

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation⁶ : G01N 33/52, 33/70, 33/72, C12Q 1/00, 1/32</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/45733</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 4. Dezember 1997 (04.12.97)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/02835</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 30. Mai 1997 (30.05.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 22 090.4 31. Mai 1996 (31.05.96) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 112-132, D-68305 Mannheim (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WEISHEIT, Ralph [DE/DE]; Adlerweg 2A, D-82362 Weilheim (DE). PFITSCHLER, Elke [DE/DE]; Hungersbachstrasse 3, D-82386 Oberhausen (DE).</p> <p>(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D- 81679 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, CZ, HU, IL, JP, KR, MX, NZ, PL, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>	
<p>(54) Title: PROCESS TO ELIMINATE HAEMOGLOBIN ERRORS WHEN ANALYSING MEDICAL SAMPLES</p> <p>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESEITIGUNG VON HÄMOGLOBINSTÖRUNGEN BEI DER ANALYSE MEDIZINISCHER PROBEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The present invention relates to a process for determining an analyte in a sample containing free haemoglobin by optical bichromatic measurement for a main and a secondary measuring wave length. A secondary measuring wave length of above 475 nm is used containing absorption bands of haemoglobin.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung eines Analyten in einer freies Hämoglobin enthaltenden Probe durch optische bichromatische Messung bei einer Haupt- und einer Nebenmeßwellenlänge, wobei man eine Nebenmeßwellenlänge von oberhalb 475 nm verwendet, bei der sich Absorptionsbanden von Hämoglobin befinden.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zur Beseitigung von Hämoglobinstörungen bei der Analyse medizinischer Proben

5

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung eines Analyten in einer freies Hämoglobin enthaltenden Probe, wobei die Bestimmung durch eine optische bichromatische Messung bei einer Haupt- und einer Nebenmeßwellenlänge erfolgt. Insbesondere ist dieses Verfahren zur Bestimmung der Parameter Ammoniak, Creatinkinase und Isoenzymen davon und Lactat-Dehydrogenase und Isoenzymen davon in einer medizinischen Probe, z. B. einer Serum- oder Plasmaprobe, geeignet.

15

Es ist allgemein bekannt, daß durch Hämolyse die Bestimmung einer Vielzahl von Analyten in teilweise erheblichem Maße gestört ist. Um dennoch unverfälschte Meßwerte zu erhalten, wurden in der Vergangenheit unterschiedliche Verfahren zur Hämolyse-Entstörung publiziert.

Eines dieser Verfahren besteht darin, daß bei der Messung in automatisierten Analysegeräten neben der ersten Meßwellenlänge (Hauptmeßwellenlänge) häufig eine zweite Meßwellenlänge (Nebenmeßwellenlänge) benutzt wird, mittels derer der Störeinfluß interferierender Substanzen wie Hämoglobin, Bilirubin und Lipämie beseitigt oder zumindest minimiert werden kann.

Eine Anforderung dabei ist, daß die zu messende Substanz bei der Nebenwellenlänge möglichst wenig absorbiert, die Störsubstanz dagegen möglichst in gleicher Höhe absorbiert wie bei der Hauptwellenlänge (Praxistechnik: Photometer für die Ärztliche Praxis, Deutscher Ärzteverlag 1977, Seiten 41-42).

Im DIA-Letter (Boehringer Mannheim) Nr. 70 (1985) wird erwähnt, daß die Nebenwellenlänge möglichst nahe der Hauptwellenlänge liegen sollte, da in der Regel dann die Störsubstanz

bei Haupt- und Nebenwellenlänge ähnliche Extinktionen aufweist.

In Clin Chem 25/6, 951-959 (1979) wird darauf verwiesen, die
5 Nebenwellenlänge so zu wählen, daß diese nahe des Absorptions-
minimums des Chromogens und nahe des Absorptionsmaximums der
Störsubstanz liegen sollte. In diesem Zusammenhang wird für
die Glucosebestimmung (Hauptwellenlänge 340 nm) eine Neben-
wellenlänge von 380 nm empfohlen, da hier die Störsubstanzen
10 ähnlich absorbieren wie bei 340 nm.

