



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 31 504 T2 2005.12.15**

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 814 336 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 31 504.5**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 109 281.2**

(96) Europäischer Anmeldetag: **09.06.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **29.12.1997**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **10.11.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.12.2005**

(51) Int Cl.7: **G01N 33/84**

(30) Unionspriorität:

20036 P	21.06.1996	US
752869	20.11.1996	US

(73) Patentinhaber:

Bayer Corp., Pittsburgh, Pa., US

(74) Vertreter:

**Köhler, F., Dipl.-Biol. Dr.rer.nat., Pat.-Ass., 40723
Hilden**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**Chapoteau, Eddy, Brooklyn, New York 11238, US;
Czech, Bronislaw P., Peekskill, New York 10566,
US; Craine, Jonathan, Monsey, New York 10952,
US**

(54) Bezeichnung: **Reagenz und Verfahren zur Freisetzung und Bestimmung von Blei in biologischen Matrices**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

1. Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Reagenzien und Verfahren zur Freisetzung und Messung von Blei in Blut.

2. Diskussion des Stands der Technik

[0002] Blei und seine Verbindungen haben sich in der Umwelt über die Jahrhunderte hinweg in breitem Umfang verteilt. Blei ist dafür bekannt, toxisch zu sein und schädliche Wirkungen auf den Mensch auszuüben. Die Toxizität von Blei ist gut dokumentiert. Bereits Spuren Mengen von Blei können die Funktion verschiedener Organe des menschlichen Körpers, insbesondere bei Kleinkindern, nachteilig beeinflussen. Es gilt nun als allgemein anerkannt, dass eine Vergiftung durch Blei bei Blutspiegeln von so wenig wie 10 bis 15 µg/dL auftritt. Daher sind der Nachweis und die Messung von Blei im Blut extrem wichtig bei einer universellen Blutuntersuchung und der Überwachung von Blei bei berufsbedingter Belastung.

[0003] Die meisten Blei-Untersuchungsprogramme wenden Atom-Absorptions- oder Anodenabstreif-Voltammetrieverfahren zur Bestimmung von Spuren Mengen von Blei an. Beide Verfahren sind nur mühsam anzuwenden, anfällig gegen Kontamination und kostenaufwendig. Enzym-basierte Bionachweissysteme von Blei, die δ-Aminolävulinsäure-Dehydrogenase (ALAD) und Isozitat-Dehydrogenase anwenden, sind ebenfalls vorgeschlagen worden. Ein automatisierter fluorimetrischer Blei-Assay, wobei die Inhibierung von ALAD durch Blei genutzt wird, ist in der PCT-Anmeldung WO 95/17679 von Wong et al. offenbart, und es wird darin der Nachweis von Blei in einer Probe offenbart, wobei ein Blei-Gewinnungsagens zu einer Assay-Lösung, die Blei enthält, ein Disulfid-Enzym zur Assay-Lösung zugegeben und die Aktivität des Disulfid-Enzyms zur Menge des Bleis in der Menge korreliert werden.

[0004] Das Patent von Wong et al. offenbart die Verwendung von Säuren wie von Trichloressig-, Salpeter-, 5-Sulfosalicyl- oder von Perchlorsäure als eine anfängliche Behandlungsstufe zur Abtrennung der Blei-Ionen aus einer Blutprobe. Allerdings muss der entstehende Blei-haltige wässrige Überstand mit einem Puffer, der das Blei-Rückgewinnungsagens enthält, vor der Analyse neutralisiert werden. Andernfalls ist das Blei zur Messung nicht verfügbar.

[0005] Weitere Verfahren und Proben-Vorbehandlungen schließen einen Säure-Abbau oder die Verdünnung von Blut mit einem Matrix-Modifiziermittel, wie mit einer Salpetersäure-Lösung von Ammoniumphosphat und einem nichtionischen oberflächenaktiven Mittel, vor der Analyse durch Atomabsorption ein.

Zusammenfassung der Erfindung

[0006] Die vorliegende Erfindung betrifft die Freisetzung und Messung des Blei-Gehalts einer biologischen Matrix, wie von Vollblut, mit Antikoagulanzen wie Heparin oder Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA). Ein Freisetzungsreagens wird verwendet, um den Blei-Gehalt in der Form von Blei-Ionen aus der biologischen Matrix in eine Überstandsflüssigkeit zu extrahieren, und dieses umfasst eine Säure-Lösung mit der Befähigung zur Freisetzung der Blei-Ionen aus der biologischen Matrix und mindestens ein oder mehrere Salze mit der Befähigung zur Solubilisierung der aus der biologischen Matrix freigesetzten Blei-Ionen.

[0007] Wird EDTA als das Antikoagulans verwendet, gelangt ein EDTA-Komplexierion zur Blockierung einer Komplexbildung der freigesetzten Blei-Ionen mit EDTA zur Anwendung, um dadurch die Komplexbildung der freigesetzten Blei-Ionen durch EDTA zu verhindern.

Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

[0008] Durch die vorliegende Erfindung wird ein neues Reagens zur Extraktion von Blei-Ionen aus einer biologischen Matrix wie aus menschlichem oder Rinder-Vollblut oder aus lyophilisiertem menschlichen Vollblut bereitgestellt. Die Matrices können auch entweder mit Heparin oder mit EDTA antikoaguliert sein. Durch die Erfindung wird auch ein Mittel zur Messung freigesetzter Blei-Ionen in einem Konzentrationsbereich von mehr als 0 bis ca. 100 µg/dL Pb²⁺ bereitgestellt und angegeben.

[0009] Wie hierin verwendet, bezeichnen die Begriffe "Freisetzen", "Extraktion" und "Rückgewinnung" von Blei aus der biologischen Matrix, dass im wesentlichen alles der Blei-Ionen, die in der ursprünglichen biologischen Matrix vorliegen und vorhanden sind, nach der Behandlung mit dem sauren Reagens der vorliegenden Erfindung in der Überstandsflüssigkeit gefunden wird, die die extrahierten Blei-Ionen enthält. Die Begriffe "Blei" und "Blei-Gehalt", wie sie hierin verwendet sind, bezeichnen den Gehalt der Blei-Ionen und werden in abgekürzter Form aus Gründen der Einfachheit verwendet. Ebenfalls wie hierin verwendet, bezeichnet der Begriff "Vollblut" Blut, das mit einem Antikoagulans wie mit Heparin oder EDTA antikoaguliert worden ist.

[0010] Spezifischer liegen ca. 90 bis 110% und vorzugsweise 100% des Blei-Gehalts der ursprünglichen unbehandelten biologischen Matrix im Überstand vor. Rückgewinnungen von mehr als 100% Blei werden deshalb möglich, weil es Verunreinigungen durch Blei gibt, die in den Reagenzien oder in der analytischen Umgebung vorhanden sein können.

