



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 659 527 A5

⑤① Int. Cl.4: G 01 N 33/66
G 01 N 33/72
B 01 D 15/08

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTCHRIFT** A5

⑳ Gesuchsnummer:	4356/81	㉗ Inhaber:	Isolab, Inc., Akron/OH (US)
㉑ Anmeldungsdatum:	22.10.1980	㉘ Erfinder:	Acuff, Kenneth J., Clinton/OH (US) Rosenthal, Murray A., Akron/OH (US) Volk, Murray E., Akron/OH (US)
㉓ Priorität(en):	01.11.1979 US 090319	㉙ Vertreter:	E. Blum & Co., Zürich
㉕ Patent erteilt:	30.01.1987	㉚ Internationale Anmeldung:	PCT/US 80/01411 (En)
㉞ Patentschrift veröffentlicht:	30.01.1987	㉛ Internationale Veröffentlichung:	WO 81/01245 (En) 14.05.1981

⑤④ **Verfahren zur Bestimmung eines diagnostischen Indikators des Blutzuckerzustandes und flüssig-chromatographische Säulen hierfür.**

⑤⑦ Man bestimmt den numerischen Prozentsatzwert als diagnostischen Indikator für den Blutzuckerzustand einer bestimmten Person. Dabei wird ein Teil einer Testprobe mit einem Gehalt an einer Hämolyatlösung von roten Blutzellen in ein Ende einer cyanidfreien Mikrosäule gegeben. Diese enthält eine Suspension von Ionenaustauscherteilchen (152 µm), die entweder CarXH oder CarYOH, die in Anspruch 1 näher erklärt sind, darstellen. Enthält die Mikrosäule CarXH, so erhält man beim Eluieren mit einer cyanidfreien Pufferlösung als erste Fraktion die Hämoglobinart Hb-A_{1a-c}, ist CarYOH in der Säule, so erhält man die Hämoglobinarten ausser Hb-A_{1a-c}. Durch spektrometrische Analyse wird die erhaltene Fraktion mit der verdünnten Test-Hämolyatlösung verglichen und man stellt die Hämoglobinarten fest. Um einen zahlenmäßigen Prozentsatzwert für Hb-A_{1a-c} in der Testprobe als diagnostischen Indikator für die Blutzuckercharakteristika der Person zu erhalten, werden die Werte gemäss der nachstehenden Gleichung verglichen: (ganze Zahl für die erste Fraktion x 100)/(ganze Zahl für die Hämolyatlösung) = ein numerischer Prozentsatzwert.

Bei einem weiteren Verfahren, das noch zusätzliche Stufen umfasst, werden mit der gleichen Mikrosäule zwei Fraktionen erhalten.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Bestimmung eines numerischen Prozentsatzwertes als diagnostischer Indikator für den Blutzuckerzustand einer bestimmten Person, dadurch gekennzeichnet, dass man

a) eine Gesamtblutprobe von dieser Person nimmt und diese Probe als Testprobe mit einem Gehalt an einer Hämolyatlösung von roten Blutzellen aufbereitet,

b) einen Teil dieser Testprobe in ein Ende einer Säulenbett aufweisenden Mikrosäule gibt, das kein Cyanid enthält, wobei im Säulenbett der Mikrosäule eine in der Testprobe vorhandene Hämoglobinart absorbiert wird, und das Säulenbett eine in das Gleichgewicht gebrachte Suspension von Ionenaustauschteilchen mit einer Grösse von weniger als einem Sieb entsprechend einer lichten Maschenweite von 152 µm enthält, und die Teilchen in dem Säulenbett aus der Gruppe CarXH und CarYOH gewählt sind, worin Car ein inertes Substrat zum Tragen von ionisierbaren Gruppen X^- , welche dissoziierte Kationen H^+ liefern, und von ionisierbaren, dissoziierte Anionen OH^- liefernden Gruppen Y^+ darstellt, wobei die genannten CarXH-Teilchen ein schwach-saures Kationenaustauschmaterial mit einem angegebenen Wert pK_a von 3 bis 7 sind und in einer ins Gleichgewicht gebrachten Suspension bei einem pH-Wert von 6,0 bis 7,5 bei 22,5°C verwendet werden und die CarYOH-Teilchen ein schwach-basisches Anionenaustauschmaterial mit einem angegebenen Wert pK_a von 7 bis 10 darstellen und in einer ins Gleichgewicht gebrachten Suspension bei einem pH-Wert von 7,3 bis 9,0 bei 22,5°C verwendet werden,

c) anschliessend eine Menge einer cyanidfreien Pufferlösung in ein Ende der genannten Mikrosäule einführt, um hieraus eine erste Fraktion zu eluieren, welche bestimmte der in der Testprobe vorhandenen Hämoglobinarten enthält, wobei man, wenn das Säulenbett eine in das Gleichgewicht gebrachte Suspension von CarHX-Teilchen darstellt,

d₁) eine erste Fraktion erhält, die im wesentlichen die Gesamtmenge der Hämoglobinart Hb-A_{1a-c}, die in der Testprobe vorhanden ist, enthält, und wobei man, wenn das Säulenbett eine in das Gleichgewicht gebrachte Suspension von CarYOH-Teilchen darstellt,

d₂) eine erste Fraktion erhält, die im wesentlichen die Gesamtmenge der in der Testprobe enthaltenen Hämoglobinarten mit Ausnahme von Hb-A_{1a-c} enthält und anschliessend

e) eine aliquote Menge der ersten Eluatfraktion vom anderen Ende der Mikrosäule sammelt und dann

f) eine Menge der genannten Testlösung signifikant verdünnt, um eine Hämolyatlösung von roten Blutzellen zu ergeben, welche mittels spektrometrischer Analyse bestimmt werden kann, und anschliessend

g) die in der genannten ersten Eluatfraktion und in der genannten verdünnten Hämolyatlösung vorhandene Hämoglobinart getrennt mittels spektrometrischer Analyse feststellt und misst und schliesslich die jeweiligen Mengen hiervon als Zahlenwerte ausgedrückt, welche anschliessend in Übereinstimmung mit der nachstehenden mathematischen Gleichung verglichen werden:

$$\frac{\text{ganze Zahl für die erste Fraktion} \times 100}{\text{ganze Zahl für die Hämolyatlösung}} = \text{ein numerischer Prozentsatz,}$$

um einen zahlenmässigen Prozentsatzwert für die Hämoglobinart Hb-A_{1a-c} in der Testprobe zur Verwendung als diagnostischer Indikator für die Blutzuckercharakteristika der genannten bestimmten Person zu erhalten.

