Minuten
0,3 m Puffer ohne Zusatz	0,049 Ext/10 Minuten
0,1 m Puffer mit Zusatz	0,053 Ext/10 Minuten

Der Vergleichswert wird übertroffen.

6.2 Zusatz von 1,4 Vol.-% 4-Methylpentanol-(2)

0,1 m Puffer ohne Zusatz	0,030 Ext/10 Minuten
0,3 m Puffer ohne Zusatz	0,049 Ext/10 Minuten
0,1 m Puffer mit Zusatz	0,059 Ext/10 Minuten

Der Vergleichswert wird übertroffen.

6.3 Zusatz von 2 Vol.-% Cyclohexanol

0,1 m Puffer ohne Zusatz	0,030 Ext/10 Minuten
0,3 m Puffer ohne Zusatz	0,049 Ext/10 Minuten
0,1 m Puffer mit Zusatz	0,114 Ext/10 Minuten

Der Vergleichswert wird deutlich übertroffen.

Beispiel 7

10 ‰ Genapol OX-100 / 10 ‰ Na-Caprylat
0,003 U/ml Cholesterinesterase

7.1 Zusatz von 40 mM (ca. 0,35 Gew.-%) Phenol

System	Geschwindigkeit
0,1 m Puffer ohne Zusatz	0,017 Ext/10 Minuten
0,3 m Puffer ohne Zusatz	0,053 Ext/10 Minuten
0,1 m Puffer mit Zusatz	0,053 Ext/10 Minuten

Der Vergleichswert wird erreicht.

7.2 Zusatz von 1 Vol.-% 2,2,2-Trichlorethanol

0,1 m Puffer ohne Zusatz	0,017 Ext/10 Minuten
0,3 m Puffer ohne Zusatz	0,053 Ext/10 Minuten
0,1 m Puffer mit Zusatz	0,063 Ext/10 Minuten

Der Vergleichswert wird übertroffen.

7.3 Zusatz von 2 Vol.-% Cyclohexanol

0,1 m Puffer ohne Zusatz	0,017 Ext/10 Minuten
0,3 m Puffer ohne Zusatz	0,053 Ext/10 Minuten
0,1 m Puffer mit Zusatz	0,072 Ext/10 Minuten

Der Vergleichswert wird übertroffen.

d) Verwendung von Detergenzien in geringerer Konzentration

Ist ein Detergens in der Lage, die Cholesterinesterase zu aktivieren, so muß es zur vollen Entfaltung dieser Eigenschaft in einer bestimmten Konzentration im Reaktionsgemisch vorliegen. Dieses Detergenzoptimum ist wesentlich von der Art des Detergens abhängig und kann in vielen Fällen in einem ungünstig hohen Konzentrationsbereich liegen. Dadurch kann es bei anderen, für Folgereaktionen benötigten Enzymen zu Hemmungen und auch aus Gründen der Löslichkeit und der Galenik zu Schwierigkeiten kommen. Unterhalb des Detergensoptimums wird nur eine unzureichende Aktivierung

27. 8. 1980
AP A 61 B/219 760
56 997 12

- 20 -

beobachtet. Im Interesse einer möglichst freien Wählbarkeit der Bedingungen ist es jedoch wünschenswert, möglichst viele verschiedene Detergenzien, auch solche mit höher liegendem Konzentrationsoptimum, verwenden zu können.

Das nachstehende Beispiel zeigt, daß es erfindungsgemäß möglich ist, mit weniger Detergens die Reaktionsgeschwindigkeiten des Konzentrationsoptimums zu erreichen und zu übertreffen, wodurch Detergens eingespart wird.