[0011] Gemäß der vorliegenden Erfindung und durch die spezifische Anwendung zur Freisetzung und Messung des Gehalts von Blei-Ionen in Vollblut werden hinreichende Mengen einer Säure mit der Befähigung zur Befreiung und Freisetzung der Blei-Ionen aus roten Blutzellen im Zusammenwirken mit hinreichenden Mengen von mindestens einem oder mehreren Salzen mit der Befähigung zur Solubilisierung der aus dem Blut freigesetzten Blei-Ionen verwendet. Die vorliegende saure Zusammensetzung wird auch als das "Freisetzreagens" bezeichnet.

[0012] Geeignete Säuren mit der Befähigung zur Befreiung oder Freisetzung der Blei-Ionen aus roten Blutzellen schließen Trichloressig-, Perchlor-, 5-Sulfosalicylsäure und weitere gleichwertige Säuren ein. Eine besonders bevorzugte Säure ist ultrareine Trichloressigsäure, die z. B. von Fluka AG, Schweiz, erhältlich ist.

[0013] Die Salze mit der Befähigung zur Solubilisierung der freigesetzten Blei-Ionen aus Vollblut schließen diejenigen Salze mit einem Alkalimetall-Kation, wie mit Natrium, Kalium oder Lithium, ein. Der anionische Teil des Salzes kann ein Nitrat, Chlorid, Bromid und dgl. sein.

[0014] Bevorzugte Salze schließen die Nitrate von Natrium; Kalium und Lithium ein, wobei Natriumnitrat ganz besonders bevorzugt ist.

[0015] Bei Verwendung von EDTA als das Antikoagulans werden hinreichende Mengen eines EDTA-Komplexierens verwendet, um eine Komplexbildung der freigesetzten Blei-Ionen mit EDTA zu blockieren und dadurch die Komplexbildung der freigesetzten Blei-Ionen durch EDTA zu verhindern.

[0016] Die Salze mit der Befähigung zur Bereitstellung von Ionen, die mit EDTA einen Komplex bilden können, um die Komplexbildung der Blei-Ionen durch EDTA zu verhindern, schließen diejenigen Salze mit einem Erdalkalimetall-Kation, wie mit Calcium, Barium, Magnesium und Strontium, ein. Der anionische Teil des Salzes kann ein Nitrat, Chlorid, Bromid und dgl. sein. Bevorzugte Salze schließen die Nitrate von Calcium, Barium, Magnesium und Strontium ein, wobei Calciumnitrat besonders bevorzugt ist.

[0017] Eine Trichloressigsäure-Lösung mit hohen Konzentrationen von Natriumnitrat und Calciumnitrat wird als das bevorzugte universelle Reagens zur Befreiung oder Freisetzung der Blei-Ionen aus Vollblut verwendet, das entweder mit Heparin oder mit EDTA antikoaguliert worden ist.

[0018] Es ist herausgefunden worden, dass eine vernachlässigbare Menge an Blei-Ionen aus Vollblut freigesetzt wird, wenn nur die Trichloressigsäure-Lösung ohne die die Blei-Ionen solubilisierenden Salze und ohne die mit EDTA einen Komplex bildenden Salze verwendet wird.

[0019] Spezifischer schließt das Freisetzreagens ca. 5 bis 25% (G/V), vorzugsweise ca. 8 bis 15% (G/V) und am meisten bevorzugt ca. 10% (G/V) Trichloressigsäure ein. Mengen der Trichloressigsäure von mehr als 25% (G/V) können verwendet werden, allerdings haben diese größeren Mengen keine Steigerung der Wirksamkeit des Freisetzreagens ergeben.

[0020] Die Konzentration der die Blei-Ionen solubilisierenden Salze in der Trichloressigsäure-Lösung können ca. 0,2 bis 1,0 M, vorzugsweise ca. 0,3 bis 0,8 M und am meisten bevorzugt ca. 0,5 M ausmachen.

[0021] Die Konzentration der mit EDTA einen Komplex bildenden Salze in der Trichloressigsäure-Lösung können ca. 0,04 bis 1 M, vorzugsweise ca. 0,05 bis 0,5 M und am meisten bevorzugt ca. 0,08 bis 0,3 M ausmachen, wobei eine Konzentration von 0,1 M besonders bevorzugt ist.

[0022] Es ist herausgefunden worden, dass, wenn das Freisetzreagens, das die Trichloressigsäure-Lösung umfasst, die Natriumnitrat und Calciumnitrat enthält, in Kontakt mit Vollblut gebracht wird, im wesentlichen alle Vollblut-Proteine ausgefällt und im wesentlichen der gesamte Gehalt der Blei-Ionen im Blut quantitativ freigesetzt und in der Form einer Lösung gelöster Blei-Ionen in die Überstandslösung extrahiert werden. Die Abtrennung der Überstandslösung vom Niederschlag kann einfach und bequem durch Zentrifugation, Filtration und dgl. durchgeführt werden.

[0023] Mit dem Natriumnitrat ist herausgefunden worden, dass das Wirkvermögen und die Wirksamkeit der Trichloressigsäure bei der Ausfällung der Blut-Proteine aus Vollblut und beim Extrahieren der Blei-Ionen aus dem Vollblut in die Überstandslösung in der Form von löslichem Bleinitrat gesteigert werden.

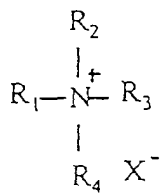
[0024] Die Calcium-Ionen im Calciumnitrat dienen dazu, die Bindungsstellen der EDTA zu maskieren oder zu blockieren und dadurch die EDTA daran zu hindern, Blei-Ionen zu binden oder mit diesen einen Komplex zu bilden. Bei der Anwendung von nicht mit EDTA antikoaguliertem Vollblut sind keine gegenläufigen Effekte mit dem vorhandenen Calciumnitrat beobachtet oder festgestellt worden. Somit hat sich die Zusammensetzung aus Trichloressigsäure/Natriumnitrat/Calciumnitrat als ausgezeichnetes Freisetzreagens für Vollblut erwiesen, das mit Heparin oder EDTA antikoaguliert worden ist, oder wobei die Natur des Antikoagulans unbekannt ist.

[0025] Die Vollblut-Mischung mit dem Freisetzreagens kann dann zentrifugiert werden, um die ausgefallenen Vollblut-Proteine von der Überstandslösung abzutrennen, die die gelösten Blei-Ionen und weitere Blut-Analyte enthält. Der Gehalt der Blei-Ionen in der Überstandslösung kann mit einem geeigneten analytischen Verfahren oder einer entsprechenden Vorrichtung, wie mit Atom-Absorption, anodischer Abstreifvoltametrie, Spektrofotometrie, Enzymbasierten Bionachweissystemen und dgl., gemessen werden.

