



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.³: G 01 N 33/52
C 12 Q 1/62

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑪

646 792

⑳① Gesuchsnummer:	3673/83	㉔③ Inhaber:	Miles Laboratories, Inc., Elkhart/IN (US)
㉔② Teilgesuch von:	7437/79		
㉔② Anmeldungsdatum:	14.08.1979	㉔⑦ Erfinder:	Berti, Giovanni, Malgrate/Como (IT) Fossati, Piero, Lissone/Milano (IT)
㉔③ Priorität(en):	13.04.1979 US 029670		
㉔④ Patent erteilt:	14.12.1984		
㉔⑤ Patentschrift veröffentlicht:	14.12.1984	㉔⑦④ Vertreter:	E. Blum & Co., Zürich

㉔⑤④ Testvorrichtung für die Bestimmung von Harnsäure.

㉔⑤⑦ Die Testvorrichtung für die Bestimmung von Harnsäure in einer flüssigen Probe enthält einen mit einer Zusammensetzung verbundenen Träger, wobei die Zusammensetzung auf die in der Probe vorhandene Harnsäure ansprechende Mittel und Phenol oder ein substituiertes Phenol oder Naphthol oder ein substituiertes Naphthol und 4-Aminophenazon enthält, und wobei in der Zusammensetzung zusätzlich ein Ferrocyanid-Ionen enthaltendes Reagens anwesend ist.

POOR QUALITY

PATENTANSPRÜCHE

1. Testvorrichtung für die Bestimmung von Harnsäure in einer flüssigen Probe, dadurch gekennzeichnet, dass sie einen mit einer Zusammensetzung verbundenen Träger enthält, wobei die Zusammensetzung auf die in der Probe vorhandene Harnsäure ansprechende Mittel und Phenol oder ein substituiertes Phenol oder Naphthol oder ein substituiertes Naphthol und 4-Aminophenazon enthält, und wobei in der Zusammensetzung zusätzlich ein Ferrocyanid-Ionen enthaltendes Reagens anwesend ist.

2. Testvorrichtung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Phenol unsubstituiert ist.

3. Testvorrichtung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das substituierte Phenol 3,5-Dichlor-2-hydroxybenzolsulfonsäure ist.

4. Testvorrichtung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das zusätzlich anwesende Reagens ein Ferrocyanid-Salz ist.

5. Testvorrichtung gemäss Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Ferrocyanid-Salz Natriumferrocyanid oder Kaliumferrocyanid ist.

6. Verfahren für die Herstellung einer Testvorrichtung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man einen Träger mit der in Anspruch 1 genannten Zusammensetzung verbindet.

7. Verfahren gemäss Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung und der Träger verbunden werden, indem der Träger mit einer Lösung des betreffenden

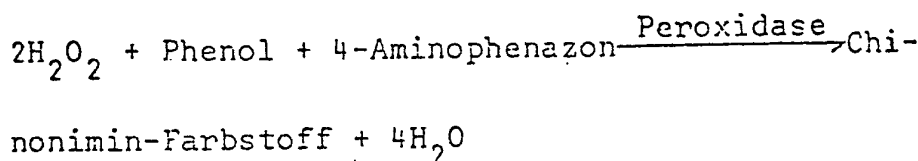
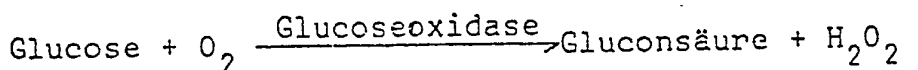
Testmittels imprägniert und der Träger anschliessend getrocknet wird.