2. Verfahren zur Bestimmung eines numerischen Prozentsatzwertes als diagnostischer Indikator für den Blutzuckerzustand einer bestimmten Person, dadurch gekennzeichnet, dass man gemäss den in Anspruch 1 definierten Verfahrensstufen (a)

bis (e) eine aliquote Menge der ersten Eluatfraktionen vom anderen Ende der Mikrosäule sammelt

f) eine Menge einer Waschlösung in ein Ende der genannten Mikrosäule gibt, um aus dem Säulenbett der Mikrosäule durch Desorption und Eluierung eine Fraktion zu erhalten, die im wesentlichen alle verbleibenden Hämoglobinarten, die in der Testprobe vorhanden sind, enthält, wobei man, wenn das Säulenbett eine in das Gleichgewicht gebrachte Suspension von CarHX-Teilchen darstellt, eine zweite Fraktion erhält, welche im wesentlichen die Gesamtmenge der in der Testprobe enthaltenen Hämoglobinarten mit Ausnahme von Hb-A_{1a-c} enthält, und wobei man, wenn das Säulenbett eine in das Gleichgewicht gebrachte Suspension von CarYOH-Teilchen darstellt, eine zweite Fraktion erhält, welche im wesentlichen die Gesamtmenge der in der Testprobe enthaltenen Hämoglobinart Hb-A_{1a-c} enthält,

g) anschliessend eine aliquote Menge der genannten zweiten Eluatfraktion an dem anderen Ende der genannten Mikrosäule sammelt, und dann

h) die in der ersten und der zweiten Eluatfraktion vorhandenen Hämoglobinarten getrennt durch spektrometrische Analyse feststellt und misst und anschliessend die jeweiligen Mengen hiervon in Form von Zahlenwerten ausgedrückt, die anschliessend in Übereinstimmung mit der nachstehenden mathematischen Gleichung verglichen werden:

$$\frac{\text{ganze Zahl für die erste Fraktion} \times 100}{\text{ganze Zahl für die erste Fraktion} + \text{ganze Zahl für die zweite Fraktion}} = \text{numerischer Prozentsatzwert,}$$

um einen numerischen Prozentsatzwert für den Anteil der Hämoglobinart Hb-A_{1a-c} in der Testprobe zur Verwendung als diagnostischer Indikator für die Blutzuckercharakteristika der genannten bestimmten Person zu erhalten.

3. Cyanidfreie Mikrosäule zur Durchführung des Verfahrens gemäss Anspruch 1 oder Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass sie einen Vorratsbehälter aufweist, der in einen zylindrischen Teil übergeht, welcher mit einer endständigen Abgabespitze versehen ist, wobei die Verbindung zwischen dem genannten Vorratsbehälter und dem zylindrischen Teil und die Verbindung zwischen dem zylindrischen Teil und der genannten Spitze jeweils mittels einer Querscheibe oder Querplatte abgeschlossen ist, die gegenüber einer Hämolyatlösung von roten Blutzellen einer Testprobe, hergestellt aus einer Gesamtblutprobe, durchlässig sind, und wobei zwischen diesen Scheiben das in Anspruch 1 definierte Säulenbett, das eine in das Gleichgewicht gebrachte Suspension von Ionenaustauscherscheiben enthält, angeordnet ist.

4. Mikrosäule nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Säulenbett eine Suspension von CarYOH-Teilchen, die bei einem pH-Wert von 8,5 bei 22,5°C ins Gleichgewicht gebracht wurde, worin Car ein Cellulosematerial und Y^+ eine Diäthylaminoäthylgruppe bedeuten, enthält.

5. Mikrosäule nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Säulenbett eine Suspension von CarYOH-Teilchen enthält, die bei einem pH-Wert von 7,5 bei 22,5°C ins Gleichgewicht gebracht wurde, worin Car ein Harzcopolymeres von Polystyrol und Divinylbenzol und Y^+ eine Mischung von primären, sekundären und tertiären Aminogruppen der allgemeinen Formeln $-NH_2$, $-NHR$ und $-N(R)_2$ bedeuten, worin R einen aliphatischen Kohlenwasserstoff, vorzugsweise $-CH_3$ oder $-C_2H_5$, darstellt.

6. Mikrosäule nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Säulenbett eine Suspension von CarXH-Teilchen enthält, welche bei einem pH-Wert von 6,98 bei 22,5°C ins Gleichgewicht gebracht wurde, worin Car ein Harzpolymeres von Methacrylsäure und Divinylbenzol und X^- eine Carboxylgruppe bedeuten.

7. Mikrosäule nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Säulenbett eine Suspension von CarXH-Teilchen enthält, welche bei einem pH-Wert von 6,8 bei 22,5°C ins Gleichgewicht gebracht wurde, worin Car ein Cellulosematerial und X⁻ eine Carboxymethylgruppe bedeuten.

8. Mikrosäule nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Säulenbett eine Suspension von CarHX-Teilchen enthält, welche bei einem pH-Wert von 6,1 bei 22,5°C ins Gleichgewicht gebracht wurde, worin Car ein Cellulosematerial und X⁻ eine Carboxymethylgruppe bedeuten.

9. Mikrosäule nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Säulenbett eine Suspension von CarHX-Teilchen enthält, welche bei einem pH-Wert von 6,8 bei 22,5°C ins Gleichgewicht gebracht wurde, worin Car ein Harzcopolymeres von Methacrylsäure und Divinylbenzol und X⁻ eine Carboxylgruppe bedeuten.

Technisches Gebiet

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung eines numerischen Prozentsatzwertes als diagnostischer Indikator für den Blutzuckerzustand einer bestimmten Person. Die Erfindung betrifft ebenfalls auch verbesserte flüssig-chromatographische Säulen, die kein Cyanid enthalten, für die praktische Ausführung dieses Verfahrens.

Stand der Technik

Erfindungsgemäss wird von der Person, deren Blutzuckerzustand bestimmt werden soll, eine Gesamtblutprobe genommen und diese Probe wird als Testprobe mit einem Gehalt an einer Hämolyatlösung von roten Blutzellen aufbereitet. Anschliessend folgt eine Reihe von Stufen zur Abtrennung, Festlegung und Messung der Menge einer Gruppe von in der Testprobe vorhandenen Hämoglobinarten unter Verwendung einer verbesserten Vorrichtung für die Ionenaustausch-Flüssig-Säulenmikrophotographie, verbesserten Arbeitsweisen und Verfahrensweisen, einer verbesserten spektrometrischen Analyse und mathematischen Berechnungen.

In der Biochemie sind die Hämoglobine das amphotere Proteinmolekül-Färbematerial der roten Blutkörperchen, die der Zuführung von Sauerstoff zu den Geweben dienen. Verschiedene chromatographisch abtrennbare geringere Hämoglobine sind in den roten Blutzellenhämolysaten von normalen Personen vorhanden. Einige Nebenhämoglobine (minor) werden mit Hb-A_{1a}, Hb-A_{1b}, Hb-A_{1c}, Hb-A_{1d}, und Hb-A_{1e} bezeichnet. Die Hämoglobinart Hb-A_{1c} ist die wichtigste und ist für den Hauptanteil der Neben- oder Unter-Hämoglobine verantwortlich. Es ist bekannt, dass der Spiegel oder die Konzentration von Hämoglobin Hb-A_{1c} im Zusammenhang mit dem mittleren Blutzuckerspiegel eines Patienten steht. Bei normalen (gesunden) Personen soll der Gehalt an Hb-A_{1c}, bezogen auf den gesamten Hämoglobingehalt, 3 bis 6% betragen. Unbehandelte Diabetiker können 6 bis 12% Hb-A_{1c}, bezogen auf ihren gesamten Hämoglobingehalt, aufweisen, unabhängig davon, ob es sich um den Ausbruch der Krankheit im jugendlichen Alter oder im Erwachsenenstadium handelt. Es ist ferner ersichtlich, dass die Konzentrationen der Art Hb-A_{1c} als getrennte und identifizierte Untergruppe als Indikator für den Grad der Hyperglykämie, d.h. ein Überschuss von Zucker im Blut, während einer längeren Zeitdauer dienen kann.