Kritisch wird dagegen in Eur J Clin Chem Clin Biochem 31/9,
595-601 (1993) gesehen, UV-Tests mit einer Nebenwellenlänge
von 380 nm zu vermessen, da in diesem Fall die Umwandlung von
15 Hb-O₂ in Meth-Hb zu spektralen Veränderungen bei 380 nm und
damit zu Fehlmessungen führt. Für Tests, die auf Messung von
NAD(P)H-Abnahme oder -Zunahme beruhen, wird deshalb eine
Nebenwellenlänge empfohlen, die jenseits der sogenannten So-
ret-Region liegt, wie z. B. 475 nm.

20

Alle zuvor beschriebenen Verfahren beziehen sich auf die Ent-
störung von durch Hämolyse verursachten Fehlmessungen. Mit der
Bereitstellung von Blutersatzmitteln auf Basis von Hämoglobin
stellt sich die Frage nach der Beseitigung von Störungen durch
25 natives oder synthetisches Hämoglobin bzw. Hb-analogen Ver-
bindungen noch weit brisanter als bisher. Solche Störungen
treten dann nämlich einerseits auch in nicht hämolytischem
Probenmaterial und andererseits auch in weit höherem Grad auf
als bei nativer Hämolyse, da bei Therapie mit Blutersatzmit-
30 teln der Hb-Gehalt im Blutserum oder -plasma bis zu
2.000 mg/dl betragen kann.

Außerdem wurde festgestellt, daß bei der Messung bestimmter
Analyten, wie etwa Ammoniak, Creatinkinase und Isoenzymen
35 davon sowie Lactat-Dehydrogenase und Isoenzymen davon die
Verwendung einer Nebenmeßwellenlänge von 475 nm oder höher,
z. B. bei 480, 505, 600, 660 oder 700 nm, nicht ohne weiteres

eine ausreichende Hämoglobinentstörung erzielt. Da diese Parameter im Rahmen der Herz-Kreislauf- und Notfalldiagnostik sowie der Diagnostik von mit Blutersatzmitteln therapierten Patienten von essentieller Bedeutung sind, war es die Aufgabe
5 der vorliegenden Erfindung, ein einfaches Verfahren zur Beseitigung von Störungen bereitzustellen, die durch natives Hämoglobin oder auf synthetischem Hb- bzw. Hb-analogen Verbindungen basierenden Blutersatzmitteln, insbesondere bei Messung der oben genannten Analyten hervorgerufen werden.

10

Gelöst wurde die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe durch ein Verfahren zur Bestimmung eines Analyten in einer freies Hämoglobin enthaltenden Probe durch optische bichromatische Messung bei einer Haupt- und einer Nebenmeßwellenlänge, wobei
15 daß man eine Nebenmeßwellenlänge von oberhalb 475 nm verwendet, bei der sich Absorptionsbanden von Hämoglobin befinden.

Bevorzugte Nebenmeßwellenlängen für das erfindungsgemäße Verfahren liegen im Bereich von 546 ± 10 nm, insbesondere
20 546 ± 5 nm sowie im Bereich von 570 ± 10 nm und insbesondere 570 ± 5 nm. Am meisten bevorzugt sind die Wellenlängen 546 bzw. 570 nm.

Die Auswahl der erfindungsgemäßen Wellenlängen als Nebenmeßwellenlängen war überraschend, da bei der aus dem Stand der Technik (Boehringer Mannheim/Hitachi-Applikation) bekannten Nebenmeßwellenlänge von 405 nm, bei welcher ebenfalls eine Absorption durch Hämoglobin stattfindet, gerade die größten Störungen durch Hämoglobin erhalten werden. Weiterhin wird in
30 der oben genannten Publikation Eur J Clin Chem Clin Biochem darauf hingewiesen, daß zur Entstörung von Hämoglobin gerade eine Nebenmeßwellenlänge verwendet werden sollte, die jenseits der Soret-Region (der Hauptabsorptionsbande von Hämoglobin) liegt, so daß es allenfalls naheliegend wäre, als Nebenmeßwellenlänge solche Wellenlängen zu wählen, wo sich überhaupt
35 keine Absorptionsbanden von Hämoglobin befinden.

Die erfindungsgemäße Entstörungsmethode ist für Verfahren geeignet, bei denen die Bestimmung des Analyten durch optische Messung erfolgt, insbesondere durch optische Messung bei einer Hauptwellenlänge im UV-Bereich. Besonders bevorzugt wird das
5 Verfahren bei Tests durchgeführt, die auf einer Messung der Zu- oder Abnahme der Konzentration von NADH oder NADPH in der Probe beruhen. In diesem Fall verwendet man bevorzugt eine Hauptmeßwellenlänge im Bereich von 340 ± 10 nm.