Beispiel 8

0,3 m Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,0

Tergitol NPX, 0,003 U/ml Cholesterinesterase

% Tergitol NPX im Ansatz	Resultierende Geschwindigkeit
0 ‰	0 Ext/10 Minuten
2 ‰	0 Ext/10 Minuten
5 ‰	0,029 Ext/10 Minuten
10 ‰	0,042 Ext/10 Minuten
15 ‰	0,049 Ext/10 Minuten
20 ‰	0,039 Ext/10 Minuten
Optimum	Vergleichswert
15 ‰	0,049 Ext/10 Minuten

8.1 Zusatz von 0,1 Vol,-% 2,2,2-Trichlorethanol

System	Geschwindigkeit
15 ‰ Tergitol ohne Zusatz	0,049 Ext/10 Minuten
5 ‰ Tergitol ohne Zusatz	0,029 Ext/10 Minuten
5 ‰ Tergitol mit Zusatz	0,059 Ext/10 Minuten

Der Vergleichswert wird übertroffen.

27. 8. 1980
AP A 61 B/219 760
56 997 12

- 21 -

8.2 Zusatz von 2 Vol.-% tert.-Amylalkohol

15 ‰ Tergitol ohne Zusatz	0,049 Ext/10 Minuten
5 ‰ Tergitol ohne Zusatz	0,029 Ext/10 Minuten
5 ‰ Tergitol mit Zusatz	0,075 Ext/10 Minuten

Der Vergleichswert wird deutlich übertroffen.

8.3 Zusatz von 1 Vol.-% Cyclohexanol

15 ‰ Tergitol ohne Zusatz	0,049 Ext/10 Minuten
5 ‰ Tergitol ohne Zusatz	0,029 Ext/10 Minuten
5 ‰ Tergitol mit Zusatz	0,124 Ext/10 Minuten

Der Vergleichswert wird deutlich übertroffen.

Beispiel 9

0,3 m Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,0

Genapol OX-100 / Natriumcaprylat, 0,003 U/ml Cholesterin-
ersterase

‰ Genapol OX-100/Na-Caprylat	Geschwindigkeit
0 ‰	0 Ext/10 Minuten
5 ‰	0,020 Ext/10 Minuten
10 ‰	0,053 Ext/10 Minuten
15 ‰	0,062 Ext/10 Minuten
20 ‰	0,066 Ext/10 Minuten
30 ‰	0,068 Ext/10 Minuten
40 ‰	0,068 Ext/10 Minuten
Optimum	Vergleichswert
30 ‰	0,068 Ext/10 Minuten

27. 8. 1980
AP A 61 B/219 760
56 997 12

- 22 -

9.1 Zusatz von 1 Vol.-% 4-Methylpentanol-(2)

System	Geschwindigkeit
30 ‰ Genapol/Caprylat ohne Zusatz	0,068 Ext/10 Minuten
5 ‰ Genapol/Caprylat ohne Zusatz	0,020 Ext/10 Minuten
5 ‰ Genapol/Caprylat mit Zusatz	0,059 Ext/10 Minuten

Der Vergleichswert wird erreicht.

9.2 Zusatz von 2 Vol.-% Cyclohexanol

System	Geschwindigkeit
30 ‰ Genapol/Caprylat ohne Zusatz	0,068 Ext/10 Minuten
5 ‰ Genapol/Caprylat ohne Zusatz	0,020 Ext/10 Minuten
5 ‰ Genapol/Caprylat mit Zusatz	0,080 Ext/10 Minuten

Der Vergleichswert wird übertroffen.

9.3 Zusatz von 0,3 Vol.-% 2,2,2-Trichlorethanol

System	Geschwindigkeit
30 ‰ Genapol/Caprylat ohne Zusatz	0,068 Ext/10 Minuten
5 ‰ Genapol/Caprylat ohne Zusatz	0,020 Ext/10 Minuten
5 ‰ Genapol/Caprylat mit Zusatz	0,089 Ext/10 Minuten

Der Vergleichswert wird deutlich übertroffen.

- e) Verwendung von Detergenzien mit unter bestimmten Bedingungen keiner oder nur unzureichender aktivierender Wirkung

Unter der Vielzahl der zur Verfügung stehenden Detergenzien erweisen sich nur wenige als geeignet, die Cholesterin-esterase in ausreichendem Maße zu aktivieren. Hemmung anderer Reaktionspartner, Stabilität des Reaktionsgemisches, Konsistenz, Löslichkeit und Eindeutigkeit der Verbindung bzw. des Präparates zählen zu den übergeordneten Gründen, die eine möglichst freie Wählbarkeit der Detergenzien wünschenswert erscheinen lassen. Das nachstehende Beispiel zeigt, daß auch Detergenzien mit unter den gegebenen Bedingungen nur geringer oder überhaupt keiner aktivierenden Wirkung erfindungsgemäß verwendbar werden.