Die Inhaberin der vorliegenden Erfindung, Isolab Incorporated, ist nunmehr Eigentümerin von fünf US-Patenten bezüglich Verfahren und Säulen, die den hier beschriebenen Verfahren und Säulen ähnlich sind. Diese Patente sind: US-PS Nr. 4 142 855, 4 142 856, 4 142 857 und 4 142 858, die jeweils im März 1979 für Acuff erteilt wurden, und US-PS Nr. 4 168 147, im September 1979 ebenfalls für Acuff erteilt.

Die ersten drei angeführten Isolab-Acuff-Patente ('855, '856 und '857) verwenden eine Ionenaustauschkolonne, die eine ins Gleichgewicht gebrachte Suspension von Celluloseteilchen umfasst. Die Celluloseteilchen sind von einem schwachen Basen- und Anionen-Austauschtyp gemäss dem Patent '855, und vom schwachen Säure- und Kationen-Austauschtyp gemäss den Patenten '856 und '857. Die zuletzt genannten zwei früheren Isolab-Acuff-Patente ('858 und '147) verwenden eine Ionenaustauschkolonne aus einer ins Gleichgewicht gebrachten Suspension von Harzteilen. Die Harzteile sind von einem schwachen Säure- und Kationenaustauschtyp.

In jedem der Isolab-Acuff-Patente wird ein Hinweis auf eine «Behandlungslösung» 28 gegeben, die zur Herstellung der Ionenaustauschteilchen 27 in der Form einer ins Gleichgewicht gebrachten Suspension 27 (S) verwendet wird. In jedem Patent wird die Behandlungslösung 28, die in geeigneter Weise hinsichtlich des pH-Wertes und/oder der Ionenstärke eingestellt ist, auch als «Eluierungslösung» 28 oder 128 verwendet, welche der Säule 20 nach der Einführung der Testprobe 10 zugegeben wird. Jede frühere oder bekannte Behandlungslösung 28 und Eluierungslösung 28 oder 128 war durch die Anwesenheit einer Cyanidverbindung oder eines Anions CN⁻ gekennzeichnet.

Die Verwendung von Cyanid (KCN) als Bestandteil oder als aktive Verbindung in Puffern oder Entwicklern für Hämoglobinchromatogramme war seit langem als wichtig angenommen worden; strenge Befolgung. In der früheren Literatur beschreibt eine Veröffentlichung von Allen et al., Observations on the Chromatography Heterogeneity of Normal Adult and Fetal Human Hämoglobin: A study of the Effects and Crystallization and Chromatography on the Heterogeneity and Isoleucine Content, Journal of the American Chemical Society, Band 80, Seiten 1628 bis 1634, April 1958, die Lehre, dass «Kaliumcyanid anfänglich den Entwicklern einverleibt wurde, um die Dissoziation von Ferrihämoglobincyanid während der Chromatographie zu verringern. Es wurde aus den Entwicklern nicht entfernt, wenn das Oxyhämoglobin chromatographiert wurde, da Ferrihämoglobincyanid und Oxyhämoglobin ein identisches chromatographisches Verhalten zeigen. Somit werden Spuren von Ferrihämoglobin (Methämoglobin) in Lösungen von Oxyhämoglobin in Ferrihämoglobincyanid umgewandelt und erzeugen keine langsam sich bewegenden Fremdzonen in der Säule (vgl. Seite 1630, oben).»

Anschliessend an die Erfindungen, wie sie in den Isolab-Patenten beschrieben sind, wurde festgestellt, dass mikrochromatographische klinische Techniken und Arbeitsweisen zur Bestimmung einer Indikation oder einer Konzentration der Hämoglobinarten Hb-A_{1a-c} nicht die Anwesenheit einer Cyandverbindung oder eines Cyanidrestes in einer Teilchenbehandlungslösung oder einer Puffer- oder Eluierungslösung erfordern. Tatsächlich muss die Anwesenheit von Cyanid als nachteilig und verschlechternd angesehen werden.

Beispielsweise beschreibt jedes der Isolab-Acuff-Patente die Lehre, dass die Menge der Hämoglobinart in einer besonderen Eluatfraktion, insbesondere Hb-A_{1a-c}, mittels spektrometrischer (Farb-)Analyse festgestellt und gemessen wird. Jedes Patent beschreibt spezifisch, dass die spektrometrische Analyse mit Hilfe einer Apparatur 40 ausgeführt werden kann, welche die durch die in der Testprobe 10 vorhandene Hämoglobinart verursachte Lichtabsorption misst. Die älteren Patente stützen sich auf die bekannte Tatsache, dass der sichtbare Anteil des Spektrums für die Feststellung der Anwesenheit eines Hämoglobins in dem Violettbereich (violet range), insbesondere bei im wesentlichen 415 nm oder 4150 Å, liegt.

Nach der Einreichung der den Isolab-Acuff-Patenten vor- hergehenden Patentanmeldungen wurde es ersichtlich, dass die ganzen Zahlen, welche die Mengen an in jeder Eluatfraktion anwesenden Hämoglobinart (bestimmt mittels spektrometrischer Analyse bei 450 nm) ausdrücken, durch einen Zeitfaktor

beeinflusst wurden. Wenn die spektrometrische Analyse ziemlich rasch (z.B. 30 Minuten nach der Eluierung) ausgeführt wurde, war die sich ergebende ganze Zahl in Übereinstimmung mit einem Norm- oder Standardwert. Jedoch nach einer längeren Zeitdauer (z.B. 60 Minuten) zeigte die erhaltene ganze Zahl einen niedrigeren Wert für die Hämoglobinart Hb-A_{1a-c} an. Nach einer sorgfältigen Analyse aller Aspekte der Arbeitsweisen und der Säulen, wie in den Isolab-Acuff-Patenten beschrieben, wurde nunmehr festgestellt, und es wird daher als kritisch bezeichnet, dass die Anwesenheit einer Cyanidverbindung oder eines Restes zu einer Ungenauigkeit in der wahren oder annehmbar richtigen ganzen Zahl, welche die in einer besonderen und spezifischen Testprobe enthaltene Hämoglobinart Hb-A_{1a-c} reflektiert, beitrug.

Es ist nunmehr ersichtlich, dass die Anwesenheit von Cyanid entweder in der Ionenaustauschteilchen-Behandlungslösung oder in der Pufferlösung das Auftreten einer dem Zeitfaktor unterworfenen Umwandlung von Ferrohämoglobinderivaten zu Ferrihämoglobincyanid erhöht, wobei damit eine Abänderung in der ganzen Zahl oder dem Wert, erhalten durch spektrometrische Analyse, verbunden ist. Natürlich würde ein geübter Laborant oder Techniker eine derartige Abänderung oder Variierung kompensieren. Jedoch erfordert die Beschaffung eines Standardtestes, der von relativ ungeübtem Personal durchgeführt wird, die Verwendung einer Technik und eines Verfahrens, bei welchem kein Cyanid verwendet wird.

Weitere Vorteile der Nicht-Verwendung von Cyanid umfassen die Erleichterung von Export-Import von Mikrosäulen und Reagenzien. In vielen Ländern der ganzen Welt führt die Kennzeichnung eines Produktes als «Cyanid enthaltend» zu vorschriftsbedingten Komplikationen. In Ländern der Produktherstellung kann die Beseitigung der Abfallflüssigkeiten oder Rückstände mit Bezug auf entweder die Reagenzherstellung oder die Gleichgewichtseinstellung des Ionenaustauschmaterials Umweltgefährdung hervorrufen und das Einschreiten der zuständigen Regierungskörperschaften begründen. Schliesslich wird die Beseitigung von verwendeten Säulen und Reagenzlösungen vereinfacht.

