

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

# PATENTCHRIFT



(12) Ausschließungspatent

(11) **DD 294 344 A5**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1  
Patentgesetz der DDR  
vom 27. 10. 1983  
in Übereinstimmung mit den entsprechenden  
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) G 01 N 21/78  
G 01 N 33/52

**DEUTSCHES PATENTAMT**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

---

(21) DD G 01 N / 340 329 3 (22) 03.05.90 (44) 26.09.91

---

- (71) VEB Filmfabrik Wolfen, Fotochemisches Kombinat, Puschkinplatz, O - 4440 Wolfen 1, DE  
(72) Herrmann, Wolfgang, Dr. Dipl.-Chem.; Weise, Hartmut, Dr. Dipl.-Ing.; Plaschnik, Dieter, Dipl.-Chem.; Hildebrand, Gabriele, DE  
(73) VEB Filmfabrik Wolfen, O - 4440 Wolfen; Akademie der Wissenschaften, Forschungszentrum Biotechnologie, O - 1017 Berlin, DE
- 

(54) **Analytisches Element zur gleichzeitigen Bestimmung von Oligosacchariden und Glucose**

---

(55) weiß eingefärbte Unterlage; mehrschichtige Testzone; Glucosenachweissystem; oligosaccharidspaltende Enzyme

(57) Die Erfindung betrifft ein analytisches Element zur gleichzeitigen Erfassung von Oligosacchariden und Glucose. Die Erfindung ermöglicht die Bestimmung von Oligosacchariden bei gleichzeitiger Gegenwart von Glucose in kurzer Zeit und unkomplizierter Analysetechnik. Der Teststreifen besteht aus einer weiß eingefärbten Unterlage, auf der sich eine mehrschichtige Testzone befindet. Die untere Schicht enthält ein Glucosenachweissystem und gleichzeitig die oligosaccharidspaltenden Enzyme, während die obere Schicht Reagenzien zur Inaktivierung der in vielen Prüfmedien gleichzeitig vorhandenen Glucose enthält. Auf der Rückseite der Trägerfolie ist eine weitere quellfähige Polymerschicht angeordnet, die zur gesonderten Bestimmung der Glucose ein übliches Glucosenachweissystem enthält. Der Nachweis der Oligosaccharide erfolgt über eine farbbildende Reaktion bei Ausmessung der oligosaccharidäquivalenten Farbdichten im Auflicht. Anwendungsgebiet ist die Nahrungsmittel-, Getränke- und biochemische Industrie.

ISSN 0433-6461

4 Seiten

### Patentansprüche:

1. Analytisches Element zur gleichzeitigen Bestimmung von Oligosacchariden und Glucose, bestehend aus einem Glucosenachweissystem und oligosaccharidspaltenden Enzymen, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Glucosenachweissystem zusammen mit einem oder mehreren oligosaccharidspaltenden Enzymen, in einem polymeren quellfähigen Bindemittel in nur einer Schicht auf einer Trägerfolie angeordnet ist und in einer zweiten, darüber angeordneten quellfähigen Polymerschicht die Enzyme GOD, POD, ein p-Phenylendiaminderivat und ein Pyrazolonderivat mit einem Alkyl-, Phenyl- oder Butylsubstituenten an der aktiven Methylengruppe enthalten ist und daß auf der Rückseite der Trägerfolie eine weitere quellfähige Polymerschicht angeordnet ist, die zur gesonderten Bestimmung von Glucose ein übliches Glucosenachweissystem enthält.
2. Analytisches Element nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als oligosaccharidspaltende Enzyme einzeln oder im Gemisch folgende Enzyme enthalten sind:
  - β-Fruktosidase
  - α-Glucosidase
  - α-Galactosidase
  - β-Galactosidase
  - Amyloglucosidasesowie gegebenenfalls Mutarotase.
3. Analytisches Element nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß zwischen der unteren und oberen Schicht zusätzlich eine aus einem quellfähigen polymeren Bindemittel bestehende Zwischenschicht angeordnet ist, die ein p-Phenylendiaminderivat und ein Pyrazolonderivat mit einem Alkyl, Phenyl oder Benzylsubstituenten an der aktiven Methylgruppe enthält.
4. Analytisches Element nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Trägerfolie in Masse weiß eingefärbt ist und/oder daß beidseitig direkt auf der Trägerfolie eine zusätzliche Weißschicht angeordnet ist.
5. Analytisches Element nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß es als polymeres, quellfähiges Bindemittel insbesondere Gelatine oder Gelatine in Abmischung mit Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon, Polyacrylamid oder Agarose und als Trägerfolie ein filmbildendes Polymer, insbesondere Celluloseacetat oder Polyethylenterephthalat, enthält.

### Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft einen Teststreifen zur gleichzeitigen Erfassung von Oligosacchariden und Glucose. Dieser Teststreifen, der die spezifische Bestimmung von Oligosacchariden gestattet, ist insbesondere in der Getränke- und Nahrungsmittelindustrie, bei der Untersuchung diätischer Lebensmittel, in der Biotechnologie und in der Pharmazie anwendbar.

### Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Herkömmliche Teststreifen bestehen gewöhnlich aus einem Absorbens oder einer porösen Matrix, in die Indikatorreaktanten eingebracht sind, wobei es sich gewöhnlich um einen kolorimetrischen Typ handelt. Nach kurzzeitigem Eintauchen in die Untersuchungslösung ist eine Indikatorreaktion zu beobachten, die mittels visueller oder spektrophotometrischer Verfahren ausgewertet wird.

Die Vielzahl der Veröffentlichungen konzentriert sich auf eine Verbesserung der Herstellungstechnologie, eine Erhöhung der Stabilität und eine Erhöhung der Farbausbeute DD 236654, DD 237678, DE 3237233. In DD 235462 wird ein analytisches Element zur Bestimmung von Oligosacchariden beschrieben. Der Teststreifen enthält sowohl ein Glucosenachweissystem als auch ein oligosaccharidspaltendes Enzymsystem. Dieser Teststreifen, dessen Anwendung besonders für die Lebensmittel- und Getränkeindustrie vorgesehen ist, besitzt den Nachteil, daß neben der Bestimmung der Oligosaccharide auch die in technischen Lösungen fast immer vorhandene Glucose mit erfaßt wird und somit den Meßwert verfälscht. Eine eindeutige Aussage über den Gehalt eines Oligosaccharides ist bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glucose somit nicht möglich. Auch der in DD 262043 angegebene wieder verwendbare Teststreifen, der in Kombination mit handelsüblichen Glucoseteststreifen die Bestimmung von Oligosacchariden gestattet, hat den Nachteil, daß die Anwesenheit von Glucose das Meßergebnis verfälscht. In der Literatur gibt es eine Reihe von Vorschlägen, um störende Substanzen zu entfernen. So erfolgt beispielsweise durch Ascorbinsäure oder andere Reduktionsmittel eine Verfälschung der Werte. Wegen der besonderen Bedeutung und des Umfangs der Störungen durch Reduktionsmittel gibt es viele Versuche, diese aus den Untersuchungslösungen zu entfernen, bzw. nicht gestörte Verfahren und Mittel zu entwickeln. In der DD 157834 wird deshalb dem Testsystem lösliches Jodat zugesetzt. Es werden auch Mehrlagen-Analyselemente wie in JP-PS 53-21677, JP-OS 55-164356 oder DE 3424355 beschrieben, die jedoch speziell für eine gleichmäßige Diffusion geschaffen wurden. Aus der vorstehenden Erörterung ergibt sich, daß es auf dem Gebiet der Entwicklung von Teststreifen eine große Anzahl von Entwicklungsrichtungen gibt, das spezielle Problem der Bestimmung von Oligosacchariden unter Berücksichtigung des Störeinflusses vorhandener Glucose bisher nicht gelöst ist.

**Ziel der Erfindung**

Ziel der Erfindung ist eine spezifische Erfassung von Oligosacchariden in einfacher Weise auch in Gegenwart von Glucose in kürzester Zeit.