8. Verfahren für die Bestimmung von Harnsäure in einer flüssigen Probe, dadurch gekennzeichnet, dass man die betreffende Probe mit der Testvorrichtung gemäss Anspruch 1 in Kontakt bringt und auf dieser die Farbe beurteilt, die sich dabei gebildet hat.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich allgemein auf das Gebiet der diagnostischen Tests und spezieller jener Tests, die nützlich in der qualitativen und quantitativen Bestimmung der Harnsäure in Körperflüssigkeiten, wie z.B. Urin oder Blut, sind. Genauer ausgedrückt, bezieht sie sich auf jene Tests, in denen die Harnsäure in eine oxidierende Verbindung umgewandelt wird, wie z.B. in ein Peroxid.

Die oxidative Kupplungs-Reaktion zwischen Phenol und 4-Aminophenazon, auch bekannt als 4-Aminoantipyrin, die einen roten Chinonimin-Farbstoff ergibt, ist seit langem bekannt und ist von Emerson, J. Org. Chem. 8: 417 (1943) beschrieben worden.

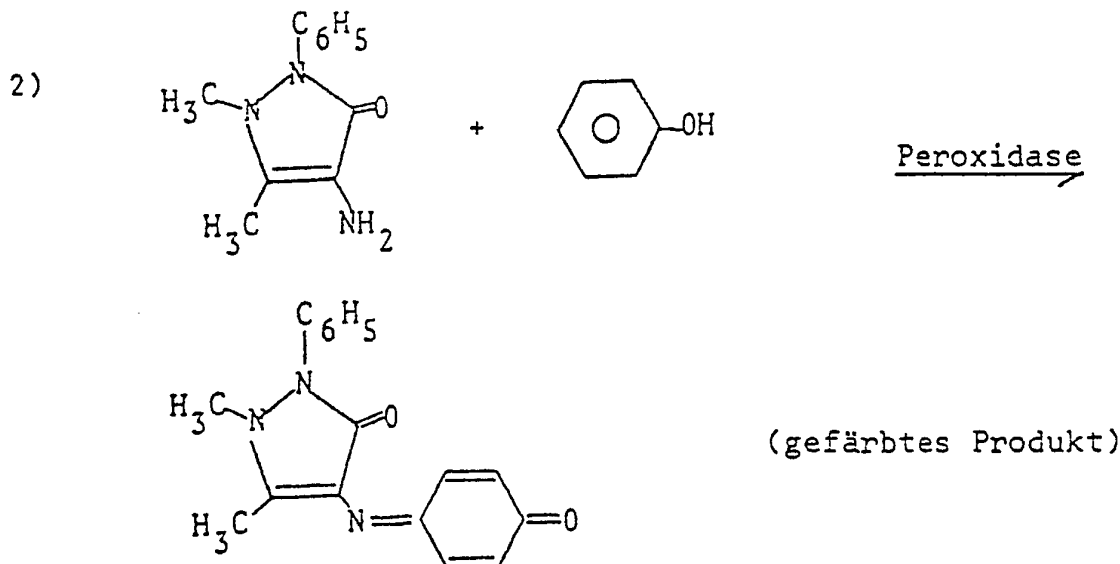
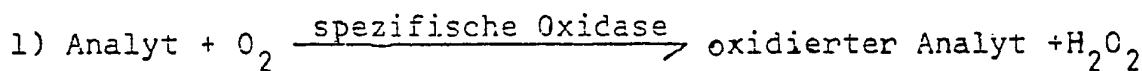
Die Reaktion hat in der klinischen Chemie Popularität gewonnen, seit sie von Trinder [Ann. Clin. Biochem. 6: 24 (1969)] auf die enzymatische Bestimmung von Glucose angewendet wurde, die auf folgendem Reaktionsschema basiert:



Das chromogene System Phenol (einschliesslich substituierte Phenole) + 4-Aminophenazon + Peroxidase, bezeichnet als das Emerson-Trinder-System, wird heutzutage nicht nur in der quantitativen Bestimmung von Glucose, sondern auch von Cholesterin und Harnsäure im Serum, Plasma oder

anderen biologischen Flüssigkeiten verwendet. Die Anwendung dieses Systems bei der Bestimmung von Glucose wurde in Meitattinis U.S.-Patent Nr. 3 886 045, jetzt wiedererteilt als Re 29 498, offenbart.