[0026] Bei Verwendung eines spektrofotometrischen Analysegeräts können die freigesetzten Blei-Ionen in der Überstandslösung ganz leicht mit einem kolorimetrischen Porphyrin-basierten Reagens, in situ, ohne weitere Handhabungen am Überstand gemessen werden. Das Messverfahren beruht auf der spektralen Verschiebung des Wellenlängenmaximums des freien Tetrakis(trimethylammoniumphenyl)porphyrins im kolorimetrischen Reagens von 410 Nanometern, die anzeigen, dass kein Blei vorhanden ist, zu 463 Nanometern, die anzeigen, dass das kolorimetrische Porphyrin-Reagens vollständig mit Blei komplexiert worden ist.

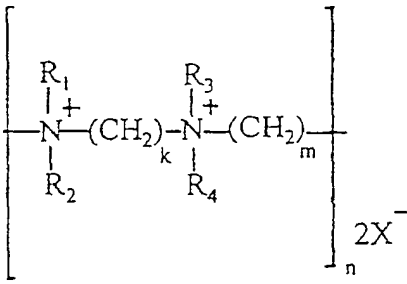
[0027] Andere Porphyrin-Verbindungen, wie Tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin oder Tetrakis(trimethylammoniumbenzyl)porphyrin, können ebenfalls verwendet werden. Die Absorptionsänderung ist proportional zur Konzentration des Bleis in der Probe. Es ist herausgefunden worden, dass die Zugabe eines löslichen quaternären Ammoniumsalzes zum kolorimetrischen Porphyrin-Reagens die Empfindlichkeit des kolorimetrischen Porphyrin-Reagens steigerte und die Spektralreaktion um mehr als 1 Größenordnung verbesserte. Die Zugabe von mehr als einer hinreichenden Menge von Ammoniumhydroxid hat ergeben, dass störende Kationen, wie Kupfer und Zink, maskiert und ein hoch alkalisches Medium für das kolorimetrische Reagens erzeugt werden.

[0028] Die quaternären Ammoniumsalze weisen die allgemeine Struktur auf:



worin R_1 , R_2 , R_3 und R_4 C_{1-18} -Alkyl oder entweder R_1 oder R_2 oder R_3 oder R_4 Aralkyl, wie Benzyl, und X Cl, Br oder J sein können. Geeignete quaternäre Ammoniumsalze schließen Cetyltrimethylammoniumbromid, Benzalkoniumchlorid, Octyldodecyldimethylammoniumchlorid, Tetrapentylammoniumbromid und Tetradecyltrimethylammoniumbromid ein.

[0029] Polymere quaternäre Ammoniumsalze der folgenden allgemeinen Struktur sind bevorzugter und weisen die folgende allgemeine Struktur auf:



worin R_1 , R_2 , R_3 und R_4 C_{1-4} -Alkyl ist, k , $m = 2$ bis 10 , $X = Cl, Br, J$ und $n = 1$ bis 30 . Besonders bevorzugt ist Hexadimethrinbromid.

[0030] Das kolorimetrische Porphyrin-Reagens wird in situ mit der Überstandsflüssigkeit, die die freigesetzten Blei-Ionen und das restliche Freisetzreagens enthält, ohne jede besondere Vorbehandlung in Kontakt gebracht. Die Konzentration der Porphyrin-Verbindung im kolorimetrischen Reagens kann ca. $5,0 \cdot 10^{-6}$ bis $2,0 \cdot 10^{-5}$ M und vorzugsweise ca. $2,5 \cdot 10^{-6}$ bis $1 \cdot 10^{-5}$ M ausmachen. Die Ammoniumhydroxid-Konzentration im kolorimetrischen Reagens kann ca. $0,2$ bis $2,0$ M und vorzugsweise ca. $0,5$ bis $1,0$ M ausmachen. Die Konzentration des quaternären Ammoniumsalzes kann ca. $0,002$ bis $0,1\%$ (G/V) und vorzugsweise ca. $0,0025$ bis $0,005\%$ (G/V) des kolorimetrischen Reagens ausmachen.

Beispiel 1: Herstellung des kolorimetrischen Porphyrin-Reagens zur Blei-Bestimmung

- Eine 10 mL-Vorratslösung von 1,0 mM (millimolar) Tetrakis(trimethylammoniumphenyl)porphyrin in destilliertem Wasser wurde zubereitet. Eine Anteilsmenge von 0,2 mL (Milliliter) dieser Lösung wurde zu 20 mL 1,0 M NH_4OH gegeben, und die entstandene Lösung wurde gerührt.
- Zu der gleichen in a) zubereiteten Lösung wurden 20 mg (Milligramm) Hexadimethrinbromid (0,01% G/V), erhältlich unter der Handelsmarke "Polybrene" von Sigma Chemical Company, gegeben, und die Mischung wurde gerührt, bis das Hexadimethrinbromid aufgelöst war, um dadurch das kolorimetrische Porphyrin-Reagens zu bilden.

Beispiel 2: Herstellung der Blei-Freisetzreagenzien

- 10,0 g (Gramm) Trichloressigsäure wurden in 80 mL Wasser in einem 100 mL-Messkolben gelöst und auf das Volumen von 100 mL mit destilliertem, entionisiertem Wasser aufgefüllt.
- 10,0 g Trichloressigsäure wurden in 80 mL Wasser in einem 100 mL-Messkolben gelöst. 4,3 g $NaNO_3$ wurden zugegeben, und die Inhaltmengen wurden auf das Volumen von 100 mL mit destilliertem, entionisiertem Wasser aufgefüllt, um eine 0,5 M $NaNO_3$ -Lösung mit Trichloressigsäure zu bilden.
- 9,3 g $NaNO_3$ wurden in einer Lösung von 10 g Trichloressigsäure in entionisiertem Wasser gelöst. 1,64 g $Ca(NO_3)_2$ wurden zur Lösung gegeben, und die Lösung wurde gerührt, bis alle Feststoffe aufgelöst waren. Die Lösung wurde in einen 100 mL-Messkolben überführt und auf das Volumen von 100 mL mit destilliertem, entionisiertem Wasser aufgefüllt, um eine Lösung von Trichloressigsäure mit 0,5 M $NaNO_3$ und 0,1 M $Ca(NO_3)_2$ zu bilden.

Beispiel 3: Herstellung von mit Blei versetztem Vollblut

[0031] 2,0 mL Blutproben wurden von Menschen sowohl in Heparin- als auch in EDTA-Röhrchen gesammelt, die von Becton Dickinson, Rutherford, New Jersey, geliefert wurden. Zu jedem der Heparin- und EDTA-Röhrchen wurden Anteilsmengen von 20 mg/mL Blei-Vorratslösung in 1,0 mM HNO_3 , hergestellt aus einem 1000 mg/dL Atom-Absorption-Blei-Standard von Aldrich Co., Milwaukee, Wisconsin, gegeben. Endgültige Lösungskonzentrationen von 10 bis 100 $\mu g/dL$ Pb^{2+} in 10 μg -Anteilsschritten wurden zubereitet. Danach wurde jedes Teströhrchen auf einem Vortex-Mischer (Fisher Scientific Industries) 1 min lang unter Verwirbelung gerührt und auf einen Rotationsmischer (Fisher Scientific Industries) 1/2 h lang gegeben, um eine homogene Lösung zu erhalten.

