

(12) **Ausschließungspatent**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **223 537 A5**4(51) **G 01 N 33/72**
C 12 Q 1/28**AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

| | | | | | |
|------|-----------------------|------|----------|------|----------|
| (21) | AP G 01 N / 262 051 8 | (22) | 17.04.84 | (44) | 12.06.85 |
| (31) | P3314308.0 | (32) | 20.04.83 | (33) | DE |

| | |
|------|---|
| (71) | siehe (73) |
| (72) | Schmitt, Urban; Deeg, Rolf, Dr. rer. nat.; Ziegenhorn, Joachim, Dr. rer. nat., DE |
| (73) | Boehringer Mannheim GmbH, 6800 Mannheim 31, DE |

(54) Verfahren und Reagens zur Bestimmung des Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexes in Gegenwart von freiem Hämoglobin

(57) Beansprucht wird ein Verfahren zur Bestimmung des Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexes durch Ausnutzen der unterschiedlichen peroxidatischen Eigenschaften des freien und des gebundenen Hämoglobins, wobei zur selektiven Inhibierung der Peroxidase-Aktivität des freien Hämoglobins ein Detergens zugesetzt und die restliche Peroxidase-Aktivität des Reaktionsgemisches gemessen wird. Es wird ein Reagens zur Durchführung des Bestimmungsverfahrens bereitgestellt, das neben den zur Bestimmung der Peroxidase-Aktivität erforderlichen Substanzen ein Detergens zur Inhibierung der Peroxidase-Aktivität des freien Hämoglobins enthält. Das erfindungsgemäße Verfahren kann dazu benutzt werden, den Haptoglobin-Gehalt einer Probe zu bestimmen, indem die Probe mit überschüssigem Hämoglobin versetzt und die Peroxidase-Aktivität bestimmt wird. Auch der Gehalt einer Probe an glykosiliertem Hämoglobin läßt sich in erfindungsgemäßer Weise durch Messen der peroxidatischen Aktivität nach Differenzierung des glykosilierten und des nicht-glykosilierten Hämoglobins mit Hilfe von Haptoglobin ermitteln.

Verfahren und Reagens zur Bestimmung des Hämoglobin - Haptoglobin - Komplexes

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und ein Reagens zur Bestimmung des Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexes in Gegenwart von freiem Hämoglobin durch Ausnutzen der unterschiedlichen peroxidatischen Eigenschaften des freien und des gebundenen Hämoglobins.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Hämoglobin besitzt peroxidatische Aktivität, die auch im Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex erhalten bleibt. Die Bestimmung von Hämoglobin über seine Peroxidase-Aktivität ist wesentlich empfindlicher als die direkte photometrische Bestimmung von geeigneten Hämoglobin-Derivaten, beispielsweise von Cyan-Methämoglobin. Die peroxidatische Aktivität von freiem Hämoglobin und von dem Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex läßt sich unterschiedlich beeinflussen, beispielsweise durch Verändern des pH-Wertes.

Zur Messung der peroxidatischen Aktivität von freiem Hämoglobin und von dem Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex sind zwei verschiedene Meßprinzipien beschrieben (vgl. hierzu: Z.Klin.Chem. u. Klin. Biochem. 6 (1968) S. 69 bis 112 sowie Biochim.Biophys. Acta 285 (1972) S. 22 bis 27):

a) Die zu bestimmende, Hämoglobin- bzw. den Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex enthaltende Lösung wird mit

2
~~-1a-~~

Wasserstoffperoxid und mit einem geeigneten chromogenen Substrat versetzt und bis zum Ende der Farbreaktion inkubiert. Das Ende der Reaktion kommt dadurch zustande, daß das Hämoglobin durch das Wasserstoffperoxid inaktiviert wird. Die maximal erreichte Extinktion wird gemessen. Oft nimmt die Extinktion nach Erreichen dieses Maximums infolge Instabilität des gebildeten Farbstoffs wieder ab.

tät des freien Hämoglobins verhindert eine zuverlässige und exakte Messung der Konzentration an Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex, vor allem dann, wenn mehr freies Hämoglobin als im Komplex gebundenes Hämoglobin vorliegt.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines verbesserten Verfahrens zur Bestimmung des Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexes in Gegenwart von freiem Hämoglobin.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen, bei dem die Peroxidase-Aktivität des freien Hämoglobins weitgehend inaktiviert wird und die Peroxidase-Aktivität des Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexes ungestört und somit genau erfaßt werden kann.