10 Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich zur Bestimmung beliebiger Proben, in denen freies Hämoglobin vorliegt. Beispiele für solche Proben sind hämolytische Serum- oder Plasmaproben oder Proben, die ein Blutersatzmittel enthalten. Beispiele für Blutersatzmittel, die im Sinne der vorliegenden
15 Erfindung unter den Begriff "freies Hämoglobin" fallen, sind derivatisierte, polymerisierte, modifizierte oder quervernetzte Derivate von Hämoglobinen, insbesondere von Humanhämoglobin oder Rinderhämoglobin, z. B. DCL-Hämoglobin (Diaspirin-crosslinked-Hämoglobin), sowie rekombinant hergestelltes Hämoglobin.
20

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens bestimmt man den Gehalt eines Analyten, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ammoniak, Creatinkinase und Isoenzymen davon und Lactat-Dehydrogenase und Isoenzymen davon.
25

Die Bestimmung von Ammoniak durch das erfindungsgemäße Verfahren erfolgt vorzugsweise nach der enzymatischen UV-Methode (Da Fonseca-Wollheim F., Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 11 (1973)
30 421).

Die Bestimmung der Creatinkinase (CK) erfolgt vorzugsweise nach der "Optimierten Standard-Methode" der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie (J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 15
35 (1977), 249). Die Bestimmung des Creatinkinase-Isoenzym CK-MB erfolgt vorzugsweise nach der immunologischen UV-Methode (Würzburg U. et al., Klin. Wschr. 54 (1976), 357).

Die Bestimmung von Lactat-Dehydrogenase (LDH) oder des Lactat-Dehydrogenase Isoenzyms (HBDH) (1-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase) erfolgt vorzugsweise nach der "Optimierten Standard-Methode" der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (Z.Klin. Chem.Klin.Biochem. 8 (1970), 658 und 10 (1972), 182).

Als Probe wird beim erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise eine Serum- oder Plasmaprobe eingesetzt, insbesondere eine humane Serum- oder Plasmaprobe.

10

Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß es in einem Analyseautomaten durchgeführt werden kann, z. B. an einem Boehringer Mannheim/Hitachi 704- oder 717-Analysegerät. Bei derartigen Analysegeräten können ohne weiteres die besonders bevorzugten Nebenmeßwellenlängen von 546 bzw. 570 nm eingestellt werden.

Weiterhin wird die Erfindung durch die nachfolgenden Beispiele erläutert:

20

Allgemeine Methoden

Ein Teil eines Serumpools wurde mit einer Hämoglobin-haltigen Lösung derart versetzt, daß ein Hämoglobingehalt von 2.000 mg/dl erreicht wurde. Ein anderer, gleich großer Teil des Serumpools wurde mit der äquivalenten Menge einer NaCl-Lösung (154 mmol/l) versetzt. Beide Teile wurden anschließend in unterschiedlichem Verhältnis derart miteinander vermischt, daß eine Hb-Konzentrationsreihe aus 11 Proben entstand, wobei eine Probe kein Hb und die höchste Probe 2.000 mg/dl Hb enthielt.

Beispiel 1

Bestimmung von Ammoniak

5 Die Bestimmung wurde an einem Boehringer Mannheim/Hitachi 717-Analysegerät durchgeführt. Es wurden folgende Reagenzien verwendet:

10 Reagenz 1: 150 mmol/l Triethanolamin-Puffer, pH 8,6; 15 mmol/l α -Ketoglutarat; 1,5 mmol/l ADP

15 Reagenz 2: 150 mmol/l Triethanolamin-Puffer; pH 8,6; 15 mmol/l α -Ketoglutarat; 1,5 mmol/l ADP; 0,31 mmol/l NADPH; \geq 24 U/ml Glutamat-Dehydrogenase (GLDH)

20 Die Testdurchführung war wie folgt: Zu 20 μ l Probe wurden 200 μ l Reagenz 1 und nach 5 min 50 μ l Reagenz 2 gegeben. Die Bestimmung des Analyten erfolgte nach einer Dauer von weiteren 40 sec. Zur Messung wurden eine Hauptmeßwellenlänge von 340 nm und Nebenmeßwellenlängen von 405 nm, 480 nm, 505 nm, 600 nm, 660 nm und 700 nm (Vergleich) sowie von 546 nm und 570 nm (Erfindung) verwendet.