Darstellung der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist die Schaffung von Verfahren zur Bestimmung eines numerischen Prozentsatzwertes als diagnostischer Indikator für den Blutzuckerzustand einer bestimmten Person ohne die Verwendung von Reagenzien oder Lösungen mit einem Gehalt irgendwelcher Mengen, Spuren oder dgl. irgendeiner Cyanidverbindung oder eines Anions CN⁻.

Gemäss diesem Verfahren kann das Verhältnis oder der Anteil der Untergruppe der Hämoglobinart Hb-A_{1a-c} zu dem Gesamthämoglobingehalt (Hb), wie in dem Blut einer bestimmten Person vorhanden, rasch abgetrennt, festgestellt und gemessen werden, wobei dieses Verfahren billig, genau und ohne die Anwesenheit einer Cyanidverbindung oder des Anions CN⁻ ausführbar ist.

Das erfindungsgemässe Verfahren ist, obgleich es auf eine Anzahl von aufeinanderfolgenden oder konsekutiven Stufen erfordert, von einem solchen Charakter und einer solchen Beschaffenheit, dass es die Annahme von Arbeitsweisen und Protokollen gestattet, die zu Standard- und Routinemassnahmen werden können und es den in der klinischen Chemie erfahrenen Personen gestattet, wiederholt und genau das Blut von grossen Gruppen von Personen zu testen, um eine Datengrundlage für den Gebrauch durch qualifizierte, spezialisierte und medizinisch geübte Personen bei der Diagnose des Blutzuckerzustandes von bestimmten Personen, die unter dem Diabetikerverdacht stehen, aufzustellen.

Das erfindungsgemässe Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass man

a) eine Gesamtblutprobe von dieser Person nimmt und die-

se Probe als Testprobe mit einem Gehalt an einer Hämolyatlösung von roten Blutzellen aufbereitet,

b) einen Teil dieser Testprobe in ein Ende einer ein Säulenbett aufweisenden Mikrosäule gibt, das kein Cyanid enthält, wobei im Säulenbett der Mikrosäule eine in der Testprobe vorhandene Hämoglobinart absorbiert wird, und das Säulenbett eine in das Gleichgewicht gebrachte Suspension von Ionenaustauschteilchen mit einer Grösse von weniger als einem Sieb entsprechend einer lichten Maschenweite von 152 µm enthält, und die Teilchen in dem Säulenbett aus der Gruppe CarXH und CarYOH gewählt sind, worin Car ein inertes Substrat zum Tragen von ionisierbaren Gruppen X⁻, welche dissoziierte Kationen H⁺ liefern, und von ionisierbaren, dissoziierte Anionen OH⁻ liefernden Gruppen Y⁺ darstellt, wobei die genannten CarXH-Teilchen ein schwach-saures Kationenaustauschmaterial mit einem angegebenen Wert pK_a von 3 bis 7 sind und in einer ins Gleichgewicht gebrachten Suspension bei einem pH-Wert von 6,0 bis 7,5 bei 22,5°C verwendet werden und die CarYOH-Teilchen ein schwach-basisches Anionenaustauschmaterial mit einem angegebenen Wert pK_a von 7 bis 10 darstellen und in einer ins Gleichgewicht gebrachten Suspension bei einem pH-Wert von 7,3 bis 9,0 bei 22,5°C verwendet werden,

c) anschliessend eine Menge einer cyanidfreien Pufferlösung in ein Ende der genannten Mikrosäule einführt, um hieraus eine erste Fraktion zu eluieren, welche bestimmte der in der Testprobe vorhandenen Hämoglobinarten enthält, wobei man, wenn das Säulenbett eine in das Gleichgewicht gebrachte Suspension von CarHX-Teilchen darstellt,

d) eine erste Fraktion erhält, die im wesentlichen die Gesamtmenge der Hämoglobinart Hb-A_{1a-c}, die in der Testprobe vorhanden ist, enthält, und wobei man, wenn das Säulenbett eine in das Gleichgewicht gebrachte Suspension von CarYOH-Teilchen darstellt,

d₂) eine erste Fraktion erhält, die im wesentlichen die Gesamtmenge der in der Testprobe enthaltenen Hämoglobinarten mit Ausnahme von Hb-A_{1a-c} enthält und anschliessend

e) eine aliquote Menge der ersten Eluatfraktion vom anderen Ende der Mikrosäule sammelt und dann

f) eine Menge der genannten Testlösung signifikant verdünnt, um eine Hämolyatlösung von roten Blutzellen zu ergeben, welche mittels spektrometrischer Analyse bestimmt werden kann, und anschliessend

g) die in der genannten ersten Eluatfraktion und in der genannten verdünnten Hämolyatlösung vorhandene Hämoglobinart getrennt mittels spektrometrischer Analyse feststellt und misst und schliesslich die jeweiligen Mengen hier vor als Zahlenwerte ausgedrückt, welche anschliessend in Übereinstimmung mit der nachstehenden mathematischen Gleichung verglichen werden:

$$\frac{\text{ganze Zahl für die erste Fraktion} \times 100}{\text{ganze Zahl für die Hämolyatlösung}} = \text{ein numerischer Prozentsatzwert,}$$

um einen zahlenmässigen Prozentsatzwert für die Hämoglobinart Hb-A_{1a-c} in der Testprobe zur Verwendung als diagnostischer Indikator für die Blutzuckercharakteristika der genannten bestimmten Person zu erhalten.

Bei einem weiteren erfindungsgemässen Verfahren zur Bestimmung eines numerischen Prozentsatzwertes als diagnostischer Indikator für den Blutzuckerzustand einer bestimmten Person wird gemäss den weiter oben definierten Verfahrensstufen (a) bis (e) eine aliquote Menge der ersten Eluatfraktion vom anderen Ende der Mikrosäule gesammelt,

f) eine Menge einer Waschlösung in ein Ende der genannten Mikrosäule gegeben, um aus dem Säulenbett der Mikrosäule durch Desorption und Eluierung eine Fraktion zu erhalten, die im wesentlichen alle verbleibenden Hämoglobinarten, die in der

Testprobe vorhanden sind, enthält, wobei man, wenn des Säulenbett eine in das Gleichgewicht gebrachte Suspension von CarHX-Teilchen darstellt, eine zweite Fraktion erhält, welche im wesentlichen die Gesamtmenge der in der Testprobe enthaltenen Hämoglobinarten mit Ausnahme von Hb-A_{1a-c} enthält, und wobei man, wenn das Säulenbett eine in das Gleichgewicht gebrachte Suspension von CarYOH-Teilchen darstellt, eine zweite Fraktion erhält, welche im wesentlichen die Gesamtmenge der in der Testprobe enthaltenen Hämoglobinart Hb-A_{1a-c} enthält,

g) anschliessend sammelt man eine aliquote Menge der genannten zweiten Eluatfraktion an dem anderen Ende der genannten Mikrosäule und dann wird

h) die in der ersten und der zweiten Eluatfraktion vorhandenen Hämoglobinarten getrennt durch spektrometrische Analyse festgestellt und gemessen und anschliessend werden die jeweiligen Mengen hiervon in Form von Zahlenwerten ausgedrückt, die anschliessend in Übereinstimmung mit der nachstehenden mathematischen Gleichung verglichen werden:

$$\frac{\text{ganze Zahl für die erste Fraktion} \times 100}{\text{ganze Zahl für die erste Fraktion} + \text{ganze Zahl für die zweite Fraktion}} = \text{numerischer Prozentsatzwert,}$$

um einen numerischen Prozentsatzwert für den Anteil der Hämoglobinart Hb-A_{1a-c} in der Testprobe zur Verwendung als diagnostischer Indikator für die Blutzuckercharakteristika der genannten bestimmten Person zu erhalten.