Beispiel 4: Vorbehandlung von Vollblut mit Freisetzreagens

[0032] 0,3 mL Mengen von Vollblut aus jedem Teströhrchen von Beispiel 3 wurden in separate 1 mL-Zentrifugenröhrchen pipettiert. 0,3 mL von 1 Blei-Freisetzreagens, ausgewählt aus Beispiel 2a, 2b oder 2c, wurden zu jedem Röhrchen gegeben. Die entstandene Mischung in jedem Röhrchen wurde 1 min lang durch Verwir-

belung gerührt, danach wurde bei 14.000 U/min (Umdrehungen pro min) auf einer Zentrifuge (Eppendorf Model 5415C) zentrifugiert. Der entstandene Überstand (0,4 mL) aus jeder Zentrifugation wurde in ein trockenes Teströhrchen abgegossen, das mit entionisiertem Wasser vorgespült wurde. Die anschließende Behandlung ist in den folgenden Beispielen im Detail angegeben.

Beispiel 5: Zubereitung von wässrigen Blei-Standards

[0033] Eine 100 µg/dL Pb²⁺-Lösung wurde durch Pipettieren von 0,1 mL eines 1000 mg/mL Atom-Absorptions-Blei-Standards in einen Messkolben von 100 mL zubereitet. Der Kolben wurde auf das Volumen mit einer Lösung aus 5%iger Trichloressigsäure, 0,25 M NaNO₃ und 0,05 M Ca(NO₃)₂ aufgefüllt.

[0034] Anteilsmengen (0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 8,0, 10,0 mL) der 100 µg/dL Pb²⁺-Lösung wurden in Messkolben von 10 mL pipettiert und auf das Volumen mit der Lösung aus 5%iger Trichloressigsäure, 0,25 mM NaNO₃ und aus 0,05 M Ca(NO₃)₂ aufgefüllt, um 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 bzw. 100 µg/dL Pb²⁺-Standards herzustellen.

Beispiel 6: Bestimmung von Blei mit dem Porphyrin-Reagens

A. Standard-Kurve

[0035] 1 mL kolorimetrisches Porphyrin-Reagens aus Beispiel 1b) wurde in einer Anzahl von 1,5 mL-Küvetten (Weglänge 1 = 1 cm) pipettiert. Zu dieser Küvette wurden 0,2 mL einer der wässrigen Blei-Standardkonzentrationen aus Beispiel 5 gegeben. Die dadurch gebildete Mischung wurde gerührt, um eine homogene Lösung zu bilden, und diese wurde bei Raumtemperatur 10 min lang stehen gelassen. Die Absorption bei 463 nm gegen Reagens ohne zugefügtes Blei (Reagens-Leerprobe) wurde auf einem Cary-3-Spektrofotometer (Varian Analytical Instruments) abgelesen. Die Absorptionsdaten bei 463 nm sind in Tabelle 1 angegeben und wurden gegen µg/dL Pb²⁺ zum Erhalt der Reaktionskurve in [Fig. 1](#) aufgetragen. [Fig. 2](#) zeigt die Spektralreaktion.

Tabelle 1
Absorptionsablesungen für das Porphyrin-Reagens mit Blei-Standards

µg/dL Pb ²⁺	ΔA ₄₆₃ nm
0,0	0,0000
5,0	0,0060
10,0	0,0136
20,0	0,0247
30,0	0,0421
40,0	0,0532
50,0	0,0690
60,0	0,0804
80,0	0,1081
100,0	0,1408

[0036] [Fig. 1](#) zeigt die Linearität der Reaktion des kolorimetrischen Reagens auf das Blei, und es wird ferner gezeigt, dass Blei-Ionen über einen breiten Konzentrationsbereich (0 bis 100 µg/dL) mit dem kolorimetrischen Porphyrin-Reagens gemessen werden können.

[0037] Die Reaktion des Porphyrin-Reagens auf störende Kationen, wie von Kupfer und Zink, wurde ebenfalls bewertet. Keine Änderung bei A₄₆₃ nm (Absorption bei 463 Nanometern) wurde in der Gegenwart von 150 µg/dL Zn²⁺ oder einer Mischung aus 100 µg/dL Cu²⁺ und 100 µg/dL Zn²⁺ beobachtet. Die potentielle Interferenz bzw. Störung aus diesen Kationen wurde durch die Verwendung von Ammoniumhydroxid als Maskierungsmittel wie dem von Beispiel 1 beseitigt.

B. Verfahren zur Analyse des Überstands, erhalten aus der Vorbehandlung von Vollblut mit Freisetzagens

[0038] 1,0 mL kolorimetrisches Porphyrin-Reagens aus Beispiel 1 wurde in ein 1,5 mL-Zentrifugenröhrchen pipettiert. Die Überstandsflüssigkeit (0,2 mL) aus der Vorbehandlung von Vollblut in Beispiel 4 mit den ausgewählten Freisetzreagenzien aus den Beispielen 2a, 2b und 2c wurde zugefügt, um eine Assay-Mischung zu bilden. Die Mischung wurde vermischt und 10 min lang bei 19.000 U/min in einer Eppendorf Model 5415C-Zentrifuge zentrifugiert. Eine Anteilsmenge (1,0 mL) wurde in eine 1,5 mL-Küvette (1 = 1 cm) übertragen, und die

Absorption bei 463 nm wurde an einem Cary 3-Spektrofotometer abgelesen.

Beispiel 7: Analyse von hepariniertem Vollblut

[0039] A. Dieses Beispiel gibt im Detail die Analyse von hepariniertem Vollblut aus Beispiel 3 an, das gemäß dem Verfahren von Beispiel 4 mit 10% (G/V) in Beispiel 2a zubereiteter Trichloressigsäure vorbehandelt wurde.

[0040] Die Überstände wurden gemäß dem Verfahren von Beispiel 6B mit dem kolorimetrischen Porphyrin-Reagens, enthaltend 0,01% G/V Hexadimethrinbromid (Beispiel 1b) oder ohne Hexadimethrinbromid (Beispiel 1a), analysiert. Keine Absorptionsänderung des kolorimetrischen Porphyrin-Reagens wurde in der Gegenwart der Überstände festgestellt, was anzeigt, dass keine nachweisbare Menge von Blei in die Überstände von Vollblutproben freigesetzt wurde, denen bis zu 100 µg/dL Pb²⁺ zugefügt wurden.