**Darlegung des Wesens der Erfindung**

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen Teststreifen zur spezifischen Erfassung von Oligosacchariden zu entwickeln, bei dem es durch die gleichzeitige Anwesenheit von Glucose in der Untersuchungslösung zu keiner Verfälschung des Meßwertes kommt.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß das Glucosenachweissystem zusammen mit einem oder mehreren oligosaccharidspaltenden Enzymen in einem polymeren quellfähigen Bindemittel in nur einer Schicht auf einer Trägerfolie angeordnet ist und in einer zweiten, darüber angeordneten quellfähigen Polymerschicht die Enzyme GOD, POD, ein p-Phenylendiaminderivat und ein Pyrazolonderivat mit einem Alkyl-, Phenyl- oder Butylsubstituenten an der aktiven Methylengruppe enthalten ist und daß auf der Rückseite der Trägerfolie eine weitere quellfähige Polymerschicht angeordnet ist, die zur gesonderten Bestimmung von Glucose ein an sich bekanntes Glucosenachweissystem enthält.

Der Teststreifen ist so aufgebaut, daß auf einer weiß eingefärbten Folie 2 quellfähige Polymerschichten angeordnet sind, die, gegebenenfalls durch eine Zwischenschicht getrennt, ein chemisches Reaktionssystem zur Latensifikation der fast immer in biochemischen Prüfmedien vorhandenen Glucose, alle notwendigen oligosaccharidspaltenden Enzyme und ein Nachweissystem für die bei der Oligosaccharidspaltung freiwerdende Glucose, in einer genau definierten Schichtzuordnung derart enthalten, daß durch einfache Tauchung des analytischen Elements des Teststreifens in das Prüfmedium innerhalb einer kurzen Reaktionszeit ein chemischer Reaktionsprozeß derart abläuft, daß eine der Konzentration des betreffenden Oligosaccharids bzw. Monosaccharids äquivalente Farbdichte (unabhängig vom Glucosegehalt der Probe) entsteht, die visuell als Farbvergleich oder photometrisch im Auflicht vermessen werden kann.

Überraschend wurde gefunden, daß einmal die Fixierung sowohl der oligosaccharidspaltenden Enzyme als auch des Glucosenachweissystems in nur einer Schicht, der unteren Nachweisschicht, gelingt, und zum anderen, daß es möglich ist, durch Aufbringen einer zweiten Schicht, die neben Glucoseoxidase/Peroxidase ein Pyrazolonderivat (sog. Farbkuppler) und ein p-Phenylendiaminderivat enthält, mit der es möglich ist, die im Prüfmedium vorhandene Glucose durch Auslösung einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> initiierten Kupplungsreaktion zu einem farblosen Kupplungsprodukt derart unwirksam zu machen, daß tatsächlich nur das betreffende Oligosaccharid in die untere farbbildende Schicht eindiffundieren kann.

Zur Verhinderung einer eventuellen Diffusion des beim enzymatischen Glucoseabbaus durch GOD entstehenden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei Anwesenheit höherer Glucosekonzentrationen in die untere Schicht, ist es vorteilhaft, in einer 1-2 µm starken Zwischenschicht nochmals ein p-Phenylendiaminderivat und einen Farbkuppler einzulagern.

Die untere Schicht enthält nun gleichzeitig ein an sich bekanntes Glucosenachweissystem und ein oder mehrere oligosaccharidspaltende Enzyme, wobei die durch die Spaltung der Oligosaccharide freiwerdende Glucose durch GOD unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung abgebaut wird. Zur Erzeugung eines Farbstoffs können folgende Nachweissysteme genutzt werden:

a) in einer mit POD katalysierten Auslösung einer echten Kupplungsreaktion zwischen einem Leukofarbstoff und einem p-Phenylendiaminderivat

b) in einer mit POD katalysierte Farbstoffbildung auf Basis semichinonbildender Bi-phenyl-derivate (o-Tolidin, Dianisidin, alkylierte Benzidine) die durch polymere aromatische Säuren (z. B. Sulfonsäure) oder heterocyclische Verbindungen mit länger-kettigen, aliphatischen Substituenten (z. B. Pyrazolon oder Naphtolderivate) stabilisiert werden.