Das allgemeine Reaktionsschema ist das Folgende:



In der Emerson-Trinder-Reaktion können viele Phenole eingesetzt werden. Beispiele solcher in der klinischen Chemie am gebräuchlichsten, sind Phenol, p-Hydroxybenzoat, 2,4-Dichlorphenol, 3,5-Dichlor-2-hydroxybenzolsulfonsäure. Desgleichen können verschiedene substituierte und unsubstituierte Naphthole eingesetzt werden.

Komponenten in Proben, die bestimmt werden können, schliessen Glucose, Cholesterin, Harnsäure oder andere Metaboliten ein, welche durch eine spezifische Oxidase, unter gleichzeitiger Bildung von Wasserstoffperoxid, oxidiert werden können. Die Oxidase ist Glucoseoxidase für die Bestimmung der Glucose; Cholesterinoxidase für die Bestimmung von Cholesterin (Cholesterinesterhydrolase wird auch zur Hydrolyse von esterifiziertem Cholesterin zugegeben) und Uricase für Harnsäurebestimmungen.

Die Menge an gebildetem Farbstoff ist proportional der Konzentration des Wasserstoffperoxids und deshalb auch proportional der Konzentration der Komponente in der Probe. Durch eine einfache Messung der Absorbanz in der umgesetzten Lösung und durch Vergleich einer solchen Messung mit derjenigen einer bekannten Standardlösung der betreffenden Komponente kann auf diese Weise die Konzentration der Komponente in der Probe ermittelt werden.

Der gebildete Farbstoff kann im sichtbaren Bereich gemessen werden, im allgemeinen zwischen 500 und 550 Nanometer (nm), in Abhängigkeit des verwendeten Phenols, wobei nur ein Colorimeter oder ein im sichtbaren Bereich arbeitendes Photometers benötigt wird.

Das chromogene Emerson-Trinder-System leidet unter dem Hauptnachteil, dass die oxidative Kupplungsreaktion durch reduzierende Komponenten und Bilirubin, einem Metaboliten, der gewöhnlich im Serum in Konzentration nicht höher als ein Milligramm pro Deziliter (mg/dl) vorhanden ist, der aber bei einigen Krankheiten sehr hohe Werte (20 oder mehr mg/dl) erreichen kann, beeinträchtigt wird. Anomal hohe Bilirubin-Werte beeinflussen die enzymatischen Glucose-, Cholesterin- und Harnsäuretests, indem sie die Farbe der Reaktion zum Ausbleichen bringen. Der Einfluss steigt mit der Zunahme des Bilirubin-Gehaltes.

Die Erklärung für den negativen Einfluss von reduzierenden Verbindungen z.B. Ascorbinsäure ist recht naheliegend, da diese hauptsächlich als Konkurrenz des Chromogens in der Peroxidase katalysierten Reaktion mit Wasserstoffperoxid oder als Bleichmittel auf die gebildete Farbe wirken. Trotzdem ist der Einfluss von reduzierenden Substanzen in der Regel kein wirkliches Problem, wenigstens im Serum nicht, wo der Gehalt an Ascorbinsäure kaum je 3 mg/dl übersteigt.

Im Gegensatz dazu ist der Einfluss des Bilirubins ein signifikantes Problem bei der Bestimmung von Metaboliten im Serum mit Hilfe des chromogenen Emerson-Trinder-Systems und stellt einen wichtigen negativen Gesichtspunkt dieses Systems in der routinemässigen Laborpraxis dar, wo oft hyperbilirubinemische Proben gefunden werden.