Gelöst wird diese Aufgabe dadurch, daß dem Reaktionsgemisch ein Detergens zugesetzt wird, das die Peroxidase-Aktivität des freien Hämoglobins nahezu vollständig inaktiviert, die peroxidatische Aktivität des im Komplex gebundenen Hämoglobins jedoch nicht oder nur unwesentlich verändert.

Insbesondere wird erfindungsgemäß zur selektiven Inhibierung der Peroxidase-Aktivität des freien Hämoglobins ein Detergens zugesetzt und die restliche Peroxidase-Aktivität des Reaktionsgemisches gemessen.

Erfindungsgemäß verwendbar sind alle Detergentien, die die Peroxidase-Aktivität des freien Hämoglobins möglichst vollständig inaktivieren, die Peroxidase-Aktivität des gebundenen Hämoglobins jedoch nicht merklich beeinflussen und

die auch nicht die peroxidatische Farbstoffbildung unterbinden. Als besonders brauchbar haben sich Detergentien aus der Gruppe der Saponine und Lanoline bzw. Detergentien mit einem Zucker- oder Zuckeralkoholanteil erwiesen. Besonders bevorzugt im Sinne der Erfindung sind Saponin, Digitonin und Polyoxyethylen-Sorbit.

Das Detergens wird erfindungsgemäß in einer Konzentration von 0,1 bis 50 g/l eingesetzt.

Zum Messen der Peroxidase-Aktivität wird ein Peroxid und ein chromogenes Substrat verwendet.

Ganz besonders bevorzugt ist ein Reagens der folgenden Zusammensetzung:

- 1 - 5 g/l Saponin
- 0,5 - 25 mmol/l Perborat
- 0,5 - 2 mmol/l ABTS
- 0,01 - 0,2 mol/l Citratpuffer, pH 3,5 - 4,5.

Das erfindungsgemäße Verfahren läßt sich in vorteilhafter Weise auch ausnützen zur Bestimmung von Haptoglobin, indem das Haptoglobin durch Zugabe eines Überschusses an Hämoglobin vollständig in den Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex überführt und die Konzentration des Komplexes nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gemessen wird. Die zugesetzte Hämoglobin-Menge wird durch das Haptoglobin zu einem Haptoglobin-Hämoglobin-Komplex gebunden bis die gesamte, in der Probe vorhandene Haptoglobin-Menge als Komplex vorliegt. Das überschüssige Hämoglobin bleibt als freies Hämoglobin in Lösung. Dieses trägt bei der Messung der peroxidatischen Aktivität nach dem erfindungsgemäßen Verfahren nicht zu einer Extinktionssteigerung bei, da ja die Peroxidase-Aktivität des freien Hämoglobins durch das zugesetzte Detergens weitgehend inaktiviert wird. Die gemessene Extinktion entspricht der Konzentration an Haptoglobin-Hämoglobin-Komplex und damit der in der Probe ursprünglich vorhandenen Haptoglobin-Konzentration.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Messung des Haptoglobin-Hämoglobin-Komplexes in Gegenwart von freiem Hämoglobin kann auch in vorteilhafter Weise zur Bestimmung des glykosilierten Hämoglobin-Anteils gemäß den in der DE-Patentanmeldung P 31 41 146.0 beschriebenen und beanspruchten Verfahren ausgenutzt werden. Hierzu wird die zu bestimmende Probe zur Differenzierung des glykosilierten und des nicht-glykosilierten Anteils mit Haptoglobin versetzt.