Bei jedem der beiden Verfahren liefert eine geeignete mathematische Formel einen numerischen Prozentsatzwert für die Hämoglobinart Hb-A_{1a-c}, welche in der besonderen oder jeweiligen Testprobe zum Gebrauch als diagnostischer Indikator der Blutzuckercharakteristika der Person, welche die Testprobe liefert, vorhanden ist.

Bei jedem Verfahren der vorliegenden Erfindung ist der sich ergebende zahlenmässige Prozentsatzwert für den Gebrauch durch qualifizierte, spezialisierte und medizinisch geschulte Personen als diagnostischer Indikator für die Blutzuckercharakteristika eines Patienten, der die Testprobe liefert, erhältlich.

Die cyanidfreie Mikrosäule, die zur Durchführung der beiden weiter oben definierten Verfahren eingesetzt wird, ist dadurch gekennzeichnet, dass sie einen Vorratsbehälter aufweist, der in einen zylindrischen Teil übergeht, welcher mit einer endständigen Abgabespitze versehen ist, wobei die Verbindung zwischen dem genannten Vorratsbehälter und dem zylindrischen Teil und die Verbindung zwischen dem zylindrischen Teil und der genannten Spitze jeweils mittels einer Querscheibe oder Querplatte abgeschlossen ist, die gegenüber einer Hämolyatlösung von roten Blutzellen einer Testprobe, hergestellt aus einer Gesamtblutprobe, durchlässig sind, und wobei zwischen diesen Scheiben das im ersten Verfahren definierte Säulenbett, das eine in das Gleichgewicht gebrachte Suspension von Ionenaustauscherscheiben enthält, angeordnet ist.

Kurze Beschreibung der Zeichnung

Die Zeichnung zeigt schematisch die praktische Ausführung der Erfindung, insbesondere hinsichtlich der zweiten Verfahrensweise, worin eine erste und eine zweite Fraktion von Hämoglobinarten aus einer verbesserten chromatographischen Mikrosäule, die im wesentlichen in voller Grösse dargestellt ist, eluiert werden.

Bester Weg zur Ausführung

Die praktische Ausführung der erfindungsgemässen Verfahren erfordert die Sammlung einer Gesamtblutprobe von einer Person oder einem Patienten. Die Gesamtblutprobe kann unter Anwendung von üblichen klinischen chemischen Arbeitsweisen und Techniken entnommen werden.

Die Offenbarung der bekannten Isolab-Acuff-Patente, die im einzelnen zwei allgemeine in der Technik bekannte Arbeitsweisen für die Herstellung einer geeigneten Testprobe beschreiben, wie sie allgemein hier durch das Bezugszeichen 10 angegeben sind, und die eine Hämolyatlösung von roten Blutzellen aus einer Gesamtblutprobe enthält, wird hierin bezugsweise eingeführt. Eine Arbeitsweise 10-a wird zur Herstellung einer Testprobe 10 angewendet, die vorwiegend aus dem Hämoglobingehalt der Gesamtblutprobe besteht. Eine Arbeitsweise 10-b wird zur Herstellung einer Testprobe 10 angewendet, welche die Plasmaproteine, Lipide und die Bruchstücke von weissen und roten Blutzellen zusätzlich zu dem Hämoglobingehalt der Gesamtblutprobe enthalten kann.

Mit Bezug auf die Zeichnung, die im wesentlichen massstabgetreu ist, ist eine chromatographische Mikrosäule allgemein durch die Bezugszahl 20 bezeichnet. Eine Säule 20 umfasst einen Vorratsbehälter 21, der sich in einen rohrförmigen Teil 22 öffnet, welcher in eine Abgabespitze 23 endet, die selektiv durch eine Kappe 24 verschlossen ist. Die Verbindung oder die Unterbrechung zwischen dem Vorratsbehälter 21 und dem rohrförmigen Teil 22 ist durch eine Querplatte oder -scheibe 25 verschlossen. Die Verbindung zwischen dem rohrförmigen Teil 22 und der Abgabespitze 23 ist ebenfalls durch eine Querplatte oder Querscheibe 26 verschlossen. Die Ionenaustauschteilchen, welche das Säulenbett zwischen den Scheiben 25 und 26 ausfüllen, werden allgemein durch das Bezugszeichen 27 angegeben.

Jede der Zurückhaltescheiben 25 und 26 ist durchlässig und weist ein Netzwerk von Mikroporen auf, welche die Einführung einer Hämolyatlösung von roten Blutzellen aus dem Vorratsbehälter 21 in den rohrförmigen Teil 22 und die Entfernung einer Eluatfraktion aus dem rohrförmigen Teil 22 durch die Spitze 23 gestattet, während das Säulenbett aus Teilchen 27 innerhalb des rohrförmigen Teiles 22 zurückgehalten wird. Die Scheiben 25 und 26 können aus gebräuchlichem biegsamen, elastischen, linearen Polyäthylen hoher Dichte vom Ziegler-Typ hergestellt sein. Im Handel wird diese Art von Polyäthylen von Filterqualität unter dem Namen Vyon hergestellt und verkauft.

Gemäss der Erfindung besitzen die Ionenaustauschteilchen 27 eine Grösse von weniger als entsprechend einem Sieb mit einer lichten Maschenweite von 152 µm und werden aus der Klasse von CarHX und CarYOH ausgewählt. «Car» bedeutet ein inertes Substratmaterial und kann aus einem celluloseartigen oder harzartigen Copolymeren von Polystyrol oder Methacrylsäure und Divinylbenzol bestehen. X⁻ bedeutet eine ionisierbare Gruppe, welche dissoziierte Kationen H⁺, getragen von einem «Car», liefert, und kann eine Carboxylgruppe oder eine Carboxymethylgruppe sein. Y⁺ bedeutet eine ionisierbare Gruppe, welche dissoziierte Anionen OH⁻, getragen von einem «Car», liefert, und kann eine Diäthylaminoäthylgruppe oder eine Mischung von Aminogruppen mit der allgemeinen Formel -NH₂, -NHR und -N(R)₂ sein.

Die CarXH-Teilchen 27 können auch als schwach-saure Kationenaustauscher mit einem angegebenen Wert pK_a von 3 bis 7 charakterisiert sein. Die CarYOH-Teilchen können auch als schwach-basische Anionenaustauscher mit einem angegebenen Wert pK_a von 7 bis 10 charakterisiert sein.

Die im Handel erhältliche Form von Ionenaustauschermaterialteilchen 27 erfordert üblicherweise eine Aufbereitung oder eine Behandlung zur Verwendung in einem rohrförmigen Teil 22 einer Mikrosäule 20 zwischen den Scheiben 25 und 26. Diese Behandlung könnte mit den Teilchen 27 in situ in dem Säulenrohr 22 ausgeführt werden. Es wird jedoch bevorzugt, dass die Teilchen 27 für eine Reihe von identischen Säulen 20 unter Verwendung einer Ansatztechnik behandelt werden, welche die Verwendung von Säulen 20 mit vorbestimmten mikrochromatographischen Eigenschaften und Charakteristika gestattet.