Zur Spaltung der Oligosaccharide können einzeln oder im Gemisch folgende Enzyme in der untersten Schicht enthalten sein:

		Spaltung von:
β-Fruktosidase	EC 3.2.1.26	Saccharose
α-Glucosidase	EC 3.2.1.20	Maltose
α-Galactosidase	EC 3.2.1.22	Raffinose
β-Galactosidase	EC 3.2.1.23	Lactose
Amyloglucosidase	EC 3.2.1.3.	Stärke

Zur schnellen Einstellung eines natürlichen Verhältnisses von α- und β-Glucose kann Mutarotase (EC 5.1.2.3) enthalten sein. Zur gleichzeitigen Bestimmung von Oligosacchariden und Glucose ist die Aufbringung einer polymeren, quellfähigen Schicht auf der Rückseite der die übrigen Nachweisschichten tragenden Folie erforderlich.

Diese Schicht enthält ein übliches Glucosenachweissystem, das eine glucoseäquivalente Farbdichte erzeugt, die dann ebenfalls im Reflexionslicht vermessen werden kann. Voraussetzung ist eine in Masse weiß eingefärbte Folie oder die beidseitige Aufbringung von weißen Unterschichten auf anorganischer Basis (TiO<sub>2</sub>, BaSO<sub>4</sub>, ZnO).

Die Erfindung soll anhand von Beispielen näher erläutert werden.

**Ausführungsbeispiele**

**Beispiel 1**

Auf eine weiß eingefärbte Celluloseacetat- oder PETP-Folie werden nach dem Antrag einer haftvermittelnden Präparationsschicht 2 Schichten auf Basis nachfolgend aufgeführter Ansatzrezepturen aufgetragen:

- Schicht 1** – Einer 8%igen Gelatinelösung werden  
 1 327 mg/l Glucoseoxidase, 236 mg/l Peroxidase,  
 500 mg/l Invertase, 1 300 mg/l Mutarotase  
 6,0 g/l o-Tolidindihydrochlorid sowie  
 2,5 g/l Cr III-acetat zugesetzt.

Der Antrag dieser Lösung erfolgt bei 40°C mit einer Schichtdicke von 10µm. Nach Erstarrung und Trocknen dieser Schicht erfolgt der Antrag einer zweiten Lösung:

**Schicht 2** – Einer 8%igen Gelatinelösung werden

- 1 327 mg/l Glucoseoxidase, 236 mg/l Peroxidase,
- 3,1 g/l 1-(4'-Phenoxy-3'-sulfophenyl)-3-stearyl-4-isopropyl-pyrazolon-5
- 2,45 g/l N-butyl-N(4-sulfobutyl)-1,4-phenylendiamin
- g/l Cr III-acetat

zugesetzt.

Nach Trocknung und Aushärtung des Gesamtschichtverbandes kann nach Konfektionierung der Folie ein Teststreifen zu 6 x 40mm durch einfache Tauchung des Teststreifens in ein Prüfmedium Saccharose in Gegenwart von Glucose bestimmt werden.

Die nach genau 1 min Tauchung und 10minütiger Reaktionszeit entstehende blaugrüne Färbung ist der Saccharosekonzentration des Prüfmediums äquivalent und kann mittels Farbkomparatoren oder einer Eichkurve ausgewertet werden.

**Beispiel 2**

Verwendet wird als Schichtträger eine in Masse weiß eingefärbte PETP-Folie. Die Einfärbung erfolgt durch TiO<sub>2</sub>-Zugabe beim Aufschmelzen des Granulats. Auf die eingefärbte Folie wird zusätzlich beidseitig eine 5µm starke Weißschicht auf Basis Gelatine/TiO<sub>2</sub> angetragen. Auf der einen Seite der so behandelten Folie wird das unter Beispiel 1 beschriebene 2 Schichtensystem angetragen. Die Rückseite erhält einen Schichtantrag nach folgendem Ansatz:

Einer 8%igen Gelatinelösung werden bei 40°C 107 mg/l GOD, 1 500 mg/l POD, 3 g/l O-Tolidindihydrochlorid und 2,5g/l Chrom III-acetat zugesetzt. Nach Antrag dieser Lösung auf den Schichtträger, Erstarrung und Trocknung erfolgt die Konfektionierung der beschichteten Folie in Teststreifen (6 x 40mm).