[0041] B. Dieses Beispiel gibt im Detail die Analyse von hepariniertem Vollblut an, das gemäß dem Verfahren von Beispiel 4 mit 10% (G/V) Trichloressigsäure und mit 0,5 M NaNO₃, hergestellt wie in Beispiel 2b, vorbehandelt wurde. Tabelle 2 zeigt die Daten für die Überstände, die mit dem kolorimetrischen Porphyrin-Reagens von Beispiel 1 gemäß dem Verfahren von Beispiel 6B analysiert wurden.

Tabelle 2

µg/dL Pb ²⁺	ΔA ₄₆₃ nm	
	Spalte A	Spalte B
0,0	0,0000	0,0000
100,0	0,0027	0,0370
% (G/V) Hexadimethrinbromid	0,00	0,01

[0042] Der Anstieg in ΔA₄₆₃ nm in Tabelle 2, Spalte A, zeigt, dass die Zugabe von NaNO₃ zur Trichloressigsäure die Freisetzung von Blei-Ionen begünstigte. Die Daten in Tabelle 2, Spalte B, zeigen, dass die Zugabe von Hexadimethrinbromid zum Porphyrin-Reagens die Empfindlichkeit erhöhte. Das Hexadimethrinbromid, ein Heparin-Antagonist, befreite die Blei-Ionen im Überstand von ihrer schwachen Wechselwirkung mit dem restlichen Heparin und verbesserte die Spektralreaktion um mehr als 1 Größenordnung.

[0043] Die Daten in Tabelle 3 zeigen die Absorptionsablesungen des heparinierten Vollbluts mit unterschiedlichen Konzentrationen von Blei-Ionen, als der Überstand mit dem kolorimetrischen Porphyrin-Reagens, enthaltend 0,01% G/V Hexadimethrinbromid, gemäß dem Verfahren von Beispiel 6B analysiert wurde. Ein Cary-3-Spektrofotometer wurde zur Aufzeichnung der Daten angewandt.

Tabelle 3
Hepariniertes Vollblut

µg/dL Pb ²⁺	ΔA ₄₆₃ nm
0,0	0,0000
10,0	0,0066
20,0	0,0144
30,0	0,0190
40,0	0,0230

[0044] Die Daten in Tabelle 4 stellen die Änderungen bei den Absorptionsablesungen (ΔA₄₆₃ nm) des kolorimetrischen Porphyrin-Reagens in Kontakt mit 20 und 40 µg/dL Pb²⁺-Blei-Standards aus Beispiel 5, verdünnt auf 1 : 1 mit dem Freisetzagens aus Beispiel 2b, gemäß Beispiel 6A dar.

Tabelle 4

STD ($\mu\text{g/dL Pb}^{2+}$)	ΔA_{463} nm
0,0	0,0000
20,0	0,0122
40,0	0,0210

[0045] Die Rückgewinnungsdaten in Tabelle 5 wurden aus der Absorptionsinformation aus den in Tabelle 4 angegebenen Standards und aus den in Tabelle 3 angegebenen Absorptionen des heparinierten Vollbluts gemäß der folgenden Gleichung berechnet:

$$\mu\text{g/dL Pb}^{2+} \text{ (gefunden)} = A_{463} \text{ (Probe)} / A_{463} \text{ (std)} \cdot \mu\text{g/dL Pb}^{2+} \text{ (std)} \quad [!]$$

Tabelle 5
Wiedergewinnungen von Blei, zugefügt zu hepariniertem Vollblut

zugefügt ($\mu\text{g/dL Pb}^{2+}$)	gefunden ($\mu\text{g/dL Pb}^{2+}$)
0,0	0,0
10,0	10,8
20,0	23,6
30,0	31,1
40,0	37,7

[0046] Die obigen Ergebnisse zeigen, dass die Zugabe von 0,5 M NaNO_3 zur 10%igen Trichloressigsäure die quantitative Freisetzung von Blei-Ionen, die hepariniertem Vollblut zugefügt wurden, im Gegensatz zu einer vernachlässigbaren Menge von Blei-Ionen begünstigte, die freigesetzt wurden, als lediglich Trichloressigsäure verwendet wurde.

Beispiel 8: Analyse von mit EDTA behandeltem Vollblut

[0047] A. Dieses Beispiel gibt im Detail die Analyse von mit EDTA behandeltem Vollblut an, das gemäß dem Verfahren von Beispiel 4 mit 10% (G/V) Trichloressigsäure und mit 0,5 M NaNO_3 aus Beispiel 2b vorbehandelt wurde. Die Absorptionsdaten in Tabelle 6 wurden gemäß dem Verfahren von Beispiel 6B erhalten.

[0048] Die in Tabelle 6 angegebenen Ergebnisse zeigen an, dass das Freisetzreagens aus 10% (G/V) Trichloressigsäure und aus 0,5 M NaNO_3 die Blei-Ionen nicht quantitativ aus mit EDTA antikoaguliertem Vollblut zu extrahieren vermag. Die Mehrheit der Blei-Ionen war zur Komplexbildung mit dem kolorimetrischen Porphyrin-Reagens nicht verfügbar, weil die Blei-Ionen mit EDTA komplexiert wurden.

Tabelle 6

zugefügt	$\mu\text{g/dL Pb}^{2+}$	$\Delta A_{463\text{nm}}$
	gefunden	
0,0	0,0	0,0000
200,0	2,1	0,0013

[0049] B. Dieses Beispiel gibt im Detail die Analyse von mit EDTA behandeltem Vollblut an, das gemäß dem Verfahren von Beispiel 4 mit dem Freisetzreagens aus 10% (G/V) Trichloressigsäure, 0,5 M NaNO_3 und aus 0,1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ aus Beispiel 2c vorbehandelt wurde. Die Absorptionsdaten in Tabelle 7 wurden gemäß Beispiel 6A erhalten. Die Absorptionsdaten in Tabelle 8 wurden gemäß Beispiel 6B erhalten.

Tabelle 7

$\mu\text{g/dL Pb}^{2+}$	$\Delta A_{463} \text{ (std)}$
0,0	0,0000
5,0	0,0072
10,0	0,0143
20,0	0,0275
40,0	0,0547

Tabelle 8

zugefügt	$\mu\text{g/dL Pb}^{2+}$	
	gefunden	$\Delta A_{463} \text{ (Probe)}$
0,0	0,0	0,0000
10,0	8,7	0,0060
20,0	18,1	0,0125
35,0	36,6	0,0240
50,0	52,2	0,0350
75,0	76,8	0,0570
100,0	98,5	0,0670

[0050] Die Konzentration der Blei-Ionen in den Überstandsflüssigkeiten wurden aus den ΔA_{463} (Standard)-Daten in Tabelle 7 und aus den ΔA_{463} (Probe)-Daten in Tabelle 8 gemäß der folgenden Gleichung berechnet:

$$\mu\text{g/dL Pb}^{2+} \text{ (gefunden)} = A_{463} \text{ (Probe)} / A_{463} \text{ (std)} \cdot 2 \cdot \mu\text{g/dL Pb}^{2+} \text{ (std)} \quad \text{[II]}$$

[0051] Die Ergebnisse in Tabelle 8 zeigen an, dass die Zugabe von Calcium-Ionen zum Freisetzagens die Freisetzung der Blei-Ionen aus mit EDTA antikoaguliertem Vollblut durch Blockierung der Bindungsstellen in der EDTA begünstigte, die andernfalls einen Komplex mit den Blei-Ionen bilden würde.