Die Ionenaustauschteilchen 27, welche das Säulenbett einer Säule 20 bilden, werden in Form von einer ins Gleichgewicht

gebrachten Suspension 27 (S) mit einem vorbestimmten oder «Ausgangs»-pH-Wert verwendet. Die CarXH-Teilchen werden in einer Suspension 27 (S) bei einem pH-Wert von 6,0 bis 7,5 bei 22,5°C verwendet. Die CarYOH-Teilchen werden in einer Suspension 27 (S) bei einem pH-Wert von 7,3 bis 9,0 bei 22,5°C verwendet. Eine Suspension 27 (S) wird unter Anwendung einer Behandlungslösung 28, welche kein Cyanid darin enthält, hergestellt.

Gemäss der Erfindung kann auch eine Behandlungslösung 28 als Pufferlösung 128 zur Eluierung von einem Säulenbett, welches eine Suspension 27 (S) von entweder CarHX- oder CarYOH-Teilchen umfasst, einer Eluatfraktion mit einem Gehalt von bestimmten, jedoch nicht von allen, Hämoglobinarten, welche in der Testprobe 10 enthalten sind, verwendet werden.

Eine Menge der Testprobe 10, hergestellt entweder durch das Verfahren 10-a oder 10-b, wird in ein Ende einer Säule 20 mit einem Säulenbett aus einer in das Gleichgewicht gebrachten Suspension 27 (S) eingebracht. Eine gemäss der Arbeitsweise 10-a hergestellte Testprobe erfordert eine Verdünnung von 1:4 unter Verwendung von destilliertem Wasser.

Vorzugsweise wird die Säule 20 senkrecht angeordnet, die Abgabespitzenkappe 24 wird entfernt, und ein vorbestimmtes Volumen einer Testprobe 10 wird in den Vorratsbehälter abgegeben oder darin eingebracht. Ein überwiegender Teil der Testprobe 10 geht mühelos durch die Scheibe 25 hindurch und gelangt auf das Säulenbett der Suspension 27 (S). Der kleinere Teil der Testprobe 10, der auf oder in der Scheibe 25 verbleibt, sollte auf das Säulenbett unter Verwendung eines kleinen Volumens (z.B. 0,2 ml) einer zur Verwendung als Pufferlösung 128 in der nachfolgenden Verfahrensstufe gemäss der Erfindung vorgesehenen Lösung ausgespült oder verdrängt werden.

Eine vorbestimmte Menge oder ein aliquoter Anteil einer Pufferlösung 128, welche kein Cyanid enthält, wird in den Säulenvorratsbehälter 21 abgegeben, um bevorzugt aus der Abgabespitze 23 eine erste Fraktion 30 aus der Testprobe 10 zu eluieren. Die erste Fraktion 30 wird in einem Aufnahmegefäß 31 gesammelt. Wenn das Säulenbett aus einer Suspension 27 (S) von CarXH-Teilchen besteht, enthält die erste Fraktion 30 im wesentlichen die gesamte Hämoglobinart Hb-A_{1a-c}, welche in der Testprobe 10 vorhanden ist. Wenn das Säulenbett eine Suspension 27 (S) aus CarYOH-Teilchen umfasst, enthält die erste Fraktion 30 im wesentlichen die gesamte Menge der Hämoglobinart, die in der Testprobe 10 vorhanden ist, mit Ausnahme der Art Hb-A_{1a-c}. In jedem Fall wird nach einer Zeitdauer im Anschluss an den Zusatz des Puffers 28 eine aliquote Menge einer ersten Fraktion 30 in einem Aufnahmegefäß 31 gesammelt.

Bei einer Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens, wie es in der Zeichnung dargestellt ist, wird eine zweite Fraktion 32 der Testprobe 10 in einem Aufnahmegefäß 33 gesammelt, nachdem eine aliquote Menge einer Waschlösung 34 in den Säulenvorratsbehälter 21 abgegeben worden ist. Die zweite Fraktion 32 enthält im wesentlichen die Gesamtmenge der verbleibenden Hämoglobinart, welche in der Testprobe 10 enthalten ist. Wenn das Säulenbett aus einer Suspension 27 (S) von CarXH-Teilchen besteht, enthält die zweite Fraktion 32 im wesentlichen die Gesamtmenge der Hämoglobinart, welche in der Testprobe 10 enthalten ist, mit Ausnahme von Hb-A_{1a-c}. Wenn das Säulenbett aus einer Suspension 27 (S) von CarYOH-Teilchen besteht, enthält die zweite Fraktion 32 praktisch die Gesamtmenge der Hämoglobinart Hb-A_{1a-c}, welche in der Testprobe 10 enthalten ist. In jedem Fall wird eine aliquote Menge einer zweiten Fraktion 32 in einem Aufnahmebehälter 33 gesammelt.

Die Waschlösung 34 enthält kein Cyanid darin. Andererseits ist die genaue Zusammensetzung einer Waschlösung 34 nicht kritisch, solange die Verwendung hiervon nicht die spektrometrischen Absorptionseigenschaften («Farbe») einer eluierten Fraktion 32 ändert oder modifiziert. Eine verträgliche Waschlösung

34 besitzt entweder eine Ionenstärke oder einen relativen pH-Wert, der ausreicht, um vollständig oder in vollem Ausmass im wesentlichen sämtliche der verbleibenden Blutkomponenten einer Testprobe 10 aus einem Säulenbett aus Ionenaustauschteilchen 27 zu desorbieren. Beispielsweise kann ein Volumen von 4 ml einer 4m-NaCl-Lösung in einen Säulenvorratsbehälter 21 abgegeben werden. Nach einer Zeitdauer (z.B. 20 bis 30 Minuten) wird eine Eluatfraktion von im wesentlichen 4 ml Volumen in einem Aufnahmebehälter 33 gesammelt. Eine aus der Suspension 27 (S) von CarXH-Teilchen eluierte Fraktion 32 erfordert eine geeignete Verdünnung unter Verwendung von destilliertem Wasser vor der nächsten nachfolgenden Verfahrensstufe gemäss der vorliegenden Erfindung.

Gemäss den erfindungsgemässen Verfahren wird bei der Bestimmung des Verhältnisses von Hb-A_{1a-c} zu den gesamten Hämoglobinen (Hb), die in der von der Person oder dem Patienten gesammelten Gesamtblutprobe vorhanden sind, im Anschluss an die Ausführung der Techniken und Verfahrensweisen der Flüssigsäulen-Mikrochromatographie unter Verwendung einer Testprobe 10 eine spektrometrische Vorrichtung, die allgemein mit dem Bezugszeichen 40 bezeichnet ist, verwendet.

Die spektrometrische Analyse wird mit Hilfe der Vorrichtung 40 ausgeführt, mit welcher die Absorption von Licht, die durch die in der Testprobe 10 vorhandene Hämoglobinart verursacht wird, gemessen wird. Es ist bekannt, dass der sichtbare Teil des Spektrums für die Bestimmung der Anwesenheit eines Hämoglobins im violetten Bereich, insbesondere bei im wesentlichen 415 nm oder 4150 Å liegt.