Der Reaktionsmechanismus des Bilirubins ist recht komplex, und er wird bis heute noch nicht voll verstanden. Der beste Beitrag, der soweit zu diesem Problem geleistet wurde, stammt von Witte [Clin. Chem. 24: 1778 (1978)], der den Einfluss des Bilirubins einem oder mehreren der folgenden Faktoren zuschreibt: einfache spektrale Effekte, indem es ein alternatives Peroxidasesubstrat darstellt, oder Zerstörung der Peroxidaseraktionszwischenprodukte.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, ein verbessertes Testverfahren für die Bestimmung von Harnsäure in einer flüssigen Probe zu schaffen.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, ein verbessertes Testverfahren für die Bestimmung von Harnsäure zur Verfügung zu stellen, das in hohem Masse resistent gegen die beeinflussenden Wirkungen des Bilirubins ist.

Aus der folgenden Beschreibung und den Ansprüchen, die sich auf bevorzugte Merkmale beziehen, können andere Aufgaben ersehen und ein besseres Verstehen der Erfindung erreicht werden.

Als Teil der vorliegenden Erfindung hat man entdeckt, dass das Bilirubin chromogene Testverfahren des Typs mit einem substituierten oder unsubstituierten Phenol und 4-Aminophenazon stark beeinflussen kann, wobei zur Hauptsache zwei verschiedene Mechanismen eine Rolle spielen können: (1) das Spektrum des in der Reaktion gebildeten Farbstoffes wird überlagert, was eine positive Interferenz darstellt und (2), wie vorgehend diskutiert, die Beeinflussung basiert auf einem chemischen Mechanismus, was einer negativen Interferenz entspricht. Die positive Interferenz, die aus dem ersten Mechanismus resultiert, kann dadurch reduziert werden, dass man die Absorbanz bei einer Wellenlänge von 520 nm oder höher abliest. Eine solche Möglichkeit besteht jedoch nicht bezüglich des zweiten Mechanismus. Er spielt gewöhnlich eine extrem wichtige Rolle, indem ungenaue Resultate in den oben beschriebenen Testverfahren erhalten werden, wenn Bilirubin in der Probe in abnormal hohen Konzentrationen vorhanden ist.

Im Gegensatz zu den Zusammensetzungen gemäss dem heutigen Stand der Technik reagiert die in der erfindungsgemässen Testvorrichtung verwendete Zusammensetzung in hohem Masse empfindlich auf die Anwesenheit von Harnsäure in Körperflüssigkeiten und ist zugleich im wesentlichen stabil gegen Bilirubin-Einflüsse.

Die erfindungsgemässe Testvorrichtung für die Bestimmung von Harnsäure in einer flüssigen Probe ist dadurch gekennzeichnet, dass sie einen mit einer Zusammensetzung verbundenen Träger enthält, wobei die Zusammensetzung auf die in der Probe vorhandene Harnsäure ansprechende Mittel und Phenol oder ein substituiertes Phenol oder Naphthol oder ein substituiertes Naphthol und 4-Aminophenazon enthält, und wobei in der Zusammensetzung zusätzlich ein Ferrocyanid-Ionen enthaltendes Reagens anwesend ist.

Obwohl aus Gründen der Klarheit in der folgenden Beschreibung spezifische Ausdrücke verwendet werden, sollen sich diese Ausdrücke nur auf die speziellen Teile, die zur beispielhaften Illustration ausgewählt wurden, beziehen, und sie sollen den Rahmen der Erfindung nicht definieren oder einschränken.

Die in der erfindungsgemässen Testvorrichtung enthaltene Zusammensetzung kann viele physikalische Formen annehmen und enthält ein Phenol, das substituiert oder unsubstituiert sein kann und das wohlbekannt für seine Anwendbarkeit zusammen mit 4-Aminophenazon-Indikatorzusammensetzungen ist, in Kombination mit den Reagenzien, die ein Ferrocyanid-Ion enthalten. Es werden solche Zusammensetzungen beschrieben, zusammen mit Materialien wie stabilisierenden Mitteln und anderen gebräuchlichen Additiven, die, wenn es gewünscht wird, zusätzlich angewendet werden können.