Beispiel 9: Analyse von Blei-Vergleichen und Bezugsmaterialien

[0052] A. Lyophilisiertes menschliches Vollblut, erhalten von Utak Laboratories in Valencia, Kalifornien, wurde gemäß dem Verfahren von Beispiel 4 mit dem Freisetzreagens aus 10% Trichloressigsäure/0,5 M NaNO_3 /0,1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ aus Beispiel 2c behandelt. Es war nicht bekannt, welches Antikoagulans im lyophilisierten Vollblut vorhanden war. Unter diesen Bedingungen, unter denen das Antikoagulans unbekannt war, erwies sich das Freisetzreagens des Beispiels 2c als universell anwendbar, und zwar unabhängig von der Natur des Antikoagulans des Vollbluts. Die Überstände wurden gemäß dem Verfahren von Beispiel 6B analysiert.

Tabelle 9

$\mu\text{g/dL Pb}^{2+}$	gefunden	$\Delta A_{463} \text{ nm}$
Spiegel I (8-16)	9,1	0,0060
Spiegel II (21-29)	20,5	0,0144
Spiegel III (32-40)	29,8	0,0207
Spiegel IV (51-63)	49,4	0,0340

[0053] Die Konzentration der in Tabelle 9 detailliert angegebenen Blei-Ionen wurde gemäß der in Beispiel 8B angegebenen Gleichung II berechnet.

B. Analyse von National Institute of Standards (NIST)-Referenzmaterialien

[0054] Die NIST-Referenzmaterialien stellen Rinder-Vollblut, antikoaguiert mit EDTA, dar. Das NIST-Rinder-Blut wurde gemäß dem Verfahren von Beispiel 4 mit 10% Trichloressigsäure/0,5 M NaNO_3 /0,1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Freisetzreagens des Beispiels 2c vorbehandelt. Die Überstände wurden gemäß dem Verfahren von Beispiel 6B analysiert, und zwar mit den folgenden Daten:

Tabelle 10

($\mu\text{g}/\text{dL Pb}^{2+}$)	gefunden	ΔA_{463} nm
955a-1* (5,01)	3,7	0,003
955a-2* (13,53)	14,0	0,010
955a-3* (30,63)	28,7	0,020
955a-4* (54,40)	58,2	0,040

NIST-Vergleichszahlen

[0055] Die Extraktion der Blei-Ionen aus den NIST-Referenzmaterialien wurde durch die spektrale Blei-Reaktion des kolorimetrischen Porphyrin-Reagens des Beispiels 1b in Kontakt mit den NIST-Überständen bestätigt, dargestellt in [Fig. 3](#). Das Spektrum wurde durch Rastern der Assay-Mischung, erhalten gemäß dem Verfahren von Beispiel 6B, von 700 bis 300 nm an einem Cary-3-Spektrofotometer aufgezeichnet.

[0056] Die Ergebnisse aus den Beispielen 8B, 9A und 9B belegen, dass die Ausführungsformulierung des Freisetzreagens Blei-Ionen quantitativ aus einer Vielzahl von Matrices extrahiert.

[0057] Durch die vorliegende Erfindung wird ein universelles Freisetzreagens zum Extrahieren von Blei-Ionen aus einer Vielzahl biologischer Matrices wie aus Serum, Urin, Milch und dgl. angegeben und bereitgestellt. Das Freisetzreagens eignet sich ganz besonders zum Extrahieren von Blei-Ionen aus menschlichem Vollblut, das entweder mit Heparin oder mit EDTA antikoaguiert wurde, und aus Rinder-EDTA-Vollblut, oder worin die Natur des Antikoagulans unbekannt ist, wie dies oft bei lyophilisiertem menschlichen Vollblut vorkommt.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Freisetzung des Gehalts von Blei-Ionen aus einer biologischen Matrix, wobei man die biologische Matrix mit einem Reagens, das die Blei-Ionen freisetzt und eine Lösung einer Säure umfasst, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Trichloressig-, Perchlor- und aus 5-Sulfosalicylsäure, und mit einer Substanz in Kontakt bringt, die die Blei-Ionen solubilisiert und ein Alkalimetallsalz umfasst, das ein Anion aufweist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Nitrat, Chlorid und aus Bromid, um dadurch eine Überstandslösung, die die freigesetzten Blei-Ionen enthält, und einen Niederschlag zu bilden, der den Rückstand der biologischen Matrix umfasst.

2. Reagens zur Freisetzung des Gehalts von Blei-Ionen aus einer biologischen Matrix, umfassend eine Lösung eines die Blei-Ionen freisetzenden Reagens, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Trichloressig-, Perchlor- und aus 5-Salicylsäure, und eine Substanz, die die Blei-Ionen solubilisiert und ein Alkalimetallsalz umfasst, das ein Anion aufweist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Nitrat, Chlorid und aus Bromid.

3. Verfahren zur Bestimmung der Menge von Blei-Ionen in mit Heparin antikoagulierem Vollblut, welches die Stufen umfasst, in denen man:

- das Vollblut mit einem Reagens, das die Blei-Ionen freisetzt und eine Lösung einer Säure umfasst, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Trichloressig-, Perchlor- und aus 5-Sulfosalicylsäure, und mit einer Substanz in Kontakt bringt, die die Blei-Ionen solubilisiert und ein Alkalimetallsalz umfasst, das ein Anion aufweist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Nitrat, Chlorid oder aus Bromid, um dadurch eine Überstandslösung, die die freigesetzten Blei-Ionen enthält, und einen Rückstand zu bilden, der den ausgefällten Vollblut-Proteingehalt umfasst,
- die Überstandslösung vom Niederschlag abtrennt und man
- den Gehalt der Blei-Ionen in der Überstandslösung misst.