Die Vorrichtung 40 kann ein optisches Spektrometer sein, das der ausgewählten Wellenlänge von 415 nm «zugeordnet» oder auf diese eingestellt ist. Die Vorrichtung 40 kann auch ein Spektrophotometer, eine Form eines Spektrometers mit einer damit verbundenen Einrichtung, welche das Verhältnis oder eine Funktion des Verhältnisses der Bestrahlungsstärke von zwei Strahlen als Funktion einer einstellbaren, gewählten spektralen Wellenlänge zuführt, sein. Da die spektrometrische Analyse gemäss der Erfindung dem Zweck der Feststellung und Messung einer Hämoglobinart von der Testprobe 10 durch das Lichtabsorptionsverhalten dient, könnten auch alternative Formen einer Vorrichtung 40 zur Anwendung gelangen, z.B. visuelle Gleichheitsprüfer oder Komparatoren, z.B. ein Satz von Nessler-Rohren.

Bei einer Ausführungsform der erfindungsgemässen Verfahren werden die Inhalte der Aufnahmegefässe 31 und 33 getrennt in geeignete Küvetten für die spektrometrische Vorrichtung 40 überführt. Die spektrometrische Analyse der ersten und zweiten Eluatfraktionen 30 und 32 ergeben ganze Zahlen oder natürliche Zahlen, die die Mengen der Hämoglobinart, die in der Testprobe vorhanden sind, ausdrücken, wiedergeben oder anzeigen. Bei Verwendung eines üblichen Spektrometers oder Spektrophotometers als Vorrichtung 40 ist die aufgezeigte ganze Zahl eine Funktion des Absorptionsvermögens (A), eine Messung der Lichtmenge der spektralen Wellenlänge von 415 nm, welche durch die Hämoglobinart während des Durchgangs durch die Küvette und zu der Ansprech- oder Abtastphotozelle absorbiert wurde.

Die ausgedrückten Zahlenwerte für die getrennt festgestellte und gemessene Hämoglobinart in jeder Eluatfraktion 30 und 32 einer besonderen Testprobe 10 werden dann in Übereinstimmung mit einer mathematischen Formel verglichen.

Wenn die Eluatfraktionen 30 und 32 aus einem Säulenbett, das eine Suspension 27 (S) von CarXH-Teilchen umfasst, eluiert werden, ist die Berechnung

$$\frac{\text{ganze Zahl für die erste Fraktion 30} \times 100}{\text{ganze Zahl für die erste Fraktion 30} + \text{ganze Zahl für die zweite Fraktion 32}} = \text{ein numerischer Prozentsatzwert.}$$

Wenn die Eluatfraktionen 30 und 32 aus einem Säulenbett, welches eine Suspension 27 (S) von CarYOH-Teilchen umfasst, eluiert werden, ist die Berechnung

$$\frac{\text{ganze Zahl für die zweite Fraktion 32} \times 100}{\text{ganze Zahl für die erste Fraktion 30} + \text{ganze Zahl für die zweite Fraktion 32}} =$$

ein numerischer Prozentsatzwert.

Bei einer anderen Ausführungsform der erfindungsgemässen Verfahren wird unter Anwendung eines Säulenbettes, das eine Suspension 27 (S) entweder von CarXH-Teilchen und eine Pufferlösung 128 umfasst, eine aliquote Menge einer ersten Eluatfraktion 30 in einem Aufnahmegefäss 31 gesammelt. Auch wird entweder zu einem früheren Zeitpunkt, gleichzeitig oder nachfolgend eine Menge der Testprobe 10 als eine Hämolyatlösung von roten Blutzellen 42 hergestellt, welche bequem durch spektrometrische Analyse festgestellt und gemessen werden kann. Es ist ersichtlich, dass die Lichtabsorptionscharakteristika der Testprobe 10 ohne eine signifikante Verdünnung von solcher Grösse sein würde, dass sie die Betriebs- oder Arbeitsleistung der Abtast- oder Feststellphotozelle von einer gebräuchlichen spektrometrischen Apparatur 40 beeinträchtigen würde. Demgemäss und beispielsweise sollte eine Menge der Testprobe 10 gleich dem Volumen der Testprobe 10, welche zu einem Ende einer Kolonne 20 vor einer Verdünnung der ersten Fraktion 30 eingeführt wurde, unter Verwendung von destilliertem Wasser in einem Verhältnis von im wesentlichen 1 : 480 verdünnt werden, um eine Hämolyatlösung 42 für eine Analyse mittels einer spektrometrischen Apparatur 40 vorzubereiten.

Die ausgedrückten zahlenmässigen Werte für die getrennt festgestellten und gemessenen Hämoglobinarten in der Eluatfraktion 30 und in der verdünnten Hämolyatlösung 42 von einer besonderen Testprobe 10 werden dann verglichen in Übereinstimmung mit einer mathematischen Formel.

Wenn die Eluatfraktion 30 von einem Säulenbett, welches eine Suspension 27 (S) von CarXH-Teilchen umfasst, eluiert wird, ist die Berechnung

$$\frac{\text{ganze Zahl für die Eluatfraktion 30} \times 100}{\text{ganze Zahl für die Hämolyatlösung 42}} =$$

ein numerischer Prozentsatzwert.

Wenn die Eluatfraktion 30 von einem Säulenbett, welches eine Suspension 27 (S) von CarYOH-Teilchen umfasst, eluiert wird, ist die Berechnung

$$100 - \frac{(\text{ganze Zahl für die Eluatfraktion 30} \times 100)}{(\text{ganze Zahl für die Hämolyatlösung 42})} =$$

ein numerischer Prozentsatzwert:

Die Verwendung irgendeiner dieser mathematischen Berechnungen liefert einen numerischen Wert für die Hämoglobinart Hb-A_{1a-c}, die in einer besonderen Testprobe 10 für die Verwendung als diagnostischer Indikator der Blutzuckercharakteristika der diese Testproben liefernden Person vorhanden ist.

Die nachstehenden Beispiele geben eine weitere Erläuterung und Beschreibung der praktischen Ausführung der Erfindung durch Fachleute in der klinischen Chemie.

Beispiel 1

Ein CarYOH-Ionenaustauschteilchen kann von der Art sein, worin «Car» ein Cellulosematerial und Y⁺ eine Diäthylamino-gruppe, -O-CH₂-CH₂-N(C₂H₅)₂ mit einem angegebenen Wert pK_a von im wesentlichen 9,5 darstellt. Im Handel wird diese Art von Ionenaustauschmaterial unter der Bezeichnung «Whatman DEAE-52» vertrieben.

Diese Cellulosepartikel 27 werden in Form einer Suspension 27 (S) mit einem pH-Wert von im wesentlichen 8,5 bei 22,5°C durch Vermischen mit einer «tris»-Behandlungslösung 28 der Zusammensetzung von 6,06 g H₂N-C(CH₂OH)₃ (0,05 m) mit 0,10 g NaN₃ (0,01%) als Konservierungsmittel, aufbereitet in 1 l H₂O, hergestellt. Nach dem Vermischen mit der Behandlungslösung 28 werden die Cellulosepartikel 27 anschliessend weiterbehandelt mit einer sauren Lösung 29 (z.B. 4 m-HCl), um erneut den pH-Wert auf im wesentlichen 8,5 einzustellen.