Bevorzugte Reagenzien, die ein Ferrocyanid-Ion enthalten, schliessen Alkalimetallsalze des Ferrocyanids, wie z.B. Natrium- oder Kaliumferrocyanid ein, wie auch andere Quellen von Ferrocyanid-Ionen, einschliesslich irgendeines anderen Salzes oder Systems, welches $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Ionen enthält oder fähig ist, solche zu liefern.

Zusammen mit diesen Reagenzien enthält die Zusammensetzung: Mittel, die auf die Anwesenheit von Harnsäure in einer flüssigen Probe so ansprechen, dass sie eine oxidierende Substanz produzieren. Solche auf Harnsäure ansprechende Mittel sind vorzugsweise enzymatischer Natur und schliessen vorzugsweise Uricase und eine peroxidativ wirksame Substanz ein. Die Konzentrationen und Typen der Reagenzien, die als auf Harnsäure ansprechende Mittel angewendet wer-

den können, schliessen üblicherweise die beim heutigen Stand der Technik Bekannten ein.

Die Testmittel können als Lösung für die Bestimmung von Harnsäure verwendet werden. Die bei der Herstellung solcher Lösungen verwendeten Lösungsmittel können Wasser, physiologische Lösungen, organische Lösungsmittel wie z.B. Methanol oder Mischungen davon sein.

Für den Nachweis von Harnsäure wird die Zusammensetzung bevorzugt so angewendet, dass man sie zu einer Probe, wie z.B. Urin, Cerebrospinal-Flüssigkeit, Gewebekultur-Flüssigkeit und vorzugsweise Serum, Plasma oder gesamtes Blut, gibt.

Wenn die Zusammensetzung in Lösungsform verwendet wird, wird das Reagenz, das das Ferrocyano-Id-Ion enthält, vorzugsweise in Konzentrationen von 1,0 Mikromol/Liter ($\mu\text{mol/l}$) bis zu einer gesättigten Lösung eingesetzt. Der bevorzugte Bereich erstreckt sich von 5 $\mu\text{mol/l}$ bis 50 $\mu\text{mol/l}$. Wenn Uricase Teil des auf Harnsäure ansprechenden Mittels ist, bewegen sich dessen Konzentrationen vorzugsweise von 10 International-Units (I.U.)/Liter (l) bis 200 I.U./l. Wenn Peroxidase mindestens eines der Reagenzien ist, das zu den auf die Harnsäure ansprechenden Mittel gehört, liegen die Konzentrationen der Peroxidase vorzugsweise zwischen 10 I.U./l und 200 I.U./l.

Die Enzymaktivität wird in International-Units (I.U.) ausgedrückt, wobei eine I.U. die Menge an Enzymaktivität bedeutet, die benötigt wird, um unter spezifischen pH- und Temperaturbedingungen die Umwandlung von 1 Mikromol (μmol) Substrat zu bewirken. Die in den Beispielen verwendete Meerrettich-Peroxidase und Uricase können von The Research Products Division, Miles Laboratories, Inc., Elkhart, Indiana erhalten werden.

Das erfindungsgemässe Verfahren zur Herstellung von erfindungsgemässen Testvorrichtungen schliesst das Einarbeiten der Zusammensetzung in einen Träger, wie beispielsweise eine Matrix, ein. Wenn dieses Einarbeiten allgemein darin besteht, dass der Träger mit einer Lösung, welche die erfindungsgemäss eingesetzte Zusammensetzung enthält, imprägniert wird, so wird üblicherweise der so imprägnierte Träger getrocknet. Zusätzlich zum Imprägnieren können die betrachteten Testvorrichtungen durch andere geeignete Einarbeitungstechniken erhalten werden, beispielsweise indem man die Zusammensetzung auf das Substrat oder die Matrix sprüht oder drückt. Alternativ dazu kann die erfindungsgemäss eingesetzte Zusammensetzung einem Träger zugefügt werden, der die Form einer gepressten oder geschmolzenen Tablette, die gebräuchliche Trägermaterialien enthält, haben kann.