4. Verfahren zur Bestimmung der Menge von Blei-Ionen in mit EDTA antikoagulierem Vollblut, welches

Stufen umfasst, in denen man:

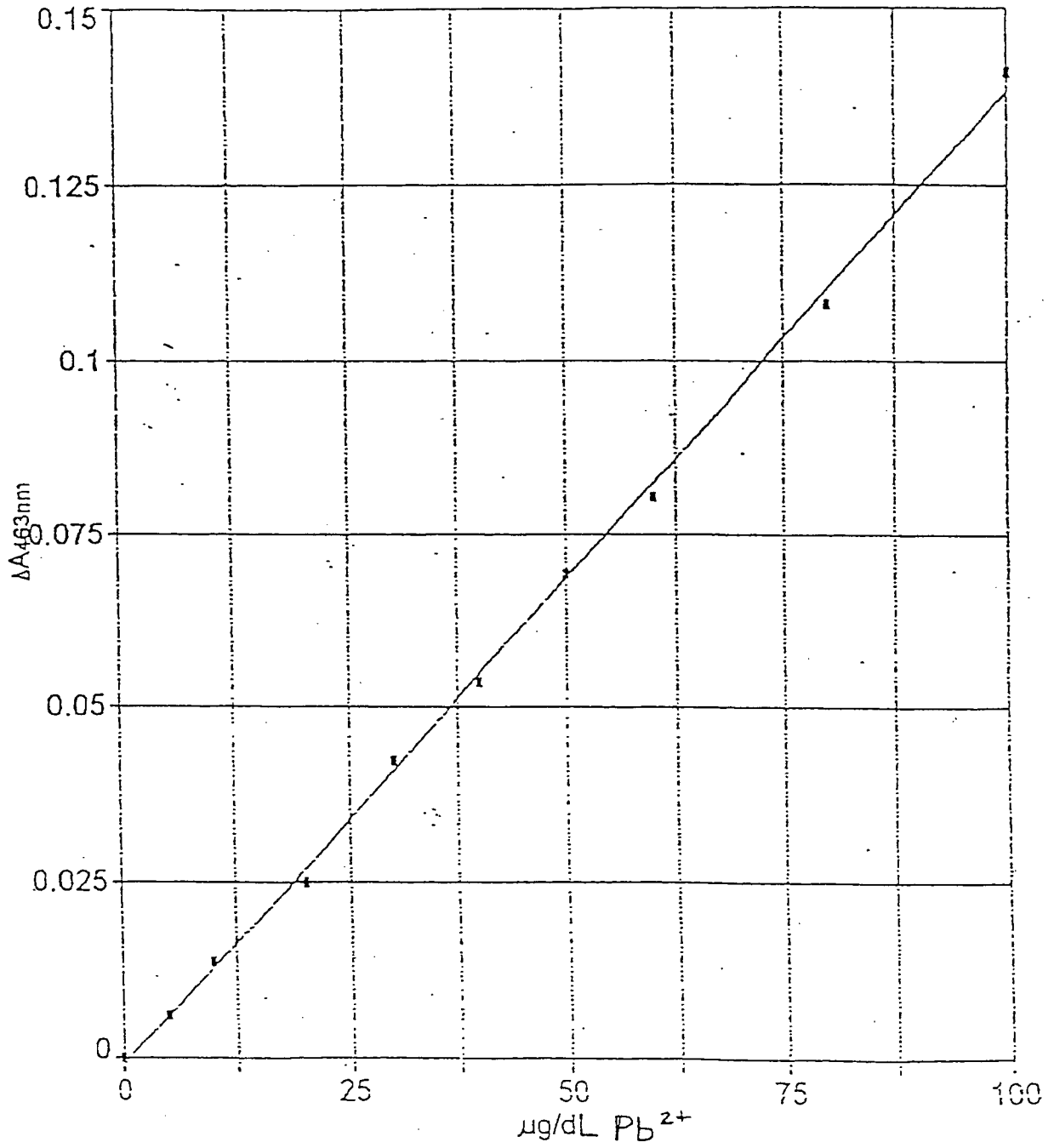
- a) das Vollblut mit einem Reagens, das die Blei-Ionen freisetzt und eine Lösung einer Säure umfasst, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Trichloressig-, Perchlor- und aus 5-Sulfosalicylsäure, mit genügend Mengen einer Substanz, die die Blei-Ionen solubilisiert und ein Alkalimetallsalz umfasst, das ein Anion aufweist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Nitrat, Chlorid und aus Bromid, und mit einer Substanz in Kontakt bringt, die verhindert, dass das EDTA einen Komplex mit den Blei-Ionen bildet und ein Erdalkalimetallsalz umfasst, das ein Anion aufweist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Nitrat, Chlorid und aus Bromid, um dadurch eine Überstandslösung, die die freigesetzten Blei-Ionen enthält, und einen Niederschlag zu bilden, der den Vollblut-Proteingehalt umfasst,
- b) die Überstandslösung vom Niederschlag abtrennt und man
- c) den Gehalt der Blei-Ionen in der Überstandslösung misst.

5. Verfahren zur Bestimmung der Menge von Blei-Ionen in Vollblut, das ein unbekanntes Antikoagulans aufweist, welches Stufen umfasst, in denen man:

- a) das Vollblut mit einem Reagens, das die Blei-Ionen freisetzt und eine Lösung einer Säure umfasst, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Trichloressig-, Perchlor- und aus 5-Sulfosalicylsäure, mit einer Substanz, die die Blei-Ionen solubilisiert und ein Alkalimetallsalz umfasst, das ein Anion aufweist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Nitrat, Chlorid und aus Bromid, und mit einer Substanz in Kontakt bringt, die es verhindert, dass die freigesetzten Blei-Ionen einen Komplex mit jeglichem vorhandenen EDTA bilden und ein Erdalkalimetallsalz umfasst, das ein Anion aufweist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Nitrat, Chlorid und aus Bromid, um dadurch eine Überstandslösung, die die freigesetzten Blei-Ionen enthält, und einen Niederschlag zu bilden, der den Vollblut-Proteingehalt umfasst,
- b) die Überstandslösung vom Niederschlag abtrennt und man
- c) den Gehalt der Blei-Ionen in der Überstandslösung misst.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Fig. 1