25 Das Ergebnis dieser Bestimmung ist in Tabelle 1 gezeigt. Es ist zu erkennen, daß bei Verwendung der erfindungsgemäßen Meßwellenlängen von 546 bzw. 570 nm eine deutlich verbesserte Wiederfindung (recovery) als bei den anderen Meßwellenlängen erreicht wurde.

30

Beispiel 2

Bestimmung von Creatinkinase

35 Die Bestimmung wurde an einem Boehringer Mannheim/Hitachi 717-Analysegerät durchgeführt. Es wurden folgende Reagenzien verwendet:

Reagenz 1: 110 mmol/l Imidazol-Puffer; pH 6,7; 20,5 mmol/l
Glucose; 2,05 mmol/l EDTA; 2,5 mmol/l ADP; 6,1
mmol/l AMP; 12 μ mol/l Diadenosinpentaphosphat;
2,5 mmol/l NADP; 25 mmol/l N-Acetylcystein; \geq
3,1 U/ml Hexokinase (HK); \geq 1,8 U/ml Glucose-6-
phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH)

Reagenz 2: 25 mmol/l Imidazol-Puffer; pH 7,5; 20,5 mmol/l
Glucose; 2,05 mmol/l EDTA; 61 mmol/l Mg^{2+} ; 184
mmol/l Creatinphosphat

Die Testdurchführung war wie folgt: Zu 7 μ l Probe wurden
250 μ l Reagenz 1 und nach 5 min 50 μ l Reagenz 2 gegeben. Die
Bestimmung des Analyten erfolgte nach einer Dauer von weiteren
2 min. Zur Messung wurden eine Hauptmeßwellenlänge von 340 nm
und Nebenmeßwellenlängen von 405 nm, 480 nm, 505 nm, 600 nm,
660 nm und 700 nm (Vergleich) sowie von 546 nm und 570 nm
(Erfindung) verwendet.

Das Ergebnis dieser Bestimmung ist in Tabelle 2 gezeigt. Es
ist zu erkennen, daß bei Verwendung der erfindungsgemäßen
Meßwellenlängen von 546 bzw. 570 nm eine deutlich verbesserte
Wiederfindung (recovery) als bei den anderen Meßwellenlängen
erreicht wurde.

25

Beispiel 3

Bestimmung des Creatinkinase-Isoenzyms CK-MB

Die Bestimmung wurde an einem Boehringer Mannheim/Hitachi 717-
Analysegerät durchgeführt. Es wurden folgende Reagenzien ver-
wendet:

Reagenz 1: 110 mmol/l Imidazol-Puffer; pH 6,7; 21 mmol/l
Glucose; 11 mmol/l Mg^{2+} ; 2,1 mmol/l EDTA; 2,4
mmol/l ADP; 6,0 mmol/l AMP; 12 μ mol/l Diadeno-
sinpentaphosphat; 2,4 mmol/l NADP; 24 mmol/l N-

35

Acetylcystein; $\geq 3,0$ U/ml HK; $\geq 1,8$ U/ml G6P-DH; Antikörper, Hemmkapazität gegen CK-M bis 2000 U/l

5 Reagenz 2: 110 mmol/l Imidazol-Puffer; pH 6,7; 21 mmol/l Glucose; 2,1 mmol/l EDTA; 11 mmol/l Mg^{2+} ; 186 mmol/l Creatinphosphat

Die Testdurchführung war wie folgt: Zu 12 μ l Probe wurden
10 250 μ l Reagenz 1 und nach 5 min 50 μ l Reagenz 2 gegeben. Die Bestimmung des Analyten erfolgte nach einer Dauer von weiteren 3 min. Zur Messung wurden eine Hauptmeßwellenlänge von 340 nm und Nebenmeßwellenlängen von 405 nm, 480 nm, 505 nm, 600 nm, 660 nm und 700 nm (Vergleich) sowie von 546 nm und 570 nm
15 (Erfindung) verwendet.

Das Ergebnis dieser Bestimmung ist in Tabelle 3 gezeigt. Es ist zu erkennen, daß bei Verwendung der erfindungsgemäßen Meßwellenlängen von 546 bzw. 570 nm eine deutlich verbesserte
20 Wiederfindung (recovery) als bei den anderen Meßwellenlängen erreicht wurde.