Der Ausdruck «Träger» bezieht sich im allgemeinen auf Matrizen, die unlöslich sind und ihre strukturelle Integrität behalten, wenn sie mit physiologischen oder anderen Flüssigkeiten zusammengebracht werden. Geeignete verwendbare Matrizen können Papier, Cellulose, Holz, synthetische Harze, Vliese, Glasfasern, nichtgewobene und gewobene Materialien, Gelatine, verschiedene organische Polymere, wie Polypropylen und andere dem Fachmann als filmbildende Mittel wohlbekannte organische Materialien sein.

Aus Gründen der Bequemlichkeit kann der Träger oder die Testvorrichtung mit einem unlöslichen Stütz- oder Griffteil versehen sein, der aus Polystyrol angefertigt sein kann.

Wenn die Testzusammensetzung für den Nachweis von Harnsäure im Blut verwendet wird, so wird die Oberfläche der imprägnierten Trägermatrix vorteilhafterweise mit einem semipermeablen, transparenten, bedeckenden Film aus Ethylcellulose oder aus einem anderen geeigneten Material bedeckt. Das kann zum Beispiel so geschehen, dass man auf die Oberfläche der imprägnierten Trägermatrix eine Schicht

aus Ethylcellulose, gelöst in Benzol, aufbringt und dann das Lösungsmittel durch verdampfendes Trocknen entfernt.

Harnsäure-Indikatoren in der Form von behandelten Trägermatrizen oder Testvorrichtungen werden oft während einer beträchtlichen Zeit gelagert, bevor sie gebraucht werden, und es kann deshalb wünschbar erscheinen, dass die gewählten Reagenzien an Luft nicht leicht selbst oxidierend sind. Es kann ratsam sein, die Testvorrichtung vor Licht geschützt zu halten, und in gewissen Fällen kann es wünschbar sein, sie in einer luftdichten Verpackung aufzubewahren, die nur geöffnet wird, um eine oder mehrere der Testvorrichtungen kurz vor deren Verwendung herauszunehmen.

Wenn es gewünscht wird, kann die Trägermatrix mit einem Hintergrund-Farbstoff einer bestimmten Farbe, beispielsweise Gelb, behandelt werden, so dass sich die Farbe, die durch die Testreaktion gebildet wird, mit der Hintergrundfarbe mischt, und so verschiedene Färbungen hervorruft, die den Konzentrationen der Proben-Komponente entspricht.

Die Vorrichtung wird vorzugsweise durch einen einzigen Eintauch-Prozess hergestellt. Die Konzentrationen der in dieser Eintauch-Lösung verwendeten Reagenzien kann von 10^{-3} mM bis zur Sättigung der Lösung variieren. Für das 4-Aminophenazon ist im allgemeinen eine Konzentration von etwa 0,2 mM am nützlichsten. In der Eintauch-Lösung kann die Konzentration der Peroxidase von 0,1 mg/dl bis 20 mg/dl gehen. Als Lösungsmittel bei der Herstellung der Imprägnierungs-Lösung können Wasser, physiologische Lösungen, organische Lösungsmittel oder Kombinationen davon verwendet werden.

Die Testvorrichtung wird vorteilhafterweise so angewendet, dass man sie vorübergehend in eine Testprobe taucht oder, andernfalls, indem man die Testprobe auf die Trägermatrix aufbringt, wobei, wenn Harnsäure anwesend ist, ein nachweisbarer Farbwechsel resultiert. Die Testvorrichtung kann auf gleiche Art eingesetzt werden, gleichgültig ob Proben von Plasma, Serum oder anderen Körperflüssigkeiten getestet werden sollen. Wenn Blut als Ganzes getestet werden soll, ist es aber im allgemeinen von Vorteil, wenn ein Blutstropfen mit der Oberfläche der Vorrichtung kontaktiert wird.