Beispiel 10

0,1 m Phosphat-Puffer, pH 7,0, 0,003 U/ml Cholesterin-esterase

Detergens: 6 ‰ Thesit
Zusatz: 1 Vol.-% n-Amylalkohol

System	Geschwindigkeit
Detergens ohne Zusatz	0,003 Ext/10 Minuten
Zusatz	0 Ext/10 Minuten
Detergens mit Zusatz	0,029 Ext/10 Minuten

27. 8. 1980

AP A 61 B/219 760

56 997 12

- 24 -

Beispiel 11

0,1 m Phosphat-Puffer, pH 7,0

0,003 U/ml Cholesterinesterase

Detergens: 6 ‰ Thesit

Zusatz: 10 mM/l (ca. 0,16 Gew.-%) 1,7-Dihydroxynaphthalin

System	Geschwindigkeit
Detergens ohne Zusatz	0,003 Ext/10 Minuten
Zusatz	0,005 Ext/10 Minuten
Detergens mit Zusatz	0,024 Ext/10 Minuten

Beispiel 12

0,1 m Phosphat-Puffer, pH 7,0

0,003 U/ml Cholesterinesterase

Detergens: 12 ‰ Thesit

Zusatz: 2 Vol,-% Cyclohexanol

System	Geschwindigkeit
Detergens ohne Zusatz	0,010 Ext/10 Minuten
Zusatz	0,003 Ext/10 Minuten
Detergens mit Zusatz	0,105 Ext/10 Minuten

Beispiel 13

0,1 m Phosphat-Puffer, pH 7,0

0,003 U/ml Cholesterinesterase

Detergens: 12 ‰ Thesit

Zusatz: 1 Vol,-% 2,2,2-Trichlorethanol

27. 8. 1980

AP A 61 B/219 760

56 997 12

- 25 -

System	Geschwindigkeit
Detergens ohne Zusatz	0,010 Ext/10 Minuten
Zusatz	0 Ext/10 Minuten
Detergens mit Zusatz	0,081 Ext/10 Minuten

Beispiel 14

0,1 m Tris/Weinsäure-Puffer, pH 8,0

0,003 U/ml Cholesterinesterase

Detergenzien: 2 Vol.-% Thesit/2 Vol.-% Tween 20

Zusatz: - 0,4 Vol.-% Hexanol-1

System	Geschwindigkeit
Detergenzien ohne Zusatz	0,018 Ext/10 Minuten
Zusatz	0 Ext/10 Minuten
Detergenzien mit Zusatz	0,028 Ext/10 Minuten

Beispiel 15

0,1 m Phosphat-Puffer, pH 7,0

0,003 U/ml Cholesterinesterase

Detergenzien: 5 Vol.-% Thesit/5 Vol.-% Tween 20

Zusatz: 8 mM/l 3,5-Dichlorphenol

System	Geschwindigkeit
Detergenzien ohne Zusatz	0,005 Ext/10 Minuten
Zusatz	0 Ext/10 Minuten
Detergenzien mit Zusatz	0,033 Ext/10 Minuten

27. 8. 1980

AP A 61 B/219 760

56 997 12

- 26 -

Beispiel 16

0,3 m Phosphat-Puffer, pH 7,0
0,003 U/ml Cholesterinesterase

Detergenzien: 5 Vol.-% Genapol OX-100/5 Gew.-% Na-
Caprylat

Zusatz: 10 mM/l Phenol

System	Geschwindigkeit
Detergenzien ohne Zusatz	0,020 Ext/10 Minuten
Zusatz	0 Ext/10 Minuten
Detergenzien mit Zusatz	0,064 Ext/10 Minuten

