



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 218 905 A1

4(51) C 12 Q 1/28

## AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) W P C 12 Q / 247 421 8

(22) 24.01.83

(44) 20.02.85

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1199 Berlin, Rudower Chaussee 5, DD

(72) Hanke, Thomas, Dipl.-Chem.; Mohr, Peter, Prof. Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Ebert, Bernd, Dr. rer. nat. Dipl.-Bio-phys.; Kuhn, Wolfgang, DD

## (54) Indikatorsystem zur Bestimmung von peroxidatischen Aktivitäten

(57) Die Erfindung betrifft ein Indikatorsystem zur Bestimmung von peroxidatischen Aktivitäten mittels semichinoniminbildenden Diphenylderivaten. Erfindungsgemäß werden auf eine feste, transparente oder nicht transparente Unterlage mehrere, mindestens jedoch 2 Schichten aufgetragen, wobei in der mit der Unterlage in Kontakt stehenden Schicht alle zur Farbbildung notwendigen Komponenten außer Peroxydase in einem Bindemittel enthalten sind bzw. erzeugt werden können und die nachfolgende bzw. (bei mehr als zwei Schichten) die nachfolgenden Schichten alle Komponenten außer Peroxydase und dem semichinonbildenden Diphenylderivat enthalten. Der Einsatz des Systems erfolgt zu Meß- und Kontrollzwecken in Laboratorien, in der Produktion sowie in der medizinischen Diagnostik.

T. Hanke  
Prof. Dr. P. Mohr  
Dr. B. Ebert  
W. Kuhn

"Indikatorsystem zur Bestimmung von peroxidatischen Aktivitäten"

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Indikatorsystem zur Aktivitätsbestimmung von Peroxidasen und anderen peroxidatisch wirksamen Substanzen in Lösung mit Hilfe eines in fester Phase (z. B. als Teststreifen) vorliegenden Indikators. Der Einsatz des Systems erfolgt zu Meß- und Kontrollzwecken in Laboratorien und in der Produktion, wie beispielsweise der Nahrungsgüterwirtschaft, der mikrobiologischen Industrie, der Landwirtschaft und im Umweltschutz sowie in der medizinischen Diagnostik, z. B. innerhalb immunologischer Tests.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Bestimmung der Aktivität von Peroxidasen und anderen peroxidatisch wirksamen Substanzen ist für die biochemische Analytik und medizinische Diagnostik von Bedeutung. Verwendung finden hierbei üblicherweise Testsysteme, die mit einem in homogener Phase verteilten Chromogen als Farbtests durchgeführt werden (H. Gallati, H. Brodbeck: J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 20 (1982) 221; K. G. Paul, P. I. Ohlsson, N. A. Jönsson: Anal. Biochem. 124 (1982) 102.) Allen diesen Testsystemen ist gemeinsam, daß durch die nachzuweisende, peroxidatisch wirksame Substanz eine Reaktion von  $H_2O_2$  mit einer ungefärbten Substanz zu einem Farbstoff katalysiert wird. Mittels visueller oder spektrometrischer Verfahren kann eine qualitative, halbquantitative oder quantitative Auswertung

des Testergebnisses vorgenommen werden. Als Farbbildner werden u. a. Benzenderivate (z. B. Hydrochinon, Guajakol) oder Biphenylderivate (z. B. o-Tolidin, o-Dianisidin, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) eingesetzt, zumeist in Verbindung mit Farbkupplern (R. H. White-Stevens, L. R. Stover: Clin. Chem. 28 (1982) 589; K. Tamaoku, Y. Murao, K. Akiura, Y. Ohkura: Anal. Chim. Acta 136 (1982) 121 sowie dort zitierte Literatur).

Bei der Mehrzahl der bekannten, in homogener Phase ablaufenden Farbttests ist jedoch von Nachteil, daß alle erforderlichen Reagenzien in bestimmten Konzentrationen nach einer Handhabungsvorschrift zusammengegeben werden müssen, woraus letztlich ein relativ hoher zeitlicher Aufwand resultiert. Es gibt bisher jedoch noch keinen visuell und spektrophotometrisch auswertbaren Teststreifen zur Bestimmung der Aktivität von Peroxidasen und anderen peroxidatisch wirksamen Substanzen.

#### Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, die analytischen Systeme zur Bestimmung von Peroxidasen und anderen peroxidatisch wirksamen Substanzen weiterzuentwickeln. Eine Vereinfachung der Handhabbarkeit soll dadurch erreicht werden, daß die Farb- und teilweise auch die  $H_2O_2$ -bildenden Komponenten bereits in einer festen Phase vorgebildet sind.

#### Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Indikatorsystem zu entwickeln, das für eine Schnellbestimmung von Peroxidasen und anderen peroxidatisch wirksamen Substanzen geeignet ist. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß ein Indikatorsystem, vorzugsweise bestehend aus Biphenyl-Derivaten, wie o-Tolidin oder 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin zusammen mit einem Farbstabilisator (z. B. einer monomeren oder polymeren

aromatischen Karbon- oder Sulfonsäure bzw. einer aromatischen oder heterocyclischen Aminoverbindung mit langkettigen aliphatischen Substituenten gemäß WP G 01 N/236 500) und dem Enzym Glukoseoxidase in einem Bindemittel (z. B. Gelatine, Polysaccharid-Gele oder synthetische Polymere) aufgelöst und als Schicht auf einen festen, transparenten oder nicht transparenten Träger aufgegeben wird. Auf diese Schicht wird erfindungsgemäß eine zweite Schicht, bestehend aus dem gleichen oder einem anderen geeigneten Bindemittel, aufgetragen, die jedoch nur den Farbstabilisator enthält und nachfolgend als Affinitätsschicht bezeichnet wird. Das Wesen des Indikatorsystems liegt in dieser Affinitätsschicht begründet. Sie muß so aufgebaut sein, daß einerseits die Diffusion der Reaktanten in beiden Richtungen nicht behindert wird, andererseits aber der gebildete Farbstoff festgehalten und stabilisiert wird. Durch die Verbindung dieser beiden Eigenschaften gemäß der Erfindung ist es möglich, die Aktivität von Peroxidase oder anderen peroxidatisch wirksamen Substanzen zu bestimmen, ohne daß diese in Schichten einzudringen brauchen. Im Bedarfsfalle können auch mehrere Affinitätsschichten verwendet werden.

Zur Bestimmung der peroxidatischen Aktivität einer vorgegebenen Probe wird diese bei pH 6 mit einer ausreichenden Menge an Glukose versetzt. Daraufhin wird ein Tropfen des Probenmaterials auf das Indikatorsystem, das z. B. ein Teststreifen sein kann, aufgegeben oder ein passender Streifen des Indikatorsystems wird in eine Meßküvette, die die mit Glukose versetzte Probenlösung enthält, eingetaucht.

Die Glukose erzeugt in einer durch die immobilisierte Glukoseoxidase katalysierten Reaktion mit gelöstem Sauerstoff einen Überschuß an  $H_2O_2$  im Indikatorsystem. Das  $H_2O_2$  bildet mit dem Biphenylderivat in Anwesenheit von Peroxidase oder einer anderen peroxidatisch wirksamen Substanz einen Farbstoff, dessen Bildungskinetik zur Aktivitätsbestimmung der

Peroxidase oder einer peroxidatisch wirksamen Substanz herangezogen werden kann. Dementsprechend wird die Extinktionsänderung der Farbstoffbande im optischen Spektrum (im Falle des o-Tolidins bei 625 nm) danach reflektrometrisch oder bei transparenten Streifen im Durchlicht gemessen. Aus der ermittelten Zeitabhängigkeit der Extinktion wird in der üblichen Weise durch Ermittlung der Anfangssteigung (z. B. nach der Zweipunktmethode) die peroxidatische Aktivität der Probenlösung berechnet.

Die Erfindung wird nachfolgend durch Anwendungsbeispiele näher erläutert.

### Ausführungsbeispiele

#### Beispiel 1

2,8 g Gelatine werden in 16 ml destilliertem Wasser bei Raumtemperatur 30 Minuten gequollen und dann in 30 min bei 60°C gelöst. Zu dieser Lösung werden 40 mg von 6-Octadecyl-alkyl-amino-1-methoxy-naphthensulfonsäure-4 (alkyl = C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) (gelöst in 0,6 ml 1 n Natronlauge und 12 ml Wasser) gegeben, wobei die Temperatur auf 40°C gehalten wird. Nach weiterer Zugabe von 0,4 ml Äthylenglykol, 0,02 ml Netzmittel und 60 mg Glukoseoxidase (spezifische Aktivität etwa 45 U/mg) wird der Ansatz halbiert. Die Hälfte wird nunmehr mit 60 mg o-Tolidin • HCl versetzt und im Tauchgußverfahren bei 40°C auf eine inerte transparente Unterlage aufgetragen.

Nach 4-stündigem Trocknen bei 28°C wird auf die Schicht nach dem gleichen Verfahren eine zweite Schicht, die alle o. g. Komponenten außer o-Tolidin enthält, gegeben und wiederum wie beschrieben getrocknet.

Werden Streifen dieses Materials in eine peroxidatisch aktive Lösung, die mit einer ausreichenden Menge an Glukose versetzt worden ist, eingetaucht, so färben sich die Streifen bereits innerhalb kurzer Zeit blau, wobei die Anfangssteigung der bei 630 nm gemessenen Extinktionsänderung/Zeiteinheit direkt mit der peroxidatischen Aktivität korreliert ist.

Beispiel 2

Der in Beispiel 1 beschriebene Zweischichtenfilm wird in Methämoglobin-Lösungen, die etwa 5,5 mM Glukose enthalten, eingetaucht und die peroxidatische Aktivität ebenfalls aus der Anfangssteigung der Extinktionsänderung/Zeiteinheit bestimmt.

Erfindungsanspruch

Indikatorsystem zur Bestimmung der Aktivität von Peroxidasen und anderen peroxidatisch wirksamen Substanzen mit Hilfe von semichinoniminbildenden Biphenylderivaten, wie Benzidin und o-Tolidin in Verbindung mit einem Stabilisator, dadurch gekennzeichnet, daß auf eine feste, transparente oder nicht transparente Unterlage mehrere, mindestens jedoch zwei Schichten aufgetragen werden, wobei in der mit der Unterlage in Kontakt stehenden Schicht alle zur Farbbildung notwendigen Komponenten außer Peroxydase in einem Bindemittel enthalten sind bzw. erzeugt werden können und die nachfolgende bzw. (bei mehr als zwei Schichten) die nachfolgenden Schichten alle Komponenten außer Peroxydase und dem semichinonbildenden Biphenylderivat enthalten.