Die folgenden Beispiele dienen nur zur Veranschaulichung und stellen keine Begrenzung der Erfindung dar. Der Fachmann wird in der Lage sein, Variationen, Substitutionen und Änderungen in den Bestandteilen und Parametern vorzunehmen, wie es ihm wünschbar erscheint.

Beispiel 1

Bestimmung von Harnsäure in Serum Uricase und Peroxidase/3,5-Dichlor-2-hydroxybenzolsulfonsäure/4-Aminophenazon

Es wurden Testlösungen nach dem Stand der Technik sowie erfindungsgemäss hergestellt und bezüglich ihrer Resistenz gegen interferierende Wirkungen des Bilirubins bei der Bestimmung von Harnsäure verglichen.

Die nach dem Stand der Technik zubereiteten Testlösungen hatten die folgende Zusammensetzung:

Phosphatpuffer	150 mmol/l, pH 7,0
Uricase	60 I.U./l
Peroxidase	140 I.U./l
4-Aminophenazon	0,24 mmol/l
3,5-Dichlor-2-hydroxybenzolsulfonsäure	2,0 mmol/l

Die Lösungen welche die erfindungsgemässe Zusammensetzung enthielten, wurden in exakt der gleichen Weise wie oben beschrieben hergestellt, aber man fügte 20 $\mu\text{mol/l}$ Kaliumferrocyanid [$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$] zu.

Je ein 2,0 ml-Aliquot der Testverbindung nach dem Stand

der Technik wurde in eine erste Gruppe von Teströhrchen pipettiert und je ein 2,0 ml-Aliquot der Lösung mit der erfindungsgemässen Zusammensetzung in eine zweite Gruppe von Teströhrchen gegeben. Zu den Teströhrchen jeder Gruppe wurden parallele Serien von Proben gefügt.

Verschiedene, erhaltene Serumproben wurden zusammen gemischt und auf den Gehalt an Harnsäure und Bilirubin geprüft. Zu den vereinten Seren fügte man Harnsäure bis zu einer Konzentration von 6,0 mg/dl und teilte dann die Lösung in Aliquote auf. Dann gab man zu den Aliquoten Bilirubin, um Proben von Testlösungen zu erhalten, die Bilirubin-Konzentrationen von 0,7, 1,4, 2,2, 3,6, 5,0, 6,5, 8,8, 12,1, 16,7 und 23,4 mg/dl hatten. Andere Harnsäure-Lösungsaliquote ohne Bilirubin wurden als Standardlösungen verwendet.

Jede Gruppe der Teströhrchen wurde mit parallelen Serien von 0,05 ml Proben-Aliquoten versehen, welche die verschiedenen Bilirubinkonzentrationen enthielten. Die Lösungen in den Teströhrchen liess man darauf 15 Minuten bei Raumtemperatur reagieren. Die Absorbanz wurde bei 520 nm gegen entsprechende Blindproben ohne Uricase abgelesen.

Die Resultate mit dem Gehalt an Harnsäure in Prozenten, bezogen auf die ursprünglich vorhanden gewesene Menge, die aus Tests mit Zusammensetzungen nach dem Stand der Technik und nach der Erfindung mit den verschiedenen Bilirubin-Konzentrationen erhalten worden waren, sind in der folgenden Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1

Bilirubin (mg/dl)	Gefundene Harnsäure (in % der ursprünglichen Menge)	
	mit $K_4Fe(CN)_6$	ohne $K_4Fe(CN)_6$
0,7	100,0 $\pm$ 1,2	100,0 $\pm$ 1,2
1,4	100,0	97,2
2,2	99,2	93,5
3,6	98,0	83,6
5,0	97,0	78,5
6,5	95,9	71,5
8,8	93,4	59,0
12,1	91,0	43,5
16,7	90,0	21,0
23,4	89,0	—

Bei der Abwesenheit von Ferrocyanoide kann beim Harnsäuretest eine bemerkenswerte chemische Interferenz (etwa 6%) festgestellt werden, selbst bei so kleinen Bilirubinmengen wie 2 mg/dl und dieser Effekt gar noch wesentlich dramatischer (mehr als 20%) bei Mengen von 5 mg/dl.