Beispiel 17

0,3 m Phosphat-Puffer, pH 7,0
0,003 U/ml Cholesterinesterase

Detergenzien: 5 Vol.-% Genapol OX-100 / 5 Gew.-% Na-
Caprylat

Zusatz: 4 mM/l (ca. 0,065 Gew.-%) 3,4-Dichlorphenol

System	Geschwindigkeit
Detergenzien ohne Zusatz	0,020 Ext/10 Minuten
Zusatz	0 Ext/10 Minuten
Detergenzien mit Zusatz	0,058 Ext/10 Minuten

27. 8. 1980
AP A 61 B/219 760
56 997 12

- 27 -

Beispiel 18

0,1 m Phosphat-Puffer, pH 7,0
0,003 U/ml Cholesterinesterase

Detergens: 10 Vol.-% Brij 35 (30%ige Lösung)
Zusatz: 4 mM/l 3,4-Dichlorphenol

System	Geschwindigkeit
Detergenzien ohne Zusatz	0 Ext/10 Minuten
Zusatz	0 Ext/10 Minuten
Detergenzien mit Zusatz	0,010 Ext/10 Minuten

Beispiel 19

0,1 m Phosphat-Puffer, pH 7,0
0,003 U/ml Cholesterinesterase

Detergens: 10 Vol.-% Brij 35 (30%ige Lösung)
Zusatz: 1 Vol.-% 2,2,2-Trichlorethanol

System	Geschwindigkeit
Detergens ohne Zusatz	0 Ext/10 Minuten
Zusatz	0 Ext/10 Minuten
Detergens mit Zusatz	0,018 Ext/10 Minuten

27. 8. 1980
AP A 61 B/219 760
56 997 12

- 28 -

Beispiel 20

0,1 m Phosphat-Puffer, pH 7,0
0,003 U/ml Cholesterinesterase

Detergens: 2 Vol.-% Brij 35 (30%ige Lösung)
Zusatz: 2 Vol.-% Cyclohexanol

System	Geschwindigkeit
Detergens ohne Zusatz	0 Ext/10 Minuten
Zusatz	0,003 Ext/10 Minuten
Detergens mit Zusatz	0,027 Ext/10 Minuten

Beispiel 21

0,1 m Phosphat-Puffer, pH 7,0
0,003 U/ml Cholesterinesterase

Detergens: 6 Gew.-% Cholsäure
Zusatz: 1 Vol.-% 2,2,2-Trichlorethanol

System	Geschwindigkeit
Detergens ohne Zusatz	0 Ext/10 Minuten
Zusatz	0 Ext/10 Minuten
Detergens mit Zusatz	0,029 Ext/10 Minuten

27. 8. 1980
AP A 61 B/219 760
56 997 12

- 29 -

Beispiel 22

0,1 m Phosphat-Puffer, pH 7,0
0,003 U/ml Cholesterinesterase

Detergens: 6 Gew.-% Cholsäure
Zusatz: 16 mM/l 3,5-Dichlorphenol

System	Geschwindigkeit
Detergens ohne Zusatz	0 Ext/10 Minuten
Zusatz	0 Ext/10 Minuten
Detergens mit Zusatz	0,036 Ext/10 Minuten

Beispiel 23

0,1 m Phosphat-Puffer, pH 7,0
0,003 U/ml Cholesterinesterase

Detergens: 1 Gew.-% Cholsäure
Zusätze: 4 mM/l 3,5-Dichlorphenol, 1 Vol.-% Cyclo-
hexanol

System	Geschwindigkeit
Detergens ohne Zusätze	0 Ext/10 Minuten
Zusätze	0,010 Ext/10 Minuten
Detergens mit Zusätzen	0,103 Ext/10 Minuten

27. 8. 1980
AP A 61 B/219 760
56 997 12

- 30 -

Beispiel 24

0,1 m Tris/Weinsäure-Puffer, pH 8,0
0,003 U/ml Cholesterinesterase

Detergens: 3 Gew.-% Natriumdesoxycholat
Zusatz: 0,2 Vol.-% Hexanol-1

System	Geschwindigkeit
Detergens ohne Zusatz	0 Ext/10 Minuten
Zusatz	0 Ext/10 Minuten
Detergens mit Zusatz	0,056 Ext/10 Minuten