chromogenes Substrat enthält. Die Peroxidasereaktion wird durch Zusatz einer Lösung gestartet, die das Peroxid und das erfindungsgemäße Detergens enthält. Die Peroxidase-reaktion wird durch Messen der Extinktionszunahme bei der für das eingesetzte chromogene Substrat charakteristischen Wellenlänge verfolgt. Es wird die Reaktionsgeschwindigkeit, ausgedrückt in mE/Min., bestimmt.

Das vorstehend beschriebene Bestimmungsverfahren eignet sich auch besonders gut zur Durchführung auf einem automatischen Analysenautomaten.

Ausführungsbeispiel

Die vorliegende Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert:

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Bestimmung des Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexes in Gegenwart von freiem Hämoglobin durch Ausnutzen der unterschiedlichen peroxidatischen Eigenschaften des freien und des gebundenen Hämoglobins, gekennzeichnet dadurch, daß zur selektiven Inhibierung der Peroxidase-Aktivität des freien Hämoglobins ein Detergens zugesetzt und die restliche Peroxidase-Aktivität des Reaktionsgemisches gemessen wird.
2. Verfahren gemäß Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß das Detergens aus der Gruppe der Saponine, Lanoline und Detergentien mit einem Zuckeranteil ausgewählt wird.
3. Verfahren gemäß Punkt 2, gekennzeichnet dadurch, daß als Detergens Saponin, Digitonin oder Polyoxyethylen-Sorbit-Detergens verwendet wird.
4. Verfahren gemäß einem der Punkte 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, daß das Detergens in einer Konzentration von 0,1 bis 50 g/l eingesetzt wird.
5. Verfahren gemäß einem der Punkte 1 bis 4, gekennzeichnet dadurch, daß zum Messen der Peroxidase-Aktivität ein Peroxid und ein chromogenes Substrat verwendet wird.
6. Verfahren gemäß Punkt 5, gekennzeichnet dadurch, daß als chromogenes Substrat Guajakol oder ABTS eingesetzt wird.

7. Verfahren gemäß Punkt 5, gekennzeichnet dadurch, daß als chromogenes Substrat 4-Aminoantipyrin, 3-Methyl-2-benzthiazolonhydrazon oder 3-Methyl-2-benzthiazolonhydrazonsulfonsäure in Kombination mit einem Phenol- oder Anilin-Derivat eingesetzt wird.
8. Reagens zur Durchführung des Verfahrens gemäß einem der Punkte 1 bis 7, gekennzeichnet dadurch, daß es neben Substanzen zur Bestimmung der Peroxidase-Aktivität ein Detergens zur Inhibierung der Peroxidase-Aktivität des freien Hämoglobins enthält.
9. Reagens gemäß Punkt 8, gekennzeichnet dadurch, daß das Reagens aus der Gruppe der Saponine, Lanoline und Detergentien mit einem Zuckeranteil ausgewählt wird.
10. Reagens gemäß Punkt 9, gekennzeichnet dadurch, daß als Detergens Saponin, Digitonin oder ein Polyoxyethylen-Sorbit-Detergens verwendet wird.
11. Reagens gemäß Punkt 8, gekennzeichnet dadurch, daß es
0,1 - 50 g/l Detergens
0,1 - 100 mmol/l Peroxid
0,1 - 5 mmol/l chromogenes Substrat
0,001 - 0,5 mol/l Puffer
enthält.
12. Reagens gemäß Punkt 11, gekennzeichnet dadurch, daß es

1 - 5 g/l Saponin
0,5 - 25 mmol/l Perborat
0,5 - 2 mmol/l ABTS
0,01 - 0,2 mol/l Citratpuffer, pH 3,5 - 4,5
enthält.

Hierzu 1 Seite Zeichnungen

10