Bei beiden Verfahrensausführungsformen der Erfindung wird eine Menge einer Pufferlösung 128 in ein Ende eines Säulenbettes aus einer Suspension 27 (S) von diesen Cellulosepartikeln eingeführt, um vorzugsweise hieraus eine Eluatfraktion 30 mit einem Gehalt von im wesentlichen der Hämoglobinart, die in der Testprobe 10 vorhanden ist mit Ausnahme derjenigen von Hb-A_{1a-c}, zu eluieren. Die Pufferlösung 128 kann eine «tris»-Lösung von der gleichen Zusammensetzung wie die Behandlungslösung 28 mit dem im wesentlichen auf 7,5 bei 22,5°C unter Verwendung von konzentriertem HCl eingestellten pH-Wert auf 7,7 sein.

Beispiel 2

Ein anderes CarYOH-Ionenaustauschteilchen 27 kann von der Art sein, worin «Car» ein Harzcopolymeres von Polystyrol und Divinylbenzol und Y⁺ eine Mischung aus primären, sekundären und tertiären Aminogruppen der allgemeinen Formeln -NH₂, -NHR und -N(R)₂, worin R einen aliphatischen Kohlenwasserstoffrest, z.B. -CH₃ oder -C₂H₅, bedeutet, darstellt. Diese Teilchen 27 haben einen angegebenen Wert pK_a von 7 bis 9. Im Handel wird diese Art von Ionenaustauschmaterial unter den Bezeichnungen «Dowdex MWA-1» und «Amberlite IRA-93» vertrieben.

Diese Harzteilchen 27 können in Form einer Suspension 27 (S) mit einem pH-Wert von im wesentlichen 7,5 bei 22,5°C durch Vermischen mit einer «tris»-Behandlungslösung 28 der gleichen Zusammensetzung wie in Beispiel 1 hergestellt werden.

Eine erste Fraktion 30 einer Testprobe 10 mit einem Gehalt von im wesentlichen der gesamten Hämoglobinarten mit Ausnahme von Hb-A_{1a-c} kann aus dem Säulenbett einer Suspension 27 (S) von diesen Harzteilchen unter Verwendung einer «tris»-Pufferlösung 128 der gleichen Zusammensetzung wie in Beispiel 1 mit einem pH-Wert, eingestellt auf im wesentlichen 7,5 bei 22,5°C, eluiert werden.

Beispiel 3

Ein CarXH-Ionenaustauschteilchen 27 kann von der Art sein, worin «Car» ein Harzcopolymeres von Methacrylsäure und Divinylbenzol und X⁺ eine Carboxylgruppe, -COOH, mit einem angegebenen Wert pK_a von 4 bis 6 ist. Im Handel ist diese Art von Ionenaustauschmaterial vertrieben unter der Bezeichnung «Amberlite CG-50».

Die Harzpolymere 27 werden in Form einer Suspension 27 (S) mit einem pH-Wert von im wesentlichen 6,98 bei 22,5°C durch Vermischen einer «Phosphat»-Behandlungslösung 28 der Zusammensetzung: 3,74 g KH₂PO₄ (0,027 M), 0,955 g KOH (0,017 m) mit 0,10 g NaN₃ (0,01%) als Konservierungsmittel, aufbereitet in 1 l Wasser, hergestellt. Nach dem Vermischen der Behandlungslösung 28 werden die Harzteilchen 27 dann weiter mit einer Säurelösung 29 (z.B. 4 m-H₃PO₄) behandelt, um den pH-Wert im wesentlichen auf 6,98 erneut einzustellen.

Bei beiden Ausführungsformen des Verfahrens gemäss der Erfindung wird eine Menge einer Pufferlösung 128 in ein Ende eines Säulenbettes von einer Suspension 27 (S) von diesen Harzteilchen eingebracht, um hieraus bevorzugt eine Eluatfraktion 30 mit einem Gehalt von im wesentlichen der Gesamtmenge der Hämoglobinart Hb-A_{1a-c}, welche in einer Testprobe 10 vorhanden ist, zu eluieren. Die Pufferlösung 128 kann eine «Phosphat»-Lösung der gleichen Zusammensetzung wie die Behand-

lungslösung 28 sein und einen pH-Wert von im wesentlichen 6,98 aufweisen.

Beispiel 4

Ein anderes CarXH-Ionenaustauschteilchen 27 kann von der Art sein, worin «Car» ein Cellulosematerial und X⁻ eine Carboxymethylgruppe -CH₂COOH mit einem angegebenen Wert pK_a von 3,5 bedeuten. Im Handel wird diese Art von Ionenaustauschmaterial unter der Bezeichnung «Whatman CM-52» vertrieben.

Diese Celluloseeteilchen 27 können in Form einer Suspension 27 (S) mit einem pH-Wert von im wesentlichen 6,8 bei 22,5°C durch Vermischen mit einer «Phosphat»-Behandlungslösung 28 der Zusammensetzung: 3,74 g KH₂PO₄ (0,027 m) und 0,748 g KOH (0,013 m) mit 0,10 g NaN₃ (0,01%) als Konservierungsmittel, aufbereitet in 1 l Wasser, hergestellt werden.

Eine erste Fraktion 30 einer Testprobe 10, welche im wesentlichen die Gesamtmenge der Hämoglobinart Hb-A_{1a-c} enthält, kann aus einem Säulenbett von einer Suspension 27 (S) von diesen Celluloseeteilchen unter Verwendung einer «Phosphat»-Pufferlösung 128 der gleichen Zusammensetzung wie die Behandlungslösung 28 und mit einem pH-Wert von im wesentlichen 6,8 eluiert werden.

Beispiel 5

Die Celluloseeteilchen 27 von Beispiel 4 können in Form einer Suspension 27 (S) mit einem pH-Wert von im wesentlichen 6,1 bei 22,5°C durch Vermischen mit einer «bis-tris»-Behand-

lungslösung 28 der Zusammensetzung: 6,28 g (HOCH₂CH₂)₂NC(CH₂OH)₃ (0,03 m) mit 0,10 g NaN₃ (0,01%) als Konservierungsmittel, aufbereitet in 1 l Wasser, hergestellt werden. Nach Vermischen der Behandlungslösung 28 werden die Celluloseeteilchen 27 dann weiter mit einer sauren Lösung 29 (z.B. 4 m HCl) behandelt, um den pH-Wert auf im wesentlichen 6,1 erneut einzustellen.

Eine erste Fraktion 30 einer Testprobe 10, welche im wesentlichen die Gesamtmenge der Hämoglobinart Hb-A_{1a-c} enthält, kann aus einem Säulenbett einer Suspension 27 (S) von diesen Celluloseeteilchen unter Verwendung einer «bis-tris»-Pufferlösung 128 der gleichen Zusammensetzung wie die Behandlungslösung 28 unter Zusatz von 2,34 g NaCl (0,04 m) und mit einem pH-Wert von im wesentlichen 6,1 eluiert werden.

Beispiel 6

Die Harzteilechen von Beispiel 3 können in Form einer Suspension 27 (S) mit einem pH-Wert von im wesentlichen 6,8 bei 22,5°C durch Vermischen mit einer «bis-tris»-Behandlungslösung 28 der gleichen Zusammensetzung wie in Beispiel 5 hergestellt werden. Eine erste Fraktion 30 einer Testprobe 10, welche im wesentlichen die Gesamtmenge der Hämoglobinart Hb-A_{1a-c} enthält, kann aus einem Säulenbett einer Suspension 27 (S) von diesen Harzteilechen unter Verwendung einer «bis-tris»-Pufferlösung 128 der gleichen Zusammensetzung wie die Behandlungslösung 28 unter Zusatz von 7,02 g NaCl (0,12 m) mit einem pH-Wert von im wesentlichen 6,8 eluiert werden.