Beispiel 4

25 Bestimmung von Lactat-Dehydrogenase

Die Bestimmung wurde an einem Boehringer Mannheim/Hitachi 717-Analysegerät durchgeführt. Es wurden folgende Reagenzien verwendet:

30

Reagenz 1: 68 mmol/l Phosphat-Puffer; pH 7,5; $\geq 0,73$ mmol/l Pyruvat

Reagenz 2: $\geq 1,1$ mmol/l NADH

35

Die Testdurchführung war wie folgt: Zu 5 μ l Probe wurden 250 μ l Reagenz 1 und nach 5 min 50 μ l Reagenz 2 gegeben. Die

Bestimmung des Analyten erfolgte nach einer Dauer von weiteren 60 sec. Zur Messung wurden eine Hauptmeßwellenlänge von 340 nm und Nebenmeßwellenlängen von 405 nm, 480 nm, 505 nm, 600 nm, 660 nm und 700 nm (Vergleich) sowie von 546 nm und 570 nm (Erfindung) verwendet.

Das Ergebnis dieser Bestimmung ist in Tabelle 4 gezeigt. Es ist zu erkennen, daß bei Verwendung der erfindungsgemäßen Meßwellenlängen von 546 bzw. 570 nm eine deutlich verbesserte Wiederfindung (recovery) als bei den anderen Meßwellenlängen erreicht wurde.

Beispiel 5

15 Bestimmung des LDH-Isoenzym HBDH

Die Bestimmung wurde an einem Boehringer Mannheim/Hitachi 717-Analysegerät durchgeführt. Es wurden folgende Reagenzien verwendet:

20

Reagenz 1: 68 mmol/l Phosphat-Puffer; pH 7,5; 3,7 mmol/l α -Oxobutyrat

Reagenz 2: $\geq 1,1$ mmol/l NADH

25

Die Testdurchführung war wie folgt: Zu 5 μ l Probe wurden 250 μ l Reagenz 1 und nach 5 min 50 μ l Reagenz 2 gegeben. Die Bestimmung des Analyten erfolgte nach einer Dauer von weiteren 60 sec. Zur Messung wurden eine Hauptmeßwellenlänge von 340 nm und Nebenmeßwellenlängen von 405 nm, 480 nm, 505 nm, 600 nm, 660 nm und 700 nm (Vergleich) sowie von 546 nm und 570 nm (Erfindung) verwendet.

Das Ergebnis dieser Bestimmung ist in Tabelle 5 gezeigt. Es ist zu erkennen, daß bei Verwendung der erfindungsgemäßen Meßwellenlängen von 546 bzw. 570 nm eine deutlich verbesserte

Wiederfindung (recovery) als bei den anderen Meßwellenlängen erreicht wurde.

Tabelle 1

Probe	Hb-Gehalt [mg/dl]	Gehalt bei 405 nm [µg/dl]	Gehalt bei 480 nm [µg/dl]	Gehalt bei 505 nm [µg/dl]	Gehalt bei 546 nm [µg/dl]	Gehalt bei 570 nm [µg/dl]	Gehalt bei 600 nm [µg/dl]	Gehalt bei 660 nm [µg/dl]	Gehalt bei 700 nm [µg/dl]
1	0	157	163	160	159	158	154	158	154
2	200	145	162	162	157	156	158	157	155
3	400	140	165	163	162	158	162	158	160
4	600	133	166	162	161	153	163	162	161
5	800	145	172	171	164	158	168	166	158
6	1000	144	173	172	162	155	168	171	167
7	1200	160	171	175	167	156	175	166	164
8	1400	159	177	177	166	155	177	171	170
9	1600	176	180	178	162	152	178	178	180
10	1800	175	183	177	163	157	188	180	183
11	2000	178	189	192	172	159	199	190	187

Probe	Hb-Gehalt [mg/dl]	Recovery 405 nm [%]	Recovery 480 nm [%]	Recovery 505 nm [%]	Recovery 546 nm [%]	Recovery 570 nm [%]	Recovery 600 nm [%]	Recovery 660 nm [%]	Recovery 700 nm [%]
1	0	100	100	100	100	100	100	100	100
2	200	92	99	101	99	99	103	99	101
3	400	89	101	102	102	100	105	100	104
4	600	85	102	101	101	97	106	103	105
5	800	92	106	107	103	100	109	105	103
6	1000	92	106	108	102	98	109	108	108
7	1200	102	105	109	105	99	114	105	106
8	1400	101	109	111	104	98	115	108	110
9	1600	112	110	111	102	96	116	113	117
10	1800	111	112	111	103	100	122	114	119
11	2000	113	116	120	108	101	129	120	121