Beispiel 25

0,1 m Tris/Weinsäure-Puffer, pH 8,0
0,003 U/ml Cholesterinesterase

Detergens: 3 Gew.-% Natriumdesoxycholat
Zusatz: 1 Vol.-% 2,2,2-Trichlorethanol

System	Geschwindigkeit
Detergens ohne Zusatz	0 Ext/10 Minuten
Zusatz	0 Ext/10 Minuten
Detergens mit Zusatz	0,069 Ext/10 Minuten

27. 8. 1980
AP A 61 B/219 760
56 997 12

- 31 -

Beispiel 26

0,1 m Phosphat-Puffer, pH 7,0
0,003 U/ml Cholesterinesterase

Detergens: 6 Vol.-% Genapol OX-100
Zusatz: 0,4 Vol.-% 2,2,2-Trichlorethanol

System	Geschwindigkeit
Detergens ohne Zusatz	0 Ext/10 Minuten
Zusatz	0 Ext/10 Minuten
Detergens mit Zusatz	0,059 Ext/10 Minuten

Beispiel 27

0,1 m Phosphat-Puffer, pH 7,0
0,003 U/ml Cholesterinesterase

Detergens: 20 Vol.-% Tween 20
Zusatz: 1 Vol.-% 2,2,2-Trichlorethanol

System	Geschwindigkeit
Detergens ohne Zusatz	0,005 Ext/10 Minuten
Zusatz	0 Ext/10 Minuten
Detergens mit Zusatz	0,067 Ext/10 Minuten

27. 8. 1980
AP A 61 B/219 760
56 997 12

- 32 -

Anwendungsform

Beispiel 28

Reagens zur Bestimmung von Cholesterin im Serum

Rezeptur: 4,5 g/l Weinsäure
7,5 g/l Tris
8,7 g/l Natriumsulfat
200 mg/ml 4-Amino-antipyrin
282 mg/l Phenol
5000 U/l Peroxidase
430 U/l Cholesterinesterase
310 U/l Cholesterinoxidase

Aktivierungsmittel: 2,2 g/l Thesit
1,3 g/l Natriumdesoxycholat
0,815 g/l 3,4-Dichlorphenol

Die oben getroffene Wahl der Zusätze ermöglicht die Aktivierung der Cholesterinesterase unter den durch die Eigenschaften der anderen Enzyme gestellten Bedingungen. Gleichzeitig ist es möglich, die Aufbewahrungsform des Reaktionsgemisches als Eintopfreakens in fester Form zu verwirklichen.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Aktivierung der Cholesterinesterase in ionenhaltiger Lösung durch Zusatz wenigstens eines oberflächenaktiven Mittels, gekennzeichnet dadurch, daß man
 - a) als oberflächenaktives Mittel einen Polyethoxyether oder -ester oder/und eine Gallensäureverbindung und/oder Salze von Fettsäuren mit 6 bis 10 Kohlenstoffatomen in Kombination mit
 - b) einem synergistisch wirkenden Alkohol, der aus den geradkettigen, verzweigten oder cyclischen aliphatischen Alkoholen mit 5 bis 12 Kohlenstoffatomen, gegebenenfalls halogensubstituierten, aromatischen Alkoholen und den mit mehreren Halogenatomen substituierten aliphatischen Alkoholen mit 1 bis 3 Kohlenstoffatomen ausgewählt ist, zusetzt.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß als Gallensäureverbindung Cholsäure, Desoxycholsäure oder ein Alkalisalz davon verwendet wird.
3. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß als Fettsäuresalz ein Alkalisalz verwendet wird.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Punkte, gekennzeichnet dadurch, daß 0,05 bis 5 % oberflächenaktives Mittel verwendet werden.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Punkte, gekennzeichnet dadurch, daß 0,01 bis 5 % Alkohol verwendet werden.