Wenn Ferrocyanoide verwendet wird, reduziert sich die chemische Interferenz des Bilirubins sehr stark; statistisch nicht signifikant bei 2 mg/dl Bilirubin; 3% bei 5 mg/dl; um 10% bei Bilirubinmengen von 15–20 mg/dl.

Beispiel 2

Testvorrichtung für die Harnsäurebestimmung in Urin mit Uricase und Peroxidase/3,5-Dichlor-2-hydroxybenzolsulfonsäure /4-Aminophenazon

Es wurden Testvorrichtungen, die Zusammensetzungen, hergestellt einmal nach dem Stand der Technik und einmal gemäss der Erfindung, eingearbeitet enthielten, bezüglich ihrer Resistenz gegen interferierende Effekte des Bilirubins beim Test auf Harnsäure in Urin verglichen.

Eine Imprägnierungslösung gemäss dem Stand der Technik setzte sich wie folgt zusammen:

Phosphatpuffer	150 mmol, pH 7,0
Uricase	150 I.U.
Peroxidase	860 I.U.
4-Aminophenazon	0,24 mmol
3,5-Dichlor-2-hydroxybenzolsulfonsäure	2 mmol
H ₂ O auf	1000 ml

Eine die erfindungsgemässe Zusammensetzung enthaltende Lösung stellte man genau gleich her und fügte noch 20 μ mol Kaliumferrocyanid [$K_4Fe(CN)_6$] zu.

Blätter von Whatman Nr. 17 Filterpapier (Whatman, Inc. Clifton, N.J.) wurden bis zur Sättigung mit der Imprägnierungslösung getränkt und bei 60 °C getrocknet. Diese Blätter, welche den getrockneten Rückstand der Imprägnierungslösung enthielten, wurden in Stücke von 2,5 Millimetern (mm) $\times$ 2,5 mm geschnitten und ergaben so die Testvorrichtungen.

Diese Stücke wurden mit doppelseitig klebendem Band einseitig verstärkt und zugleich mit einem Plastikgriff versehen.

Verschiedene erhaltene Urinproben wurden zusammen gegeben und der Gehalt an Harnsäure und Bilirubin bestimmt. Der vereinte Urin wurde dann mit 10 Volumenteilen destillierten Wassers verdünnt. Zu dieser verdünnten Harnmischung gab man Harnsäure bis zu einer Konzentration von 6 mg/dl. Dann fügte man Bilirubin zu bis zu einer Konzentration von 10 mg/dl und erhielt so eine Testlösung. Diese Testlösung wurde in Aliquote aufgeteilt.

Die erfindungsgemässen ebenso wie die nach dem Stand der Technik hergestellten Testvorrichtungen wurden für kurze Zeit in je ein Aliquot der Harnsäure-Testlösung getaucht. Nach etwa 10 Minuten wurden die Testvorrichtungen visuell auf eine Farbänderung hin untersucht.

Erfindungsgemäss hergestellte Testvorrichtungen zeigten eine deutliche Farbänderung, welche die Anwesenheit von Harnsäure offenbarte, währenddem Testvorrichtungen, welche die Zusammensetzung nach dem Stand der Technik enthielten, ihre Farbe nicht änderten und so fälschlicherweise negativ auf Harnsäure anzeigten.

Obwohl die Erfindung mit einem gewissen Grad an Partikularität beschrieben worden ist, soll die vorliegende Offenbarung als beispielhaft verstanden werden, wobei in den Details eine Vielzahl von Änderungen vorgenommen werden kann, ohne dass man dadurch den Rahmen der Erfindung sprengen würde.