Bei Messung im Reflexionslicht ist die Bestimmung von Saccharose und gleichzeitig die Bestimmung von Glucose (Rückseite) je nach der im Reflexionsdensitometer vermessenen Teststreifenseite möglich.

**Beispiel 3**

Untere Nachweisschicht wie Beispiel 1, aber statt Invertase wird β-Galactosidase 420 mg/l verwendet. Bei gleicher Oberschicht wird zwischen den beiden Reagenzschichten eine Zwischenschicht aus folgender Lösung angetragen:

- Einer 8%igen Gelatinelösung werden
- 3,1 g/l 1-(4'-Phenoxy-3'-sulfophenyl)-3-stearyl-4-isopropylpyrazolon-5
- 2,45g/l N-butyl-4(4-sulfobutyl)-1,4-phenylendiamin
- 2,5 g/l Cr-III-acetat

zugemischt.

Auf der Rückseite des Schichtträgers ist gemäß Beispiel 2 ein Glucosenachweissystem angetragen.

Nachgewiesen wird in glucosehaltigen Medien Lactose und Glucose.

**Beispiel 4**

Hergestellt wurden Teststreifen mit unterschiedlichem Schichtaufbau zum Nachweis von Saccharose.

Verglichen wird ein bisheriges Nachweissystem (Var. 1) gegen ausgestaltete Varianten der Erfindung (Var. 2-4). Die Farbdichten wurden nach Tauchung (1 min) der Teststreifen in ein Probegemisch von 10 mmol/l Saccharose und 5 mmol/l Glucose erhalten.

1. Teststreifenaufbau nach Schichten	Varianten			
	1	2	3	4
Oligosaccharidspaltung u. Glucosenachweis	mind. 2	1	1	1
Zwischenschicht	-	-	-	-
Glucoseabfangschicht	-	1	1	1
Glucosenachweisschicht	-	-	1	1
2. Meßwerte				
Farbdichte (620 nm)	0,70	0,51	0,50	0,48
Variationskoeff. (%)	6,5	3,50	3,0	3,2
Abweichung der Farbdichte gegen Variante 4 (in %)	+45,8	+6,3	+4,1	±0
3. gleichzeitige Bestimmung von Oligosacchariden und Glucose				
	nein	nein	ja	ja

Deutlich wird der in erhöhter Farbdichte sich dokumentierende störende Anteil von Glucose im bisher bekannten Nachweissystem für Oligosaccharide. Hier treten eindeutige Meßwertverfälschungen auf. Variante 4 zeigt am genauesten den tatsächlich der Saccharosekonzentration äquivalenten Farbdichtewert an. Aber auch bei gleicher Anzahl von Reaktionsschichten zeigt bereits Variante 2 nur geringe Farbdichteerhöhungen im Vergleich zum Stand der Technik (Var. 1)

**Beispiel 5**

Schichtaufbau des analytischen Elementes wie Beispiel 1 und 2

In der unteren Reaktionsschicht gemäß Beispiel 1 wird aber statt Invertase-α-Glucosidase verwendet. Außerdem erhält das gemäß Beispiel 2 auf der Rückseite angetragene Glucosenachweissystem statt o-Tolidindihydrochlorid folgende Komponenten, die einen roten Farbstoff bei Glucoseanwesenheit erzeugen:

- a) N-butyl-4(4-sulfobutyl)-1,4-phenylendiamin
- b) 1-(4'-Phenoxy-3'-sulfophenyl)-3-stearylaminopyrazolon-5.

Nachgewiesen wird Maltose in Gegenwart von Glucose, sowie gesondert Glucose.