27. 8. 1980

AP A 61 B/219 760

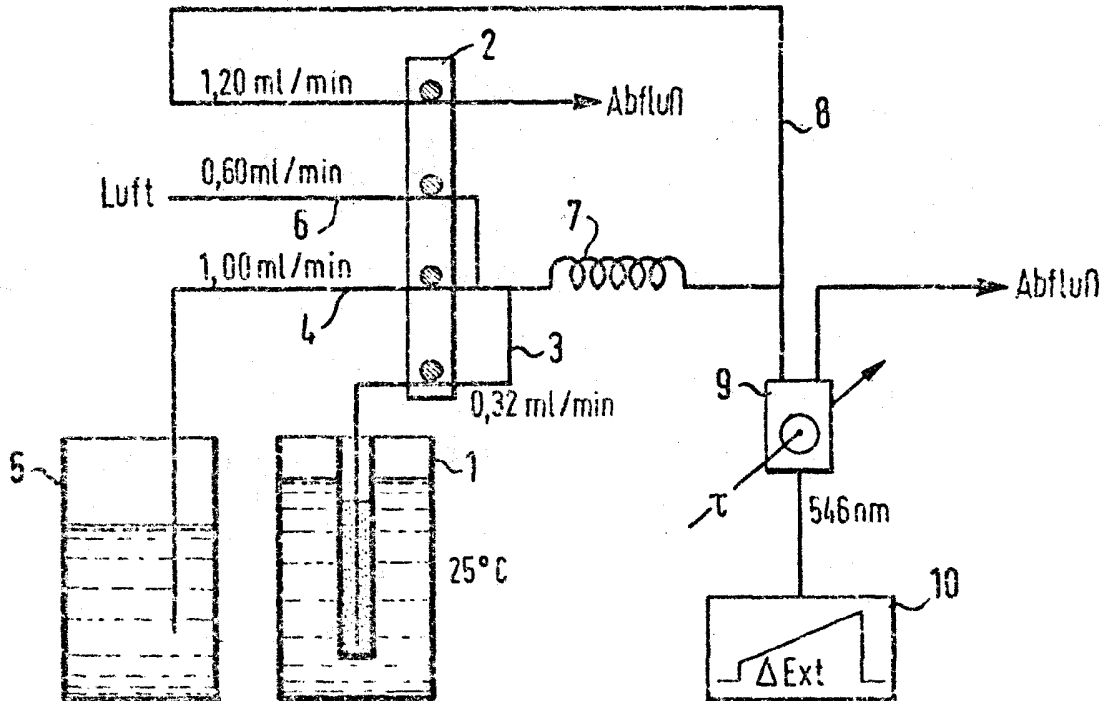
56 997 12

- 34 -

6. Mittel zur Aktivierung der Cholesterinesterase in ionenhaltiger Lösung, enthaltend wenigstens ein oberflächenaktives Mittel auf der Basis eines Polyethoxyethers oder -esters oder/und einer Gallensäureverbindung und/oder Salze von Fettsäuren mit 6 bis 10 Kohlenstoffatomen, gekennzeichnet durch einen Gehalt an synergistisch wirkendem Alkohol, der aus den geradkettigen Alkoholen oder verzweigt-kettigen oder cyclischen aliphatischen Alkoholen mit 5 bis 12 Kohlenstoffatomen, gegebenenfalls halogensubstituierten, aromatischen Alkoholen, halogensubstituierten aliphatischen Alkoholen mit 1 bis 3 Kohlenstoffatomen ausgewählt ist.
7. Mittel nach Punkt 6, gekennzeichnet dadurch, daß es 0,05 bis 5 %, bezogen auf die Enzymlösung, Detergens enthält.
8. Mittel nach Punkt 7, gekennzeichnet dadurch, daß es 0,1 bis 3 % oberflächenaktives Mittel enthält.
9. Mittel nach einem der Punkte 6 bis 8, gekennzeichnet dadurch, daß es 0,01 bis 5 % Alkohol enthält.
10. Mittel nach Anspruch 9, gekennzeichnet dadurch, daß es 0,05 bis 3 % Alkohol enthält.

Hierzu 1 Seite Zeichnungen

FIG. 1



[Ext]

FIG. 2

Ermittlung der Geschwindigkeit der Esterspaltung
in Extinktionsänderung pro Zeiteinheit