Tabelle 2

Probe	Hb-Gehalt [mg/dl]	Gehalt bei 405 nm [U/l]	Gehalt bei 480 nm [U/l]	Gehalt bei 505 nm [U/l]	Gehalt bei 546 nm [U/l]	Gehalt bei 570 nm [U/l]	Gehalt bei 600 nm [U/l]	Gehalt bei 660 nm [U/l]	Gehalt bei 700 nm [U/l]
1	0	175	175	177	175	177	176	179	174
2	200	181	176	177	175	180	176	180	178
3	400	189	177	179	178	180	176	179	178
4	600	182	165	165	168	171	165	170	166
5	800	191	164	166	168	170	162	166	166
6	1000	195	164	164	170	172	163	166	163
7	1200	196	163	164	170	174	163	166	165
8	1400	205	163	163	170	174	160	165	164
9	1600	212	163	163	173	174	161	164	162
10	1800	214	160	163	172	177	161	165	163
11	2000	224	160	161	173	178	160	164	164

Probe	Hb-Gehalt [mg/dl]	Recovery 405 nm [%]	Recovery 480 nm [%]	Recovery 505 nm [%]	Recovery 546 nm [%]	Recovery 570 nm [%]	Recovery 600 nm [%]	Recovery 660 nm [%]	Recovery 700 nm [%]
1	0	100	100	100	100	100	100	100	100
2	200	103	101	100	100	102	100	101	102
3	400	108	101	101	102	102	100	100	102
4	600	104	94	93	96	97	94	95	95
5	800	109	94	94	96	96	92	93	95
6	1000	111	94	93	97	97	93	93	94
7	1200	112	93	93	97	98	93	93	95
8	1400	117	93	92	97	98	91	92	94
9	1600	121	93	92	99	98	91	92	93
10	1800	122	91	92	98	100	91	92	94
11	2000	128	91	91	99	101	91	92	94

Tabelle 3

Probe	Hb-Gehalt [mg/dl]	Gehalt bei 405 nm [U/l]	Gehalt bei 480 nm [U/l]	Gehalt bei 505 nm [U/l]	Gehalt bei 546 nm [U/l]	Gehalt bei 570 nm [U/l]	Gehalt bei 600 nm [U/l]	Gehalt bei 660 nm [U/l]	Gehalt bei 700 nm [U/l]
1	0	40,6	40,2	40,7	41,5	40,1	40,7	40,8	38,1
2	200	49,7	41,2	39,4	40,7	42,6	39,1	39,7	37,9
3	400	58,9	37,3	38,2	41,8	41,6	38,8	36,0	37,2
4	600	68,1	38,5	36,8	43,1	40,8	36,1	37,7	36,5
5	800	75,3	36,6	35,7	42,6	42,4	32,7	36,3	32,5
6	1000	82,4	34,9	35,4	44,1	43,4	30,8	32,6	36,5
7	1200	82,5	39,6	33,9	44,4	44,5	27,5	36,7	32,8
8	1400	95,0	35,5	34,5	44,8	43,0	26,1	33,4	33,9
9	1600	99,2	37,3	35,0	44,1	44,3	25,9	31,7	29,4
10	1800	98,9	33,9	29,8	46,7	42,9	24,8	27,1	29,4
11	2000	97,1	33,2	29,1	48,1	44,1	22,4	27,9	29,9

Probe	Hb-Gehalt [mg/dl]	Recovery 405 nm [%]	Recovery 480 nm [%]	Recovery 505 nm [%]	Recovery 546 nm [%]	Recovery 570 nm [%]	Recovery 600 nm [%]	Recovery 660 nm [%]	Recovery 700 nm [%]
1	0	100	100	100	100	100	100	100	100
2	200	122	102	97	98	106	96	97	99
3	400	145	93	94	101	104	95	88	98
4	600	168	96	90	104	102	89	92	96
5	800	185	91	88	103	106	80	89	85
6	1000	203	87	87	106	108	76	80	96
7	1200	203	98	83	107	111	68	90	86
8	1400	234	88	85	108	107	64	82	89
9	1600	244	93	86	106	110	64	78	77
10	1800	244	84	73	113	107	61	66	77
11	2000	239	83	71	116	110	55	68	78