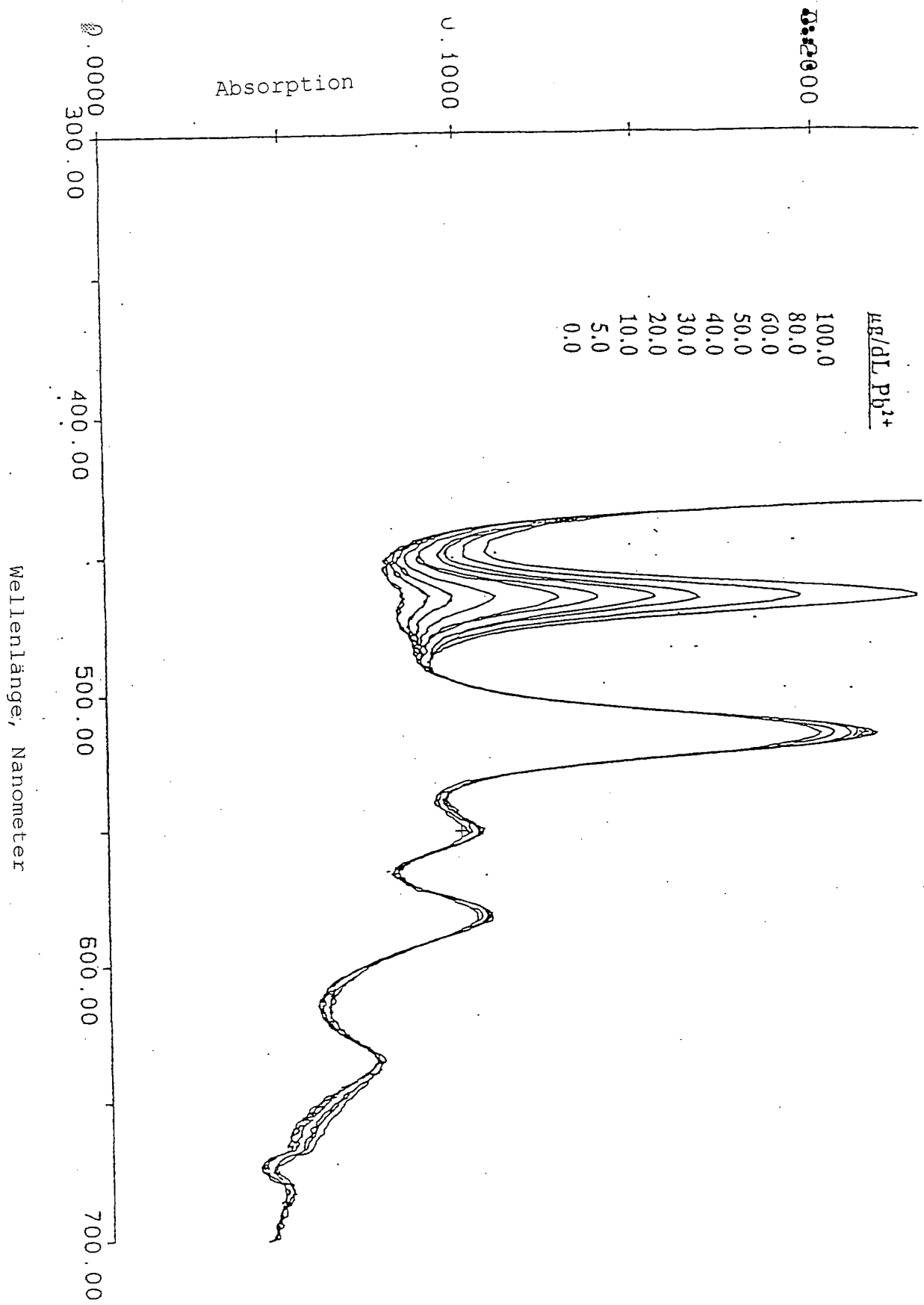


Fig. 2

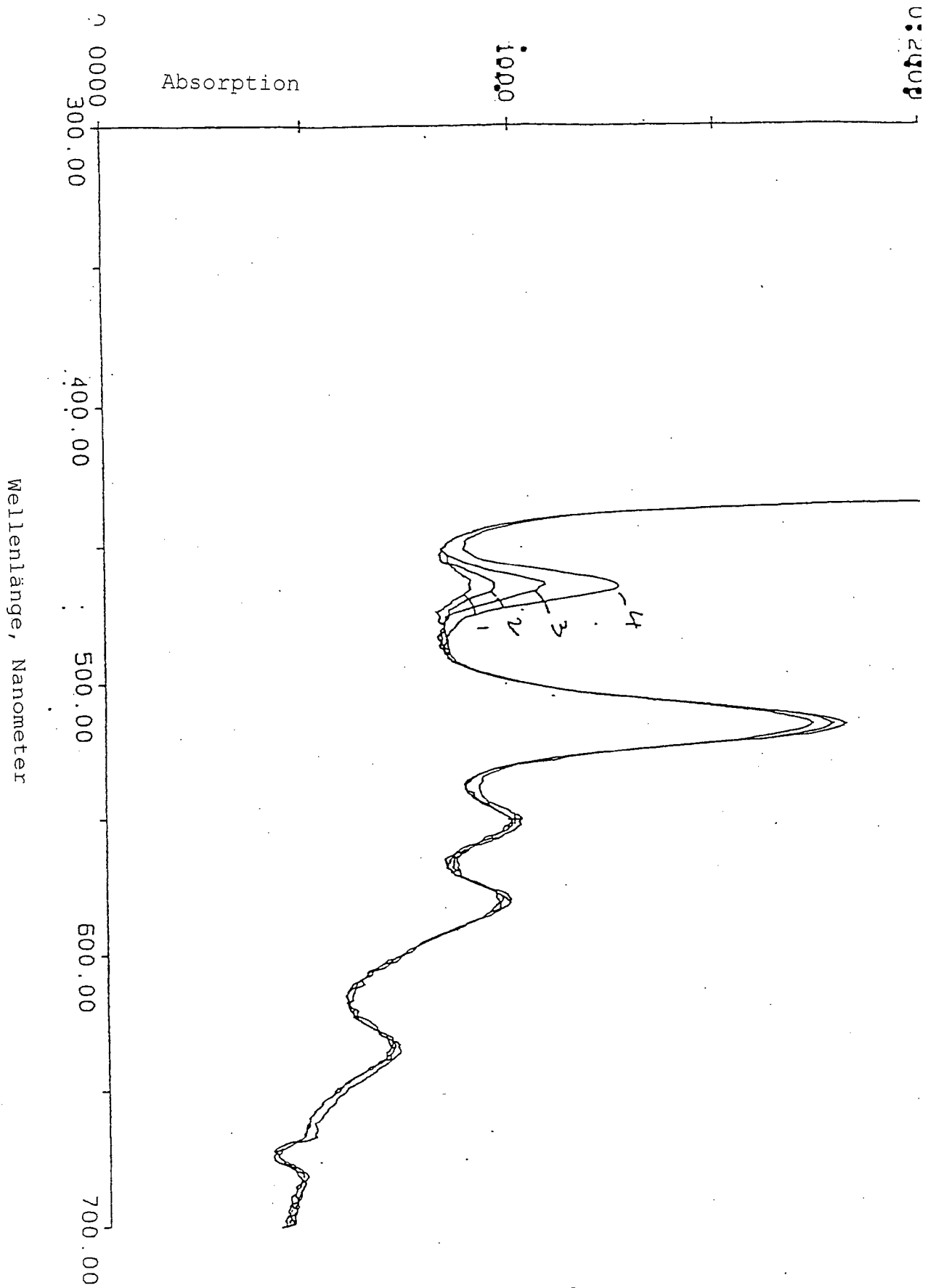


Fig. 3