Tabelle 4

Probe	Hb-Gehalt [mg/dl]	Gehalt bei 405 nm [U/l]	Gehalt bei 480 nm [U/l]	Gehalt bei 505 nm [U/l]	Gehalt bei 546 nm [U/l]	Gehalt bei 570 nm [U/l]	Gehalt bei 600 nm [U/l]	Gehalt bei 660 nm [U/l]	Gehalt bei 700 nm [U/l]
1	0	196	197	199	197	199	199	199	205
2	200	162	202	206	203	198	208	200	206
3	400	127	210	215	199	195	219	207	215
4	600	95	218	223	202	196	229	217	224
5	800	72	220	228	200	192	225	222	222
6	1000	45	224	226	199	193	230	226	222
7	1200	27	223	232	201	190	236	228	233
8	1400	11	237	240	203	192	243	234	236
9	1600	-13	230	238	199	190	242	233	236
10	1800	-1	234	244	198	192	245	237	238
11	2000	-15	233	246	197	191	247	238	241

Probe	Hb-Gehalt [mg/dl]	Recovery 405 nm [%]	Recovery 480 nm [%]	Recovery 505 nm [%]	Recovery 546 nm [%]	Recovery 570 nm [%]	Recovery 600 nm [%]	Recovery 660 nm [%]	Recovery 700 nm [%]
1	0	100	100	100	100	100	100	100	100
2	200	83	103	104	103	99	104	101	100
3	400	65	107	108	101	98	110	104	105
4	600	48	111	112	103	98	115	109	109
5	800	37	112	115	102	96	113	112	108
6	1000	23	114	114	101	97	116	114	108
7	1200	14	113	117	102	95	119	115	114
8	1400	6	120	121	103	96	122	118	115
9	1600	-7	117	120	101	95	122	117	115
10	1800	-1	119	123	101	96	123	119	116
11	2000	-8	118	124	100	96	124	120	118

Tabelle 5

Probe	Hb-Gehalt [mg/dl]	Gehalt bei 405 nm [U/l]	Gehalt bei 480 nm [U/l]	Gehalt bei 505 nm [U/l]	Gehalt bei 546 nm [U/l]	Gehalt bei 570 nm [U/l]	Gehalt bei 600 nm [U/l]	Gehalt bei 660 nm [U/l]	Gehalt bei 700 nm [U/l]
1	0	88,0	93,4	93,8	92,6	90,8	92,1	93,0	91,0
2	200	83,5	91,1	99,4	97,4	90,3	94,3	91,9	93,1
3	400	68,5	95,0	97,5	90,6	92,5	95,6	87,1	99,3
4	600	58,0	97,0	98,7	94,4	90,2	97,6	103,6	99,4
5	800	45,0	100,2	99,1	91,3	85,6	94,2	100,7	103,0
6	1000	38,6	101,8	101,5	91,4	92,3	105,3	100,9	99,4
7	1200	38,1	101,4	101,1	90,3	87,8	104,7	98,0	100,8
8	1400	18,0	101,4	104,8	92,0	91,6	104,9	109,3	104,6
9	1600	22,6	104,0	104,4	94,9	90,3	103,0	99,4	104,7
10	1800	20,2	102,9	102,2	91,9	94,3	102,8	106,8	94,0
11	2000	18,7	103,4	102,7	91,8	89,2	100,3	106,2	102,0

Probe	Hb-Gehalt [mg/dl]	Recovery 405 nm [%]	Recovery 480 nm [%]	Recovery 505 nm [%]	Recovery 546 nm [%]	Recovery 570 nm [%]	Recovery 600 nm [%]	Recovery 660 nm [%]	Recovery 700 nm [%]
1	0	100	100	100	100	100	100	100	100
2	200	95	98	106	105	99	102	99	102
3	400	78	102	104	98	102	104	94	109
4	600	66	104	105	102	99	106	111	109
5	800	51	107	106	99	94	102	108	113
6	1000	44	109	108	99	102	114	109	109
7	1200	43	109	108	98	97	114	105	111
8	1400	20	109	112	99	101	114	118	115
9	1600	26	111	111	102	99	112	107	115
10	1800	23	110	109	99	104	112	115	103
11	2000	21	111	110	99	98	109	114	112

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung eines Analyten in einer freies
5 Hämoglobin enthaltenden Probe durch optische bichroma-
tische Messung bei einer Haupt- und einer Nebenmeßwellen-
länge,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eine Nebenmeßwellenlänge von oberhalb 475 nm
10 verwendet, bei der sich Absorptionsbanden von Hämoglobin
befinden.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
15 daß man eine Nebenmeßwellenlänge im Bereich von
546 ± 10 nm verwendet.
3. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß man eine Nebenmeßwellenlänge im Bereich von
570 ± 10 nm verwendet.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3,
dadurch gekennzeichnet,
25 daß man einen Test durchführt, der auf einer Messung der
Zu- oder Abnahme der Konzentration von NADH oder NADPH in
der Probe beruht.
5. Verfahren nach Anspruch 4,
30 **dadurch gekennzeichnet,**
daß man eine Hauptmeßwellenlänge im Bereich von
340 ± 10 nm verwendet.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5,
35 **dadurch gekennzeichnet,**
daß man den Gehalt eines Analyten bestimmt, ausgewählt
aus der Gruppe bestehend aus Ammoniak, Creatinkinase und

Isoenzymen davon und Lactat-Dehydrogenase und Isoenzymen davon.

7. Verfahren nach Anspruch 6,
5 **dadurch gekennzeichnet,**
daß man eine Bestimmung von Ammoniak durchführt.
8. Verfahren nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet,
10 daß man eine Bestimmung von Creatinkinase oder/und des
Creatinkinase-Isoenzym CK-MB durchführt.
9. Verfahren nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet,
15 daß man eine Bestimmung von Lactatdehydrogenase oder/und
des Lactatdehydrogenase-Isoenzym HBDH durchführt.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-9,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß man eine Probe bestimmt, die ein Blutersatzmittel
enthält.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-10,
dadurch gekennzeichnet,
25 daß die Bestimmung an einer Serum- oder Plasmaprobe
durchgeführt wird.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-11,
dadurch gekennzeichnet,
30 daß man die Bestimmung in einem Analyseautomaten durch-
führt.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 97/02835

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 G01N33/52 G01N33/70 G01N33/72 C12Q1/00 C12Q1/32				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 G01N C12Q				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
A	CLINICAL CHEMISTRY, vol. 25, no. 6, 1979, WINSTON-SALEM SC USA, pages 951-959, XP002037050 B. HAHN ET AL.: "Polychromatic analysis: new applications of an old technique." cited in the application see figure 3 --- -/--	1-12		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.				
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.				
* Special categories of cited documents :				
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family </td> </tr> </table>			*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search <p style="text-align: center;">6 August 1997</p>	Date of mailing of the international search report <p style="text-align: center;">20 -08- 1997</p>			
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer <p style="text-align: center;">Van Bohemen, C</p>			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter national Application No
PC1/EP 97/02835

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL CHEMISTRY AND CLINICAL BIOCHEMISTRY, vol. 31, no. 9, 1993, BERLIN FRG, pages 595-601, XP002037051 F. DA FOSECA-WOLLHEIM : "Hemoglobin interference in the bichromatic spectrophotometry of NAD(P)H at 340/380 nm. " cited in the application see the whole document -----</p>	1-12
A	<p>EP 0 158 506 A (EASTMAN KODAK COMPANY) 16 October 1985 see page 3, line 10 - page 7, line 29 -----</p>	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/02835

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 158506 A	16-10-85	US 4627014 A	02-12-86
		CA 1227658 A	06-10-87
		JP 1754411 C	23-04-93
		JP 4039904 B	01-07-92
		JP 60249037 A	09-12-85

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 97/02835

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 G01N33/52 G01N33/70 G01N33/72 C12Q1/00 C12Q1/32		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 G01N C12Q		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	CLINICAL CHEMISTRY, Bd. 25, Nr. 6, 1979, WINSTON-SALEM SC USA, Seiten 951-959, XP002037050 B. HAHN ET AL.: "Polychromatic analysis: new applications of an old technique." in der Anmeldung erwähnt siehe Abbildung 3 ---	1-12
A	EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL CHEMISTRY AND CLINICAL BIOCHEMISTRY, Bd. 31, Nr. 9, 1993, BERLIN FRG, Seiten 595-601, XP002037051 F. DA FOSECA-WOLLHEIM : "Hemoglobin interference in the bichromatic spectrophotometry of NAD(P)H at 340/380 nm. " in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-12
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts	
6. August 1997	20 -08- 1997	
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter	
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Van Bohemen, C	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
 PCI/EP 97/02835

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 158 506 A (EASTMAN KODAK COMPANY) 16.Oktober 1985 siehe Seite 3, Zeile 10 - Seite 7, Zeile 29 -----	1-12

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/02835

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 158506 A	16-10-85	US 4627014 A	02-12-86
		CA 1227658 A	06-10-87
		JP 1754411 C	23-04-93
		JP 4039904 B	01-07-92
		JP 60249037 A	09-12-85
